

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Charakterisierung von Chondroitinsulfat-Proteoglykanen auf Brustkrebszelllinien, welche durch
das rekombinante Malaria Protein rVAR2 gebunden werden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lara Trnka

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Für meine Eltern: Birgit und Dr. Luboš Trnka

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom (MaCa) ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Um einen Tumor erfolgreich behandeln zu können, besteht das Ziel eine patientenspezifische Therapie zu finden, wofür eine Analyse der individuellen Tumorzellen erforderlich ist. Derzeit werden MaCa-Zellen durch Gewebebiopsien gewonnen. Diese stellen jedoch einen invasiven Eingriff dar und sind nicht immer durchführbar. Um Gewebebiopsien zu vermeiden, könnten zirkulierende Tumorzellen (*Circulating Tumor Cells* [CTCs]) aus einer *Liquid Biopsy* eine wichtige Rolle spielen. Es existieren multiple Methoden zur Gewinnung von CTCs, die beispielsweise auf epithelialen Markern basieren. Jedoch können diese epithelialen Marker während der Metastasierung herunterreguliert werden, was die Detektion der CTCs erschwert. Um auch solche CTCs zu finden und die Anzahl an detektierten CTCs zu erhöhen, kann das rekombinante Malariaprotein VAR2CSA (*Variant Surface Antigen 2 Chondroitin Sulfate A* (rVAR2) von Bedeutung sein. Das rVAR2 Protein bindet spezifisch an onkofetales Chondroitinsulfat (ofCS), welches auf der Oberfläche von Plazenta- sowie den meisten Tumorzellen vorhanden ist.

In Vorarbeiten dieser Promotion konnte die Bindung von rVAR2 an MaCa-Zelllinien nachgewiesen werden. Das Ziel dieser Dissertation ist die Identifikation von ofCS-modifizierten Proteoglykanen auf MaCa-Zellen, welche von rVAR2 gebunden werden, sowie der Vergleich von rVAR2-Zielproteinen auf triple-negativen und luminalen MaCa-Zelllinien.

Die ofCS-modifizierten Proteoglykane mehrerer MaCa-Zelllinien wurden durch einen rVAR2-basierten *Pulldown* aufgereinigt. Nach anschließender Massenspektrometrie-Analyse wurden mögliche rVAR2-Zielproteine auf MaCa-Zellen anhand einer Literaturrecherche ausgewählt und mittels Western Blot-Analyse validiert.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnten insgesamt 16 potenzielle glykosylierte rVAR2-Zielproteine auf der Zelloberfläche von MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen identifiziert werden. Nach Validierung mittels Western Blot-Analyse wurden Neuropilin 1, CD44 sowie *Laminin Subunit Gamma 1* als rVAR2-Zielproteine verifiziert. Zudem wurde nachgewiesen, dass die verwendeten triple-negativen MaCa-Zelllinien eine höhere Expression von Neuropilin 1, CD44 und *Laminin Subunit Gamma 1* im Vergleich zu luminalen MCF-7 Zellen haben und rVAR2 vermehrt an triple-negative MaCa-Zellen bindet. Die vorliegende Promotionsarbeit verdeutlicht, dass rVAR2 eine vielversprechende Methode ist, um vor allem triple-negative MaCa-Zelllinien zu detektieren.

Summary

Breast cancer is the most common cancer in women. To successfully treat the tumour, the goal is to find a patient-specific therapy, which requires an analysis of the individual tumour cells. Currently, breast cancer cells are obtained through tissue biopsies, which are though invasive and not always feasible. To avoid tissue biopsies, circulating tumour cells (CTCs) from a liquid biopsy could play an important role. Multiple methods exist to obtain CTCs, which are for example based on epithelial markers. However, epithelial markers can be downregulated during metastasis, which makes the detection of CTCs more difficult. In order to find such CTCs and to increase the number of detected CTCs, the recombinant malaria protein VAR2CSA (Variant Surface Antigen 2 Chondroitin Sulfate A) (rVAR2) could be of importance. The rVAR2-protein binds specifically to oncofetal chondroitin sulfate (ofCS), which is present on the surface of placental cells as wells as most tumour cells.

In preliminary work for this doctoral thesis, it has been shown that rVAR2 binds to breast cancer cell lines. The aim of this dissertation is to identify ofCS-modified proteoglycans on breast cancer cells which are bound by rVAR2 and to compare rVAR2-targets on triple-negative and luminal breast cancer cell lines.

The ofCS-modified proteoglycans of several breast cancer cell lines were purified by an rVAR2-based pulldown. After subsequent mass spectrometric analysis, possible rVAR2-targets on breast cancer cells were selected based on literature research and validated by Western blot analysis.

As part of this doctoral thesis a total of 16 potential glycosylated rVAR2-target proteins on the cell surface of MDA-MB-231, MDA-MB-436 and MCF-7 cells were identified. After validation by Western blot analysis, Neuropilin 1, CD44 as well as Laminin Subunit Gamma 1 could be verified as rVAR2-targets. In addition, it was shown that triple negative breast cancer cell lines show a higher expression of Neuropilin 1, CD44 and Laminin Subunit Gamma 1 compared to luminal breast cancer cells and that rVAR2 showed increased binding to those target proteins on triple-negative breast cancer cells. This dissertation shows that rVAR2 is a promising method to detect especially triple-negative breast cancer cells.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADC	<i>Antibody Drug Conjugates</i>
aE	artifizielle Einheiten
AGRN	Agrin
APLP2	<i>Amyloid like-Protein 2</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
<i>Beads</i>	<i>Dynabeads™ Biotin Binder</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cM ₀ (i+)	klinisches Stadium ohne Fernmetastasen mit CTCs
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	Chondroitinsulfat
CSF1	<i>Colony-Stimulating Factor-1</i>
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
CTCs	<i>Circulating Tumor Cells</i>
ctDNA	<i>Circulating Tumor DNA</i>
Cu	Kupfer
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DBL	<i>Duffy Binding Ligand-like</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition

EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ER	Östrogenrezeptor (<i>estrogen receptor</i>)
FCS	fetales Kälberserum
FDA.....	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FIGO ...	Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde (<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>)
GAG	Glycosaminoglycan
GPC.....	Glypican
HER2.....	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
ID	Interdomäne
kDa.....	Kilodalton
LAMA5.....	<i>Laminin Subunit Alpha 5</i>
LAMB1	<i>Laminin Subunit Beta 1</i>
Lamc1.....	<i>Laminin Subunit Gamma 1</i>
LEO1	<i>RNA Polymerase-Associated Protein LEO1</i>
mA.....	Milliampere
MaCa.....	Mammakarzinom
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
ml	Milliliter
NF-κB	<i>Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells</i>
nm	Nanometer
NRP.....	Neuropilin
ofCS	oncofetales Chondroitinsulfat
PARP.....	Poly-ADP-Ribose-Polymerasen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>

PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand 1</i>
PLA	<i>Proximity-Ligation Assay</i>
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PR.....	<i>Progesteronrezeptor</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
rpm	<i>Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRP12	<i>Ribosomal RNA Processing 12 Homolog</i>
rVAR2	<i>rekombinantes Variant Surface Antigen 2</i>
rVAR2 ^{mut}	<i>mutiertes rekombinantes Variant Surface Antigen 2</i>
rVAR2 ^{wt}	<i>Wildtyp rekombinantes Variant Surface Antigen 2</i>
SDC	<i>Syndecan</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel-Gelelektrophorese</i>
SNAI	<i>Snail Family Transcriptional Repressor</i>
SpyC.....	<i>SpyCatcher</i>
SpyT	<i>SpyTag</i>
SRPX.....	<i>Sushi Repeat-Containing Protein X-linked</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline with Tween20</i>
TGF-β.....	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNM.....	<i>Tumor, Node, Metastasis</i>
TWIST	<i>Twist Family bHLH Transcription Factor</i>
UBTF	<i>Upstream Binding Transcription Factor</i>
V	<i>Volt</i>

VAR2CSA	<i>Variant Surface Antigen 2 Chondroitin Sulfate A</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumore	1
1.2	Brustkrebs.....	1
1.2.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2.2	Klassifikation und Einteilung	2
1.2.3	Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms	2
1.3	Metastasierung.....	4
1.4	Die epithelial-mesenchymale Transition	5
1.5	<i>Liquid Biopsy</i>	6
1.6	CTCs.....	8
1.6.1	Charakteristika und Detektion von CTCs.....	8
1.6.2	CTCs und Brustkrebs	9
1.7	<i>Variant Surface Antigen 2 Chondroitin Sulfate A (VAR2CSA)</i>	10
1.7.1	Charakteristika von VAR2CSA	10
1.7.2	Proteoglykane	11
1.7.3	Die Bindung von rVAR2 an ofCS verschiedener Proteoglykane in unterschiedlichen Tumoridentitäten.....	12
1.8	Ziele der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material.....	16

2.1.1	Humane Mammakarzinom-Zelllinien	16
2.1.2	Zellkultur	16
2.1.3	Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.4	Laborgeräte.....	17
2.1.5	rVAR2	18
2.1.6	Western Blot-Analyse	19
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Zellkultur	23
2.2.2	<i>Pulldown</i> mit rVAR2.....	24
2.2.3	Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese und Western Blot	27
2.2.4	Kontrollen.....	30
2.2.5	Massenspektrometrie-Analyse	32
2.2.6	Statistik	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Vorarbeiten	34
3.1.1	Optimierung der Präzipitation von rVAR2-Zielproteinen.....	34
3.1.2	Etablierung von Kontrollen	36
3.1.3	Vergleich von Neuropilin 1 als rVAR2-Zielprotein auf triple-negativen und luminalen MaCa-Zelllinien.....	40
3.2	Massenspektrometrie-basierte Identifikation von rVAR2-Zielproteinen auf Mammakarzinom-Zellen	42
3.2.1	Analyse der Proben für die Massenspektrometrie-Analyse	43

3.2.2	Massenspektrometrie-Analyse	47
3.3	Auswahl der rVAR2-Zielproteine mittels Literaturrecherche für die anschließende Western Blot-Analyse.....	52
3.4	Validierung der detektierten rVAR2-Zielproteine mittels Western Blot-Analyse.....	54
3.4.1	Validierung von Neuropilin 1 als rVAR2-Zielprotein mittels Western Blot-Analyse....	55
3.4.2	Validierung von CD44 als rVAR2-Zielprotein mittels Western Blot-Analyse.....	56
3.4.3	Validierung von <i>Laminin Subunit Gamma 1</i> als rVAR2-Zielprotein mittels Western Blot-Analyse	59
4	Diskussion	63
4.1	Diskussion der Methoden	63
4.1.1	Limitationen der Auswertung des Western Blots.....	63
4.1.2	Limitationen der Auswertung der Massenspektrometriedaten.....	63
4.1.3	Limitationen der verwendeten Zelllinien	64
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	64
4.2.1	Neuropilin 1 als Zielprotein von rVAR2.....	64
4.2.2	CD44 als Zielprotein von rVAR2.....	67
4.2.3	<i>Laminin Subunit Gamma 1</i> als Zielprotein von rVAR2.....	69
4.3	rVAR2 im Kontext der zielgerichteten Therapie	71
4.4	Fazit und Ausblick.....	73
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	75
6	Anhang.....	88

1 Einleitung

1.1 Tumore

Im Jahr 2020 erkrankten global etwa 19 Millionen Menschen an einer malignen Krebserkrankung und ca. 10 Millionen Menschen starben an den Folgen von Krebs (1). Maligne Tumore sind gekennzeichnet durch verschiedene Merkmale, die sie von benignen Tumoren unterscheiden. Zu den Charakteristika maligner Tumore zählen u. a. ein niedrigerer Grad der Differenzierung sowie ein aggressives Wachstum (2). Im Gegensatz zu benignen Tumoren sind sie in der Lage die Basalmembran zu durchbrechen und zu metastasieren (3). Durch den Defekt verschiedener zellulärer Regulationsmechanismen im Rahmen einer Krebserkrankung wird eine ungehinderte Tumorprogression gefördert (4). Hanahan (5) beschreibt insgesamt zehn Krebsmerkmale, welche als *Hallmarks of Cancer* bezeichnet werden. Zu diesen Merkmalen zählen eine dauerhafte unkontrollierte Proliferation, eine Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, wie z. B. dem p53-Protein, eine Resistenz gegenüber der Apoptose, die Fähigkeit zur Angiogenese, Invasion und Metastasierung (5) sowie eine replikative Immortalität der Tumorzellen (6). Die weiteren Merkmale umfassen das Vermeiden der Zellzerstörung durch das Immunsystem, eine Tumor-begünstigende Entzündung, eine Instabilität des Genoms sowie das Umprogrammieren zellulärer Stoffwechselwege (7).

Die Einteilung von Tumoren erfolgt anhand ihrer Stadien mithilfe der *Tumor, Node, Metastasis* (TNM)-Klassifikation. Dabei beschreibt „T“ den Primärtumor, „N“ die Ausbreitung in lokale Lymphknoten und „M“ die Fernmetastasen (2). Des Weiteren erfolgt eine histologische Tumoreinteilung anhand des Grades der Differenzierung (2). Tumore werden unterschieden in Grad 1 bis 4. Je höher die Gradeinteilung, desto weniger Gemeinsamkeiten bestehen mit dem Ursprungsgewebe (2).

1.2 Brustkrebs

1.2.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom (MaCa) ist eine von fünf Haupttumorarten (8). Mit einer Inzidenz von ca. 24,5 % ist das MaCa die am häufigsten diagnostizierte Krebsart bei Frauen (1). Bei einer Mortalitätsrate von ca. 15,5 % ist dies die Haupttodesursache bei Frauen durch Krebs weltweit im Jahr 2020 (1). In Deutschland liegt die Inzidenz bei ca. 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr (9). Beim Mann tritt das MaCa sehr selten auf (10). Während im Jahr 2023 ca. 99 % aller Neuerkrankungen an Brustkrebs bei Frauen aufgetreten sind, machte der Anteil aller MaCa-Neuerkrankungen beim Mann etwa 1 % aus (11,12).

Die Prognose des MaCas richtet sich u. a. nach der Ausbreitung in lokale Lymphknoten (13), sogenannte Sentinel-Lymphknoten (2), sowie nach dem Differenzierungsstadium (13). Bei einem MaCa von Grad 1 liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 80 %, wohingegen sie beim Grad 3 bei etwa 30 % liegt (13). In Abhängigkeit nach der Anzahl der befallenen axillären Lymphknoten, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Befall ab vier Lymphknoten bei ca. 13 bis 33 % (13).

1.2.2 Klassifikation und Einteilung

Die Einteilung des MaCas erfolgt anhand der Internationalen Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO)). Die FIGO-TNM Klassifikation unterscheidet die Stadien 0, I, IIA - B, IIIA - C und IV. Das Stadium 0 beschreibt ein *Carcinoma in Situ* ohne regionale Lymphknoten- und Fernmetastasen, während das Stadium IV das Vorkommen von Fernmetastasen beinhaltet. (9)

Zudem wird das MaCa in vier intrinsische Subtypen unterteilt (10). Die Einteilung basiert auf der Genexpression des Östrogenrezeptors (ER), Progesteronrezeptors (PR), *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2)/neu sowie auf dem Proliferationsmarker Ki-67 (10). Die vier Subtypen werden unterschieden in Luminal A (ER- und/oder PR-positiv, HER2/neu-negativ, Ki-67 niedrig), Luminal B (HER2/neu-negativer Typ: ER- und/oder PR-positiv, HER2/neu-negativ, Ki-67 hoch sowie HER2/neu-positiver Typ: ER- und/oder PR-positiv, HER2/neu-positiv, Ki-67 hoch oder niedrig), HER2/neu positiv (ER- und PR-negativ, HER2/neu-positiv) sowie dem triple-negativen Subtyp (ER-, PR- und HER2/neu-negativ) (10). Je nach Subtyp unterscheidet sich der klinische Verlauf (10). Dabei stellt der triple-negative Subtyp, welcher etwa 12 bis 17 % aller MaCa-Fälle ausmacht, einen hoch aggressiven Subtyp dar (14). Das triple-negative MaCa hat schlechtere Überlebenschancen als Hormonrezeptor-positive Tumore (15).

1.2.3 Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms

Zur Frühdiagnostik des MaCas zählen das Selbstabtasten sowie die Palpation und Inspektion der Mamma und der Axilla durch einen Arzt (16). Das MaCa tritt in etwa der Hälfte der Fälle im oberen äußeren Quadranten der Brust auf (16) und kann sich klinisch u. a. als spürbare Verdickung, asymmetrische Form oder Hautauffälligkeiten der Brust, wie z. B. Rötungen, zeigen (12). Der wichtigste diagnostische Test zur Verminderung der MaCa-Sterblichkeit stellt die Mammographie dar (17), welche eine Auffindungsrate von etwa 80 bis 95 % hat (16). Am Mammographie-Screening können Frauen im Alter zwischen 50 und 75 Jahren alle zwei Jahre teilnehmen (18). Hinweise für ein MaCa in der Mammographie sind u. a. Mikroverkalkungen oder unscharfe Verdichtungen (16). Zurzeit erfolgt die anschließende diagnostische Sicherung durch eine histologische Beurteilung nach einer invasiven Stanz-, Vakuum- oder offenen Exzisionsbiopsie (17).

Die Therapie des MaCas umfasst unterschiedliche Möglichkeiten (17). Zum einen existieren operative Tumorentfernungen wie die brusterhaltende Therapie und die ablativ Therapie mit einer möglichen anschließenden primären oder sekundären Rekonstruktion (17). Neben der operativen Therapie gibt es zudem die Möglichkeit einer neoadjuvanten oder adjuvanten Systemtherapie sowie einer Strahlentherapie (17).

Die Therapie des MaCas ist dabei abhängig von dem intrinsischen Subtyp (9). Der Luminal A Subtyp wird u. a. mittels einer endokrinen Therapie therapiert, während der Luminal B HER2/neu-negative Subtyp u. a. mittels endokriner sowie Chemotherapie behandelt wird (9). Die Therapie des Luminal B HER2/neu-positiven Subtyps besteht u. a. aus endokriner, Chemo- und Anti-HER2/neu-Therapie (9). Zur gezielten Therapie des Hormonrezeptor-positiven MaCas werden zudem *Cyclin Dependent Kinase 4/6*-Inhibitoren verwendet. Dabei können sie beim MaCa mit einem erhöhtem Rezidivrisiko, Progress oder Fernmetastasierung unter endokriner Therapie angewendet werden (10,19–21). Der HER2/neu-positive Subtyp wird u. a. mit einer Chemo- sowie einer HER2/neu-gerichteten Therapie behandelt (9). Der triple-negative Subtyp kann weder mit einer endokrinen noch einer HER2/neu-gerichteten Therapie behandelt werden und wird u. a. mit einer dosisdichten Chemotherapie therapiert (22). Als Chemotherapeutika werden beispielsweise Anthracycline und Taxane verwendet, welche beim triple-negativem Subtyp u. a. mit Platinsalzen (10) oder Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab erweitert werden können (23,24).

Nach dem aktuellen *European Society for Medical Oncology*-Leitfaden für die klinische Praxis sollte u. a. das triple-negative MaCa nach *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1) und BRCA-Mutationen untersucht werden (25). *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1) ist ein Immun-Checkpoint-Rezeptor, welcher durch die Bindung seines Liganden PD-L1 die Effektorfunktion von CD8⁺-T-Zellen vermindern kann (26). Tumorzellen zeigen eine vermehrte Expression von PD-L1, was infolgedessen die Tumorzellbekämpfung durch das Immunsystem vermindert (26). Die Blockade der Bindung von PD-L1 an PD-1 durch Antikörper kann die Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem erhöhen und stellt daher eine mögliche antitumorale Therapie dar (27). Zu den verwendeten PD-L1 Inhibitoren zählen u. a. Pembrolizumab, Atezolizumab, Nivolumab, Durvalumab, Camrelizumab oder Sintilimab (27).

Eine weitere Relevanz in der Therapie des MaCas haben BRCA-Mutationen und die Therapie mit Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARP)-Inhibitoren (28). BRCA1/2 sind Tumorsuppressorgene, welche über die homologe Rekombination an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind (29,30). Mutationen der BRCA-Gene sind mitverantwortlich für eine Tumprogression, wobei das Lebenszeitrisiko für eine MaCa-Erkrankung bei Trägern einer BRCA-Mutation bei etwa 41 % bis 91 % liegt (31).

Die Poly-ADP-Ribosylierung durch PARP ist eine posttranslationale Modifikation von Histonen und Kernproteinen, die bei DNA-Schäden eine relevante Rolle für das Überleben von geschädigten proliferierenden Zellen spielt (32). Das am besten bekannte PARP-Enzym ist PARP1, welches durch Basenexzisionen an der DNA-Reparatur beteiligt ist (33). Die Hemmung von PARPs durch PARP-Inhibitoren führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen, welche normalerweise durch eine homologe Rekombination repariert werden können (34,35). Dabei spielen PARP-Inhibitoren v. a. bei BRCA-mutierten Zellen aufgrund ihrer fehlenden Möglichkeit der homologen Rekombination, eine Rolle (34). Zu den derzeit zugelassenen PARP-Inhibitoren im Rahmen der MaCa-Therapie zählen u. a. Olaparib und Talazoparib (36). Olaparib wird verwendet für die Therapie des metastasierten und lokal fortgeschrittenen BRCA1/2-mutierten MaCas mit HER2/neu-Negativität (28). Zudem findet Olaparib Anwendung im Frühstadium eines MaCas bei BRCA1/2-Mutation und HER2/neu-Negativität nach neoadjuvanter oder adjuvanter Chemotherapie mit hohem Rezidivrisiko (37). Talazoparib ist für die Therapie des metastasierten und lokal fortgeschrittenen HER2/neu-negativen MaCa mit BRCA1/2-Mutation zugelassen (38,39).

Generell gilt, je früher ein MaCa entdeckt wird, desto besser sind die Therapieoptionen und die Überlebenschancen (17). Daher ist von Interesse das MaCa möglichst in frühen Stadien zu diagnostizieren sowie zu therapieren (17).

1.3 Metastasierung

Etwa 90 % der Todesfälle aufgrund von Krebs sind durch Metastasen bedingt (6). Das Metastasieren von Tumorzellen stellt einen heterogenen Prozess dar, welcher bei verschiedenen Krebsarten unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweist und in verschiedenen Geweben und Organen stattfindet (40). Beim MaCa erfolgt der primäre Lymphabfluss zur Axilla (13), weshalb der Sentinel-Lymphknoten in der Axilla den ersten Ort der Metastasierung beim MaCa darstellt (12). Typische Orte von Fernmetastasen beim MaCa sind die Knochen, die Lunge (16), die Leber und das Gehirn (40).

Die Metastasierung erfolgt bei allen Tumorarten nach dem gleichen Schema (41). Zunächst invadieren Tumorzellen des Primärherdes in das umliegende Gewebe. Anschließend dringen die Tumorzellen in das Blut- und/oder Lymphsystem ein und zirkulieren im Blut oder in der Lymphe. Im Blut zirkulierende Tumorzellen werden *Circulating Tumor Cells* (CTCs) genannt. Es folgt der Austritt der Tumorzellen aus dem zirkulatorischen System und die anschließende Bildung von Mikrometastasen. Im letzten Schritt kommt es zur Kolonisation von Gewebe und Organen mit Bildung von makroskopischen Metastasen. (5)

Dabei stellt das Vorkommen von makroskopischen Metastasen den tödlichsten Abschnitt einer Krebserkrankung dar (42). Der Zeitraum zwischen Infiltration eines Organs bzw. Gewebes und der

Bildung von Makrometastasen wird als Latenzzeit beschrieben, welche abhängig von der Tumorart unterschiedlich lang ist und beim MaCa auch etwa zehn Jahre dauern kann (40). Im Rahmen der Metastasierungskaskade sind verschiedene Gene beteiligt. Diese Gene werden in Initiator-, Progressions- und Virulenzgene unterteilt (40). Zu Beginn der Metastasierung spielen die Initiatorgene eine wichtige Rolle, welche an der Invasion von Tumorzellen in das lokale Gewebe beteiligt sind (40). Zudem können sie auch zum Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) führen, welcher einen wichtigen Schritt zu Beginn der Metastasierung darstellt (40).

1.4 Die epithelial-mesenchymale Transition

Die EMT wird in drei Subtypen unterteilt (43). Der Subtyp 1 stellt eine wichtige Komponente im Rahmen der Embryogenese (43) bei der Bildung von neuen Keimschichten (44) dar. Der Subtyp 2 ist bedeutend für die Wundheilung, wohingegen der Subtyp 3 an der Tumormetastasierung, Progression und einer gesteigerten Malignität von Tumoren beteiligt ist (43). Dabei steht die EMT in Verbindung mit einer gesteigerten zellulären Plastizität, Invasionsfähigkeit (40), Apoptose-Resistenz (5,45) sowie Chemotherapie-Resistenz bei Brustkrebs (46).

Die Aktivierung der EMT erfolgt durch verschiedene Mechanismen. Zum einen induzieren Transkriptionsfaktoren, wie *Snail Family Transcriptional Repressor* (SNAI) 1, SNAI2 und *Twist Family bHLH Transcription Factor* (TWIST) 1 die EMT (Abb. 1) (47). Zum anderen kann der Wachstumsfaktor *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) und Zytokine, wie Interleukin-6 (42) und *Tumor Necrosis Factor alpha*, die EMT aktivieren (43).

Während der EMT entwickeln sich Zellen mit einem ursprünglichen epithelialen Phänotyp zu einem mesenchymalen Phänotyp (s. Abb. 1) (42). Die Tumorzellen verlieren ihre epithelialen Eigenschaften unter Hinzugewinn mesenchymaler Charakteristika (42), was die Migrationsfähigkeit der Zellen steigert (44). Diese Entwicklung läuft entlang der epithelial-mesenchymalen Achse, wobei auch phänotypische Zwischenstadien vorkommen (42) und eine partielle EMT möglich ist (43). Durch die EMT kommt es zu einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten durch u. a. eine verringerte Expression von Claudinen, Occludinen, Desomosomen und E-Cadherin (42). Des Weiteren erlangen die Zellen eine anterior-posterior Polarität und verändern ihr Zellskelett sowie ihre Zellform (45). Während der EMT kommt es zu einer verringerten Expression epithelialer Gene (45) sowie epithelialer Oberflächenmarker wie dem *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM) (48). Dahingegen werden mesenchymale Marker wie TWIST und der *Epidermal Growth Factor Receptor* (48), sowie mesenchymale Gene wie N-Cadherin und Vimentin (42) verstärkt exprimiert (45). Die EMT stellt einen reversiblen Prozess dar, welcher mesenchymal-epitheliale Transition (MET) genannt wird. Die MET kann im letzten Schritt der Metastasierungskaskade zur Kolonisation eines Organs beitragen (s. Abb. 1) (43).

Demzufolge hat die EMT eine große Relevanz in der Entwicklung und der Metastasierung maligner Tumore (42). Die Kenntnis über die genauen Vorgänge während der EMT, könnte eine entscheidende Rolle in der Entwicklung neuer Therapieansätze spielen (42).

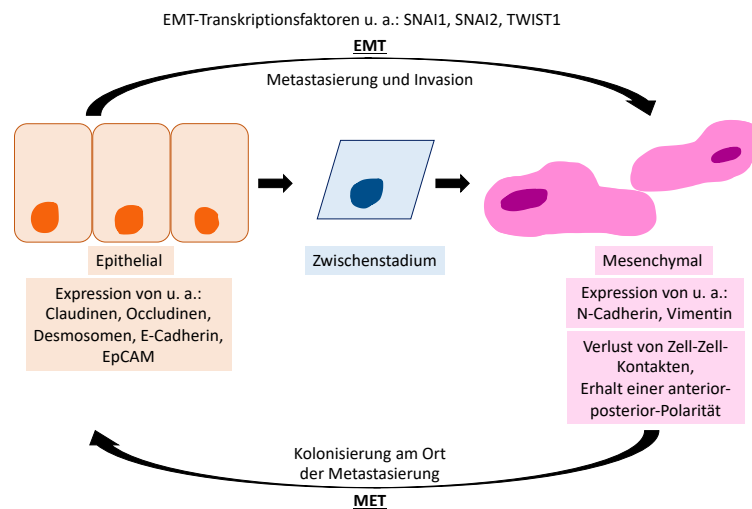


Abb. 1: Schematische Darstellung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und der mesenchymal-epithelialen Transition (MET)

Tumorzellen können sich durch die EMT vom Primärtumor lösen und anschließend metastasieren. Dabei verlieren sie ihre epithelialen Eigenschaften wie die Expression von *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM). Die EMT wird induziert durch Transkriptionsfaktoren wie *Snail Family Transcriptional Repressor* (SNAI) 1, SNAI2 und *Twist Family bHLH Transcription Factor* 1 (TWIST1). Über Zwischenstadien erlangen die Tumorzellen mit der Zeit mesenchymale Eigenschaften. Am Ort der Metastasierung können sich die Tumorzellen durch die MET niederlassen und Metastasen bilden. Durch die MET erlangen die Tumorzellen wieder epitheliale Eigenschaften. (inspiriert durch Dongre *et al.*, 2019 (47))

1.5 Liquid Biopsy

Zurzeit wird eine Tumorthherapie anhand der molekularen Charakterisierung von Tumorzellen des Primärtumors sowie von operativ erreichbaren Metastasen mittels Biopsien erstellt (49–51). Jedoch ist die traditionelle Gewebebiopsie mit einigen Nachteilen verbunden. Zum einen ist die Gewinnung von Tumorzellen durch Gewebebiopsien invasiv und geht mit eventuellen Komplikationen einher (52). Zum anderen sind Gewebebiopsien nicht immer durchführbar (52). Limitierende Faktoren sind u. a. eine Unerreichbarkeit von Tumorzellen (49), ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten sowie der zeitliche und ökonomische Aufwand (53). Ein weiterer Nachteil einer Gewebebiopsie umfasst die mangelnde Reproduzierbarkeit (53), da Gewebebiopsien nicht immer wiederholbar sind (52). Zudem gibt eine Gewebebiopsie allein das genomische Profil des Tumors zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder (52). Die durch selektiven Druck durch Therapien sowie durch Metastasierung entstehende dynamische Veränderung des Tumorgenoms kann durch eine Gewebebiopsie nicht erfasst werden (52). Somit wird mittels einer Gewebebiopsie weder die vollständige Heterogenität aller Tumorzellen dargestellt noch werden metastasierte Tumorzellen mit anderen phänotypischen Eigenschaften und Genexpressionsprofilen erfasst (50). Die Diversität von malignen Tumorzellen

innerhalb eines Tumors beeinträchtigt die Erfolgchancen einer Tumorthherapie (42). Vom Primärtumor sich unterscheidende Tumorzellen werden mit Therapien, welche sich gegen den Primärtumor richten, nicht erreicht (51).

Die *Liquid Biopsy*, eine Analyse von CTCs oder zellfreier *Circulating Tumor DNA* (ctDNA) im Blut mittels Blutabnahme, ist eine wenig invasive Methode zur Echtzeit-Überwachung einer Tumorerkrankung (49,50). In Abbildung 2 wird das Prinzip einer *Liquid Biopsy* schematisch dargestellt. Die CTCs können sowohl vom Primärtumor (50) als auch von Metastasen oder Rezidivherden stammen (54). Mittels peripherer Blutabnahme werden die CTCs sowie ctDNA gewonnen und im Anschluss analysiert (55). Mithilfe der *Liquid Biopsy* und CTC-Analyse kann dann eine zielgerichtete personalisierte Therapie gefunden werden (52,55). Im Gegensatz zur Gewebebiopsie ist die *Liquid Biopsy* auch bei nicht biopsierbaren Tumoren durchführbar (51). Zudem ermöglicht die CTC-Analyse mittels immunchemischer und molekularer Methoden eine frühe Tumorzelldissemination zu detektieren, welche mit hochauflösenden Bildgebungsverfahren nicht diagnostizierbar wäre (56).

Somit ist die CTC-Analyse im Rahmen einer *Liquid Biopsy* von großer Bedeutung für die personalisierte Medizin (50) mit dem Ziel der Vermeidung von Therapieresistenzen und der Abnahme der Krebsmortalität (56).

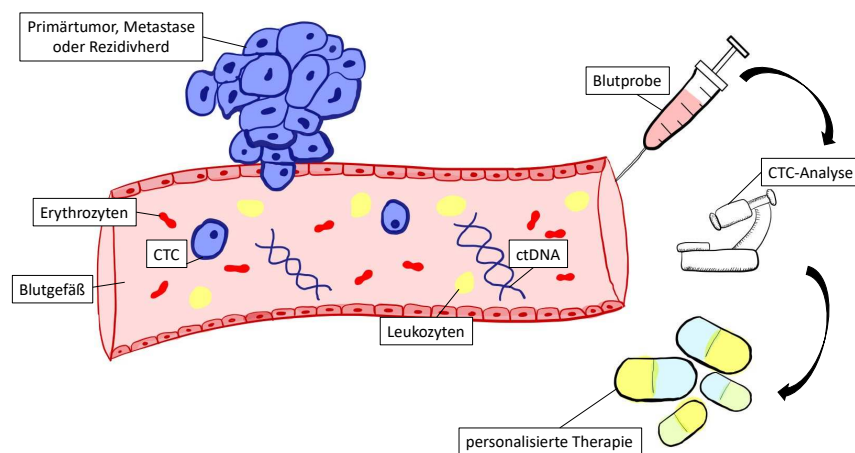


Abb. 2: Schematische Darstellung einer *Liquid Biopsy*

Nach dem Ablösen von Tumorzellen vom Primärtumor, von einer Metastase oder von einem Rezidivherd treten diese in das Blutgefäßsystem ein und stellen zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) dar. Im Blutsystem vorkommende CTCs sowie zellfreie zirkulierende Tumor DNA (ctDNA) werden mittels einer peripheren Blutabnahme gewonnen. Im Anschluss wird diese analysiert, um eine patientenspezifische Therapie zu finden. (inspiriert durch Alix-Panabières *et al.*, 2017 (55))

1.6 CTCs

1.6.1 Charakteristika und Detektion von CTCs

CTCs treten im Blutsystem sowohl als einzelne Zellen als auch in Zellverbänden auf (57). Die CTCs weisen bestimmte Charakteristika auf. Zu diesen gehören eine Resistenz gegen Anoikis, die Fähigkeit der Intravasation und Invasion, eine Heterogenität des Genoms und Phänotyps sowie ein Potenzial zur Initiierung der Metastasierung (58).

Tumorzellen haben in Blutgefäßen nur eine kurze Überlebensdauer mit einer Halbwertszeit von etwa 1 bis 2,5 Stunden (51). Nur wenige CTCs können den Scherstress in Gefäßen sowie das Immunsystem überwinden, extravasieren und Metastasen bilden (57). CTCs sind somit sehr selten und liegen nur in niedrigen Konzentrationen, v. a. zu Krankheitsbeginn, im Blut vor (58). In einem Blutvolumen von 10 ml können etwa eine bis zehn CTCs gefunden werden (58). Das Vorkommen von CTCs im Blut ist verbunden mit einer schlechteren Prognose (54) sowie einer gesteigerten Metastasierungsfähigkeit (44). Aufgrund der prognostischen Relevanz von CTCs wurden diese 2010 in die TNM-Klassifikation als klinisches Stadium ohne Fernmetastasen mit CTCs $cM_0(i+)$ aufgenommen (49). Bei einem $cM_0(i+)$ -Stadium liegen klinisch keine Zeichen für Metastasen vor, jedoch wurden Tumorzellen im Blut, Knochenmark oder in Lymphknoten detektiert (58). Die CTC-Analyse stellt eine wichtige Methode für das Verständnis der Krebsbiologie, Metastasierung sowie für die Entwicklung von Therapieplänen dar (59). Durch das Vorkommen von CTCs bereits bei prä- und nicht-malignen Läsionen besteht die Möglichkeit eine Tumorerkrankung bereits im frühen Krankheitsstadium, vor einer Metastasierung, zu diagnostizieren (44,60).

Um die Detektion von CTCs im Blut zu erleichtern, werden diese zunächst angereichert und die CTC-Konzentration so um mehrere Logarithmus-Einheiten gesteigert (58). Die Anreicherungsverfahren basieren auf physiologischen Eigenschaften von CTCs, wie der Dichte oder Größe, sowie auf biologischen Charakteristika, wie Oberflächenproteinen (50). Beispiele für Anreicherungsverfahren sind zum einen Membranfiltersysteme, welche jedoch aufgrund der variablen CTC-Größe (56) von 4 bis 30 μm (50) limitiert sind. Zum anderen stellt die positive und negative Selektion eine CTC-Anreicherungsverfahren dar (56). Für die positive Selektion werden Antikörper gegen tumorassoziierte-Antigene, wie EpCAM, verwendet (50). Für die negative Selektion hingegen werden Antikörper gegen typische Leukozyten-Antigene, wie z. B. *Cluster of Differentiation* (CD) 45, eingesetzt (50). Nach der CTC-Anreicherung werden diese identifiziert und auf genomischer, transkriptomischer sowie proteomischer Ebene analysiert (61).

Das *CellSearch*-System bildet dabei den derzeitigen Goldstandard zur Detektion von CTCs (50). Es ist die einzige CTC-Detektionsmethode, die für den klinischen Gebrauch von der *U.S. Food and*

Drug Administration (FDA) (54) für metastasierten Brust-, Colon- und Prostatakrebs zugelassen ist (56). Im *CellSearch*-System werden EpCAM-positive Tumorzellen mittels an magnetische Ferrofluide gebundene Anti-EpCAM-Antikörper von anderen Zellen aus dem Blut magnetisch getrennt (62). Zudem werden die Zellen mittels fluoreszierender Antikörper gegen die Zytokine 8,18 und 19 markiert und 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zur Färbung des Nukleus verwendet (62). Zusätzlich wird ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen CD45 zur Identifikation von Leukozyten in der Blutprobe eingesetzt (62). CTCs werden im *CellSearch*-System als EpCAM-positiv, Cytokeratin-positiv, CD45-negativ und DAPI-positiv definiert (50). Anschließend werden sie mit einem Fluoreszenzmikroskop gezählt (63). Das Auffinden von fünf oder mehr CTCs in einer 7,5 ml Blutprobe mittels *CellSearch* hat einen prognostischen Wert für ein geringeres progressionsfreies Überleben bei metastasiertem MaCa (64).

Das für den *CellSearch* verwendete EpCAM-Molekül ist ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül, welches als transmembranes Glykoprotein hauptsächlich für die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten verantwortlich ist, aber auch an anderen biologischen Prozessen, wie etwa der Zellproliferation, beteiligt ist (65). Dabei ist die Expression von EpCAM auf Epithelzellen beschränkt und wird von den meisten Tumorgeweben überexprimiert (65). EpCAM wird daher als diagnostischer Marker zur Detektion sowie Charakterisierung von Karzinomzellen aus dem Blut verwendet (65).

Ein Nachteil des *CellSearch*-Systems besteht in der Abhängigkeit von der EpCAM-Expression auf CTCs. Die Expression von epithelialen Oberflächenmarkern wie EpCAM, kann durch die EMT vermindert werden (51). Dies führt zu einem Verlust von detektierbaren CTCs durch das *CellSearch*-System, da EpCAM-negative CTCs nicht erfasst werden (66). Demzufolge werden nicht alle CTCs durch EpCAM-basierte Methoden detektiert (48). Die eventuell aggressivsten CTC-Typen werden somit nicht erfasst (50). Das Ziel ist es weitere Methoden zur CTC-Anreicherung und Detektion zu finden, welche auch EpCAM-negative CTCs nach der EMT detektieren (50) und so CTCs mit einer hohen Spezifität sowie Sensitivität identifizieren (44).

1.6.2 CTCs und Brustkrebs

Sowohl in Frühstadien eines nicht-metastasierten MaCas (67) als auch nach einer Metastasierung können CTCs im Blut von MaCa-Patienten detektiert werden (54). Das Auffinden von CTCs beim metastasiertem MaCa hat hierbei, unabhängig von der Detektionsmethode und dem Zeitpunkt der Blutabnahme, einen prognostischen Wert (54,56). Dabei scheint das CTC-Vorkommen ein besser geeigneter prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben bei metastasiertem MaCa zu sein, als bisherige radiologische Bildgebungsverfahren (68).

Janni *et al.* (69) haben die prognostische Relevanz der CTC-Anzahl bei 4.436 Patienten mit metastasiertem MaCa mithilfe des *CellSearch*-Systems betrachtet. Es wurde die CTC-Anzahl zu Studienbeginn sowie 28 Tage nach Start einer neuen Therapie untersucht (69). Hierbei wurde deutlich, dass die CTC-Anzahl, unabhängig vom Tumorsubtyp, dem CTC-*Cutoff*-Wert (≥ 1 CTC oder ≥ 5 CTCs) und der Therapieart (Chemo- vs. endokriner Therapie), mit dem Gesamtüberleben korreliert (69). Patienten, bei denen zu Studienbeginn CTCs nachweisbar waren und bei denen die CTC-Anzahl zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung unter dem *Cutoff*-Wert lag, hatten ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben und eine 50 % niedrigere Todesrate als Patienten mit einer CTC-Anzahl über dem *Cutoff*-Wert bei der Folgeuntersuchung (69). Die Arbeit von Janni *et al.* (69) zeigt die Relevanz der CTC-Anzahl zur Echtzeitüberwachung von Therapieansprechen und Prognosebeurteilung bei metastasiertem MaCa. Des Weiteren kann neben der CTC-Anzahl auch die CTC-Analyse wichtige Informationen für die Behandlung des metastasierten MaCas im Hinblick auf die Tumorheterogenität und Therapiemöglichkeiten liefern (69).

1.7 Variant Surface Antigen 2 Chondroitin Sulfate A (VAR2CSA)

1.7.1 Charakteristika von VAR2CSA

Eine Alternative zur CTC-Detektion mittels des *CellSearch*-Systems kann das *Variant Surface Antigen 2 Chondroitin Sulfate A* (VAR2CSA) darstellen (70). VAR2CSA ist ein Adhäsionsprotein, welches durch eine Infektion mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* auf der Oberfläche von Erythrozyten exprimiert wird (71). Durch die Expression von VAR2CSA binden die Erythrozyten spezifisch an plazentare Zellen und umgehen somit dem Erythrozyten-Abbau in der Milz (71). Dabei bindet VAR2CSA spezifisch an Synzythiotrophoblastenzellen und nicht an anderweitige Körperzellen (71–73). Genau genommen bindet VAR2CSA an das 4-O sulfatierte spezifische Chondroitinsulfat (CS) A (71,74). Die CSA-Bindungsdomäne von VAR2CSA bindet CS mit einer hohen Affinität und Spezifität und liegt in der N-terminalen *Duffy Binding Ligand-like* (DBL) 2X-Domäne sowie in Teilen der angrenzenden Interdomänen (ID) (71,75).

Die gleiche CS-Modifikation wie auf plazentaren Zellen ist auch auf den meisten malignen Tumorzellen mesenchymalen, epithelialen sowie hämatopoetischen Ursprungs zu finden (71). Salanti *et al.* (71) haben eine spezifische Bindung der CS-Modifikation auf Plazenta- und Tumorzellen, auch oncofetales Chondroitinsulfat (ofCS) genannt, durch das rekombinante VAR2CSA Protein (rVAR2) nachgewiesen. Nicht-Krebszellen, außer Plazentazellen, wurden nur in geringem Maße von rVAR2 gebunden (71,76). Das rVAR2-Protein besteht dabei aus der minimalen CSA-Bindungsregion DBL1X, ID1, DBL2X und ID2a von VAR2CSA (77).

Die Expression von ofCS auf Plazenta- und Tumorzellen legt nahe, dass ofCS eine relevante Rolle für die Zelleigenschaften von embryonalen und Karzinomzellen spielt (76). Zu diesen gemeinsamen Zelleigenschaften zählen eine schnelle Zellproliferation, Migrations- und Invasionsfähigkeit (76). Des Weiteren bestehen auch Gemeinsamkeiten zwischen Plazenta- und Tumorzellen in beteiligten Proto-Onkogenen, wie *Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase-1*, *-2*, sowie bei Wachstumsfaktoren, wie *Placental Growth Factor* (PlGF) und *Insulin-like Growth Factor-2* (78).

1.7.2 Proteoglykane

Ein CS ist ein Glycosaminoglycan (GAG) (76). Es besteht aus langen Ketten sich wiederholender Disaccharid-Einheiten aus N-Acetyl-D-Galactosamin und Glucuronsäure (71,72). CSs stellen eine sekundäre Modifikation von mehr als 30 verschiedenen Chondroitinsulfat-Proteoglykanen (CSPG) dar, welche auf der Zelloberfläche, Zellmembran oder der Extrazellulärenmatrix exprimiert werden (71,76) und auf Primärtumorzellen sowie auf CTCs oft überexprimiert sind (76).

Proteoglykane bestehen aus zwei Bestandteilen, einem Proteinkern sowie einer unverzweigten Polysaccharid-Kette (79). Neben der Beteiligung an der Embryogenese dienen Proteoglykane auch als Co-Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie *Fibroblast Growth Factor* (FGF) oder TGF- β (79). Durch die Interaktion mit Wachstumsfaktoren über den Proteinkern oder der GAG-Kette können sie das Zellwachstum beeinflussen (44). Proteoglykane haben über verschiedene Mechanismen, wie z. B. das Modifizieren von Enzymen, zudem einen relevanten Einfluss auf das Tumorwachstum sowie die Tumormetastasierung (44). Je nach Tumorart besteht eine große Variabilität in den beteiligten Proteoglykanen sowie deren Funktion im Metastasierungsprozess. (44) Proteoglykane spielen dabei eine Rolle bei der Proliferation von Tumorzellen, der Tumorangio-genese, der EMT, der Intra- und Extravasation sowie bei der Metastasenbildung (44).

Proteoglykane, welche das Tumorwachstum fördern, sind beispielsweise CSPG4 und Glypican (GPC) 3 (44). GPC3 spielt insbesondere eine Rolle beim Hepatozellulären Karzinom und steigert über dessen Überexpression die Zellproliferation von hepatozellulären Karzinomzellen über den Wnt-Signalweg (44). CSPG4 besitzt eine wachstumsfördernde Wirkung bei verschiedenen Krebsarten (44), wie dem Glioblastom und dem Melanom (80). Durch die zytoplasmatische Domäne und Ektodomäne ist CSPG4 in der Wachstumssignalkaskade beteiligt und verstärkt über die Bindung von Wachstumsfaktoren die *Mitogen-activated Protein Kinase* (44). Neben einem wachstumsfördernden Einfluss können Proteoglykane jedoch auch einen negativen Einfluss auf das Tumorwachstum haben. Ein Beispiel ist Decorin, welches die Zellproliferation über das Internalisieren sowie den Abbau von Wachstumsfaktorrezeptoren inhibiert (44). Santra *et al.* (81) haben eine Unterdrückung des Zellwachstums durch die *de novo*-Expression von Decorin in MaCa-Zelllinien festgestellt.

Neben dem Einfluss von Proteoglykanen auf das Tumorzellwachstum spielen diese eine Rolle bei der Tumorangiogenese. Proteoglykane interagieren mit Liganden und Rezeptoren, wie dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), welche an der Neovaskularisation beteiligt sind (44,82). Ein Beispiel für ein pro-angiogenetisches Proteoglykan ist Perlecan, welches einen positiven Einfluss auf den VEGF-A/VEGF-Rezeptor-2 Signalweg hat (82).

Des Weiteren sind Proteoglykane an der EMT, bei der Regulation von Adhäsion und Migration von Tumorzellen beteiligt. Beispielsweise führt eine verminderte Expression einiger Proteoglykane zu einer erleichterten Adhäsion an die Basalmembran und somit zu einer Invasion von Tumorzellen in umliegende Strukturen. (44) Zudem haben Proteoglykane einen Einfluss auf die EMT-Transkriptionsfaktoren. Beispielsweise führt Syndecan (SDC) 4 zu einer verstärkten SNAIL-Expression und hierdurch zu einer verstärkten TGF- β 1-induzierten EMT in Lungenadenokarzinom-Zellen (83). Ferner fördern Proteoglykane das Überleben von CTCs im Blutgefäßsystem (44). Beispielsweise führen SDC4 und CD44 zu einer erhöhten CTC-Resistenz gegenüber der Anoikis (44).

Demzufolge haben Proteoglykane über verschiedene Mechanismen einen Einfluss auf die Tumorbilogie und die Entstehung von Metastasen. Dabei steht v. a. eine erhöhte Expression und Modulation von CS in Verbindung mit der Progression einer Krebserkrankung (72). Insbesondere die ofCS-Modifikation von CSPGs ist durch Integrin-vermittelte Signalkaskaden essenziell für die Motilität sowie das metastatische Potenzial von Tumorzellen (76). Eine vermehrte Expression von ofCS ist ein unabhängiger Prognosemarker für eine verminderte krankheitsfreie Überlebensrate in Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (84).

Derzeit existieren nur wenige Studien, welche die Modulation von Proteoglykanen thematisieren. Die Proteoglykan-Modifikation kann eine alternative Methode zur Identifikation sowie Anreicherung von CTCs darstellen (44).

1.7.3 Die Bindung von rVAR2 an ofCS verschiedener Proteoglykane in unterschiedlichen Tumoridentitäten

Etwa 90 % der MaCas, ca. 80 % der Melanome und ca. 92 % der Blasenkarzinome exprimieren CSPGs mit einer ofCS-Modifikation (85). Dabei kann ofCS abhängig von der Tumorart (71) an verschiedene CSPGs gebunden sein und ist unabhängig von der Expression eines bestimmten Proteins (76). Das rVAR2-Protein bindet daher je nach Tumoridentität an unterschiedliche CSPGs (71). Im Folgenden sind einige Beispiele für ofCS-modifizierte CSPGs in verschiedenen Tumorarten genannt, welche durch rVAR2 gebunden werden.

Clausen *et al.* (86) haben mithilfe eines rVAR2-basierten *Pulldowns* und anschließender Massenspektrometrie insgesamt 24 ofCS-modifizierte CSPGs in fünf Zelllinien unterschiedlicher Tumorarten identifiziert. Zu den fünf Tumorzellarten gehören: Melanom-, T-Zell-Lymphom-, Prostatakarzinom-, Osteosarkom- und Rhabdomyosarkom-Zellen (86). Dabei wurden einige CSPGs von Zelllinien unterschiedlicher Tumoridentität exprimiert (86). Die 24 ofCS-modifizierten CSPGs umfassen folgende CSPGs: CSPG4, *Amyloid like-Protein 2* (APLP2), SDC1, SDC2, SDC3, SDC4, CD44, Integrin beta-1, GPC1, GPC2, GPC4, GPC6, *Sushi Repeat-Containing Protein X-Linked* (SRPX), SRPX2, Neuropilin (NRP) 1, NRP2, Endorepellin, Delta-Sarcoglykan, Agrin (AGRN), *HLA class II Histocompatibility Antigen gamma Chain*, *Laminin Subunit Alpha 4*, CD47, Testican-1 sowie Serglycin (86).

Bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen haben Oo *et al.* (84) mittels rVAR2-*Pulldown* und Massenspektrometrie einige ofCS-modifizierte CSPGs identifiziert. Zu diesen zählen u. a.: SDC1, SDC4, CD44, NRP1, Versican, APLP2 sowie *Laminin Subunit Beta 1* (LAMB1) (84).

Des Weiteren haben Clausen *et al.* (87) ofCS-modifizierte Proteoglykane bei Patienten mit Blasenkrebs untersucht. Hierfür wurden ofCS-modifizierte CSPGs im Urin von Patienten mit Blasenkrebs durch Verwendung einer kationischen Nitrocellulosemembran immobilisiert (87). Nachfolgend wurde diese mithilfe eines *Dot-Blot-Assays* und rVAR2 auf den ofCS-Gehalt untersucht (87). Die Menge der im Urin vorhandenen CSPGs korrelierte dabei mit der Aggressivität sowie Größe des Blasenkrebs, auch nach Tumoresektion (87). Zudem konnten Seiler *et al.* (88) mittels Massenspektrometrie und anschließendem *Proximity-Ligation Assay* (PLA) SDC1 sowie CSPG4 als ofCS-modifizierte Proteoglykane bei Blasenkrebszellen identifizieren.

Auch bei Tumoren des ZNS spielen ofCS-modifizierte CSPGs eine Rolle. Bang-Christensen *et al.* (72) haben die Interaktion von rVAR2 mit ofCS-modifizierten Proteoglykanen auf drei Gliomazelllinien mithilfe eines rVAR2-basierten *Pulldowns* sowie einer Massenspektrometrie analysiert. Dabei konnten u. a. APLP2, CD44, NRP1, GPC1 und SDC1 als ofCS-modifizierte Proteoglykane identifiziert werden (72). Die Ergebnisse wurden anschließend mittels PLA validiert, in der eine starke Co-Lokalisation von rVAR2 mit CD44 und CSPG4 beobachtet werden konnte (72).

Agerbæk *et al.* (76) haben die Bindung von rVAR2 an epitheliale sowie mesenchymale Krebszellen, unabhängig von der phänotypischen Plastizität und Expression epithelialer Marker wie EpCAM, nachgewiesen. Das rVAR2-Protein bindet an EpCAM-positive und EpCAM-negative mesenchymale Tumorzellen vor und nach EMT oder MET, was den CTC-Ertrag im Vergleich zu bisherigen EpCAM-basierten CTC-Detektionsmethoden erhöht (76). Aufgrund der unabhängigen Bindung von rVAR2 an ofCS, stellt rVAR2 eine effiziente und spezifische Methode dar, um CTCs im Blut

zu detektieren und zu binden (76). Aufgrund der hohen Sensitivität der rVAR2-Bindung an Tumorzellen könnte die Therapie-, die Risikoüberwachung und die Stadieneinteilung einer Krebserkrankung anhand der CTC-Anzahl verbessert werden (76). Des Weiteren kann rVAR2 möglicherweise zur gezielten Krebstherapie als Transportvehikel für Krebsmedikamente dienen, was eine spezifische Bindung von Tumorzellen erlaubt und somit keine Nebeneffekte auf normale Zellen hat (71,77).

Das rVAR2-Protein bindet an unterschiedliche ofCS-modifizierte Proteoglykane auf verschiedenen Tumorzellen. Bisher thematisieren jedoch keine Arbeiten die Identifikation von ofCS-modifizierten Proteoglykanen auf MaCa-Zellen, welche durch rVAR2 gebunden werden.

1.8 Ziele der Arbeit

Das Kernthema dieser Doktorarbeit ist die Charakterisierung von Proteoglykanen, welche bei der rVAR2-basierten Anreicherung von Brustkrebszellen als Zielstruktur dienen.

Die Ziele dieser Doktorarbeit sind:

- a) Der Nachweis von ofCS-modifizierten Proteoglykanen, die von rVAR2 gebunden werden und die rVAR2-basierte Anreicherung vermitteln.
- b) Der Vergleich der von rVAR2 gebundenen Proteoglykanen auf Zellen verschiedener Brustkrebszelllinien, die verschiedene Brustkrebssubtypen repräsentieren.
- c) Die Identifikation von bislang unbekannten Proteoglykanen, deren ofCS-Struktur von rVAR2 erkannt wird (durch Vergleich der erhaltenen Daten mit in der Literatur publizierten Zielproteinen von rVAR2).

Anhand der Ziele der vorliegenden Arbeit lässt sich das Forschungsvorhaben in drei Abschnitte unterteilen:

- 1) Optimierung der Präzipitation von Zielproteinen von rVAR2,
- 2) Etablierung von Kontrollen und
- 3) Massenspektrometrie-basierte Identifikation von rVAR2-Zielproteinen auf MaCa-Zelllinien.

Zu 1) Optimierung der Präzipitation von Zielproteinen von rVAR2:

Zur Präzipitation von Zielproteinen wird rVAR2 auf magnetischen *Beads* immobilisiert. Anhand des bekannten rVAR2-Zielproteins NRP1 auf MDA-MB-231 und MDA-MB-436 Zellen soll zunächst die rVAR2-basierte Präzipitation optimiert werden. Die Menge des präzipitierten Proteins wird dabei mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western Blot-Analyse bestimmt. Zur

Optimierung werden unterschiedliche rVAR2-Konzentrationen getestet. Als Kontrolle für unspezifisch gebundene Proteine wird das zelluläre Strukturprotein β -Aktin verwendet.

Zu 2) Etablierung von Kontrollen:

Bei der angestrebten Massenspektrometrie-Analyse ist es von entscheidender Bedeutung, dass die richtigen Kontrollen verwendet werden. Zum einen wird ein rVAR2-Protein genutzt, welches eine Mutation in der ofCS-Bindedomäne aufweist. Diese Mutation führt dazu, dass dieses rVAR2 nicht in der Lage ist an ofCS zu binden. Proteine, an die rVAR2 trotz der Mutation bindet, würden somit unspezifisch gebunden werden. Zum anderen wird als Kontrolle das Chondroitinase ABC Enzym verwendet. Dabei handelt es sich um ein Enzym aus dem Bakterium *Proteus vulgaris*, das bei einem pH-Wert von 8,0 spezifisch CS degradiert. Dies führt dazu, dass rVAR2 an die entsprechenden Proteoglykane nicht mehr binden kann.

Zu 3) Massenspektrometrie-basierte Identifikation von rVAR2-Zielproteinen auf MaCa-Zelllinien:

Im dritten Teil sollen weitere Zielproteine von rVAR2 mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Das bereits bekannte rVAR2-Zielprotein NRP1 dient dabei als Positivkontrolle. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Proteoglykane an deren ofCS-Modifikation rVAR2 bindet, sowohl quantitativ als auch qualitativ zwischen Brustkrebszellen des luminalen und triple-negativen Subtyps unterscheiden. Aus diesem Grund soll die Analyse für die triple-negativen MaCa-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 und der luminalen MaCa-Zelllinie MCF-7 durchgeführt werden. Die detektierten potenziellen rVAR2-Zielproteine sollen anschließend mittels Western Blot-Analyse validiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Mammakarzinom-Zelllinien

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien

Zelllinie	Subtyp, Merkmale	Bezugsquelle
MDA-MB-231	Triple-negativ, epithelial	ATCC, Vereinigte Staaten
MDA-MB-436	Triple-negativ, epithelial	ATCC, Vereinigte Staaten
MCF-7	Luminal A, epithelial	ATCC, Vereinigte Staaten

Alle aufgelisteten Mammakarzinom-Zelllinien wurden von der Firma *American Type Culture Collection* (ATCC) erhalten. Die Zelllinien wurden mittels *Short Tandem Repeat*-Analyse verifiziert und kultivierte Zellen wurden regelmäßig negativ auf eine *Mycoplasma*-Infektion getestet.

2.1.2 Zellkultur

Tabelle 2: Liste der in der Zellkultur verwendeten Materialien

Material	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)-Medium 1640 (1x) + L-Glutamin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS) (1x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
0,5 % Trypsin-Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) (10x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zelldissoziationspuffer, enzymfrei, <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)-basiert	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-Aldrich/ MERCK, D2650, Darmstadt, Deutschland

FCS = fetales Kälberserum, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute*, DPBS = *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, EDTA = *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*, PBS = *Phosphate Buffered Saline*, DMSO = Dimethylsulfoxid.

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
T-75 Kulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
T-175 Kulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (Filter): 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab Group, Hamburg, Deutschland
Röhrchen: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
<i>Protein LoBind Tubes</i> 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterile Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated, Corning, Vereinigte Staaten
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten

2.1.4 Laborgeräte

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Material	Hersteller
Vortex-Mixer	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
Elektronische Pipette	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Tischzentrifuge Ministar	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
Mikroskop Leica DM IRB	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tecan SPARK <i>Multimode-Mikroplatten-Reader</i> , Programm: Sparkcontrol, BCA_Andrea	Tecan, Männedorf, Schweiz

Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Heracell 150i CO ₂ <i>Incubator</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Inkubationsschüttler	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
Laborschüttler Swip	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
<i>ChemiDoc™ MP Imaging System</i> Programm: <i>Image Lab Software 5.0</i>	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
Rotator SB3	Stuart, Vereinigtes Königreich
Mini Ofen mit Rotator	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
pH-Meter pH1000 H	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten

2.1.5 rVAR2

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Chargen und Sequenzen von rVAR2 und *SpyCatcher*

Material	Bezugsquelle
Wildtyp rekombinantes <i>Variant Surface Antigen 2</i> (rVAR2 ^{wt}), 121 Kilodalton MP4484, MP4996 Die Sequenz ist dem Anhang 6.1.1 zu entnehmen.	Mette Ø. Agerbæk, Zentrum für Medizinische Parasitologie der Abteilung für Immunologie und Mikrobiologie, Fakultät für Gesundheits- und Medizinwissenschaften, Universität Kopenhagen, Dänemark, Hersteller: Var2 Pharmaceuticals ApS, Kopenhagen, Dänemark
Mutiertes rekombinantes <i>Variant Surface Antigen 2</i> (rVAR2 ^{mut}), 121 Kilodalton MP4073, MP4649 Die Sequenz ist dem Anhang 6.1.2 zu entnehmen.	Mette Ø. Agerbæk, Zentrum für Medizinische Parasitologie der Abteilung für Immunologie und Mikrobiologie, Fakultät für Gesundheits- und Medizinwissenschaften, Universität Kopenhagen, Dänemark, Hersteller: Var2 Pharmaceuticals ApS, Kopenhagen, Dänemark
<i>SpyCatcher</i> , 13 Kilodalton MP4487, MP4980	Mette Ø. Agerbæk, Zentrum für Medizinische Parasitologie der Abteilung für Immunologie und Mikrobiologie, Fakultät für Gesundheits- und

	Medizinwissenschaften, Universität Kopenhagen Dänemark, Hersteller: Var2 Pharmaceuticals ApS, Kopenhagen, Dänemark
--	--

rVAR2^{wt} = Wildtyp rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*, rVAR2^{mut} = mutiertes rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*.

2.1.6 Western Blot-Analyse

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Materialien für die Western Blot-Analyse

Material	Hersteller
<i>Precision Plus Protein All Blue Standards</i>	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
<i>Mini-PROTEAN TGX Stain-Free™ Precast Gels, Any kDTM, 10-/ 12-/ 15-well comb</i>	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
<i>Immun-Blot LF PVDF Membrane and Filter Papers, 7.0 x 8.5 Zentimeter, Set of 20, 0.45 µm Porengröße</i>	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
96 Well Zellkulturplatte, steril, F-Bottom, mit Deckel	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
<i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
<i>Dynabeads™ Biotin Binder</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
<i>Dynal Magnetic Particle Concentrator-S</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
<i>Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
<i>ECL™ Western Blotting Detection Reagents</i>	Cytiva Amersham, Marlborough, Vereinigte Staaten
<i>Mini Trans-Blot Cell</i>	Bio-Rad, Hercules, Vereinigte Staaten
Einmal-Wischtücher, KIMTECH Science	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
Methanol	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten

Chondroitinase ABC Enzym	SIGMA-Aldrich/MERCK, C2905, Darmstadt, Deutschland
--------------------------	---

PVDF = Polyvinylidenfluorid.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
Primärantikörper	
Anti-Neuropilin 1-Antikörper	Abcam ab8132, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-CD44-Antikörper	SIGMA-Aldrich/ MERCK, HPA005785, Darmstadt, Deutschland
Anti-CD44-Antikörper	Abcam ab243894, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Lamc1-Antikörper	Abcam ab233389, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-V5-FITC-Antikörper	ThermoFisher Scientific, 92008, Waltham, Vereinigte Staaten
Anti- β -Aktin-Antikörper, <i>Mouse Monoclonal Immunoglobulin G</i>	Santa Cruz Biotechnology, sc-47778, Dallas, Vereinigte Staaten
Sekundärantikörper	
<i>Anti-Rabbit Immunglobulin G, HRP-linked Antibody</i>	Cell Signaling Technology, 7074, Danvers, Vereinigte Staaten
<i>Anti-Mouse Immunglobulin G, HRP-linked Antibody</i>	Cell Signaling Technology, 7076, Danvers, Vereinigte Staaten

CD = *Cluster of Differentiation*, Lamc1 = *Laminin Subunit Gamma 1*.

Tabelle 8: Übersicht über weitere Materialien für den Western Blot

Komponenten für Chondroitinase Puffer (20 ml) → pH-Wert 8,0 einstellen	
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</i>	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Fetales Kälberserum	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Natriumacetat (wasserfrei)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Komponenten für 5% BSA-Tris-Buffered Saline with Tween20 (TBST)	
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich/ MERCK, Darmstadt, Deutschland

1x <i>Tris-Buffered Saline with Tween20</i> (TBST)	
Komponenten für 1M Dithiothreitol (DTT)	
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Destilliertes Wasser	
Komponenten für 10x <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS)-Puffer → pH-Wert 8,3 einstellen	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich/ MERCK, Darmstadt, Deutschland
Glycin	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
Natriumdodecylsulfat	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Komponenten für 1x SDS-Puffer	
10x <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> -Puffer	
Destilliertes Wasser	
Komponenten für <i>Western Blotting</i> Puffer	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich/ MERCK, Darmstadt, Deutschland
Glycin	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
Methanol	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
Komponenten für 10x <i>Tris-Buffered Saline</i> (TBS) → pH-Wert 7,6 einstellen	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich/ MERCK, Darmstadt, Deutschland
Natrium Chlorid	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
Komponenten für 1x <i>Tris-Buffered Saline with Tween20</i> (TBST)	
10x <i>Tris-Buffered Saline</i> (TBS)	
Destilliertes Wasser	
Tween20	Sigma-Aldrich/ MERCK, Darmstadt, Deutschland
Komponenten für nicht-denaturierenden Lysepuffer → pH-Wert 8,0 einstellen	
<i>Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, PhosSTOP, EASY-pack</i>	Roche, Basel, Schweiz

<i>Protease Inhibitor Cocktail Tablets, cOmplete Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack</i>	Roche, Basel, Schweiz
TrisHydrochlorid	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
Natrium Chlorid	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten
<i>Nonidet P 40 Substitute</i>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Vereinigte Staaten
<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> (EDTA)	Sigma-Aldrich/ MERCK, Darmstadt, Deutschland
Komponenten für PF10-Puffer	
<i>Pierce™ Protein-Free (PBS) Blocking Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Komponenten für Massenspektrometrie-Analyse-Elutionspuffer → pH-Wert 7,0 einstellen	
Glycerin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Vereinigte Staaten
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS)	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Vereinigte Staaten

DPBS = *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, TBST = *Tris-Buffered Saline with Tween20*, DTT = *Dithiothreitol*, SDS = *Sodium Dodecyl Sulfate*, TBS = *Tris-Buffered Saline*, EDTA = *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die gesamten Arbeiten mit Zellkulturen und Zellkulturmedien wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die humanen triple-negativen MaCa-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 sowie die luminalen MaCa-Zelllinie MCF-7 wurden in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-Medium kultiviert. Zum RPMI-Medium wurde 10 % fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt. Dieses enthält für die Zellkultivierung notwendige Wachstumsfaktoren sowie Proteine. Zudem wurde zum Medium 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt um Kontaminationen zu verhindern. Das Nährmedium wurde vor Gebrauch in einem Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C und einem Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Gehalt von 5 % im Inkubator in T-175 Flaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zelldichte wurde lichtmikroskopisch abgeschätzt.

Nach dem Erreichen einer Konfluenz erfolgte das Passagieren der Zellen. Zur Zellpassage wurde das vorhandene RPMI-Medium vorsichtig abgenommen. Die Zellen wurden dann mit 8 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gewaschen, um verbliebene Medium- sowie Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde 2 ml 1 % Trypsin-*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA) hinzugefügt und die Zellen für etwa 5 Minuten im Inkubator bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Mithilfe des Trypsins wurden die adhärennten MaCa-Zellen durch das enzymatische Spalten von oberflächlichen Proteinen von der Kulturflasche abgelöst, was als Trypsinisierung bezeichnet wird. Die Trypsinisierung wurde mithilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert und anschließend durch Zugabe des Kultivierungsmediums gestoppt. Ein Teil der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und das Kultivierungsmedium hinzugefügt, um ein Endvolumen von 25 ml in der T-175 Zellkulturflasche zu erreichen.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen vom Kulturflaschenboden mittels 1 % Trypsin-EDTA abgelöst und bei 11.000 rpm für 5 Minuten in einem 15 ml Röhrchen zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in dem Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium enthielt 50 % Zellkulturmedium, 40 % FCS sowie 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO wurde aufgrund seiner Toxizität zuletzt hinzugefügt. Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C für 24 Stunden in einem Mr. Frosty Gefrierbehälter mit Isopropanol eingefroren. Dies hat ein langsames Abkühlen der Zellen von ca. 1 °C pro Minute ermöglicht. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einem mit Flüssigstickstoff gefüllten Behälter gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die kryokonservierten Zellen zügig bei 37 °C in einem Wasserbad für etwa 2 Minuten erwärmt. Anschließend wurden die Zellen aus dem Kryoröhrchen in ein 15 ml-Röhrchen überführt und 9 ml Zellkulturmedium hinzugefügt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1.100 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Daraufhin wurde das Zellpellet in FCS-enthaltenem RPMI-Medium resuspendiert, in eine T-75 Zellkulturflasche überführt und auf ein Endvolumen von 12 ml mit RPMI-Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden im Anschluss bei 37 °C und 5 %igem CO₂ kultiviert.

2.2.2 Pulldown mit rVAR2

Zur Charakterisierung der von rVAR2 gebundenen ofCS-modifizierten Proteoglykane auf verschiedenen MaCa-Zelllinien wurden die Proben mit rVAR2, *SpyCatcher* (SpyC) sowie *Dynabeads*TM *Biotin Binder* (*Beads*) vorbereitet und ein *Pulldown* mit rVAR2 durchgeführt. In Abbildung 3 ist das Prinzip des *Pulldowns* mit rVAR2 dargestellt. Es wurden die triple-negativen MaCa-Zelllinien MDA-MB-436 und MDA-MB-231 sowie die luminale MaCa-Zelllinie MCF-7 verwendet.

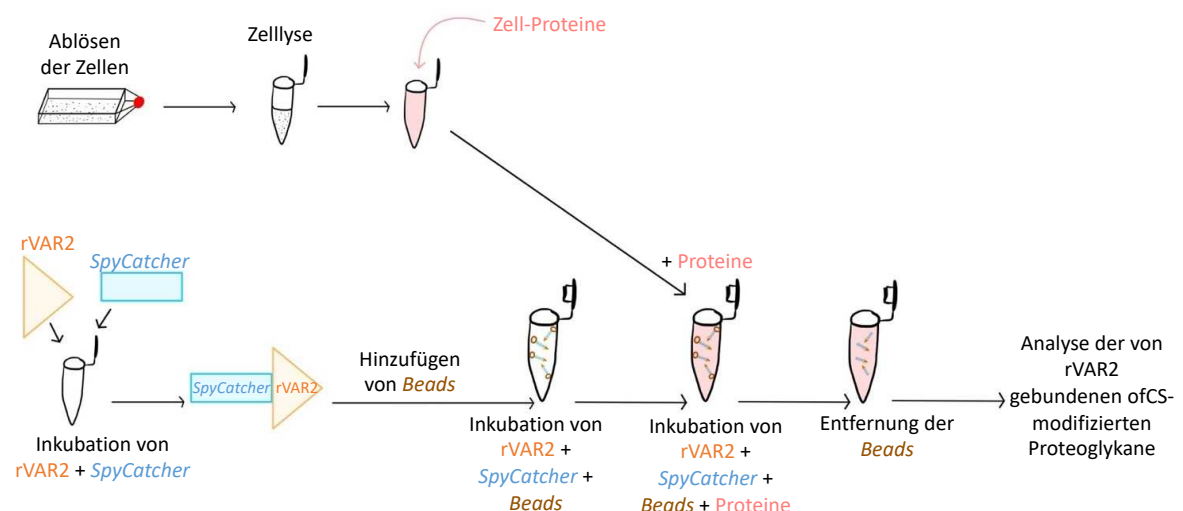


Abb. 3: Schematische Darstellung des Pulldowns mit rVAR2

Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturfantaschen wurden die Zellen lysiert. Zeitgleich wurde der *SpyCatcher* mit rVAR2 inkubiert und im Anschluss erfolgte die Hinzugabe der *Beads*. Anschließend wurden die Proteine mit rVAR2, *SpyCatcher* und *Beads* inkubiert. Nachfolgend wurden die *Beads* entfernt und eine Analyse der von rVAR2 gebundenen Proteoglykane mit oncofetaler-Chondroitinsulfat (ofCS)-Modifikation durchgeführt. rVAR2 = rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*.

2.2.2.1 Probenvorbereitung

Zunächst wurden die adhärenen MaCa-Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen bei einer Dichte von ca. 60 % bis 80 % gelöst. Dazu wurde das bisher in der Kulturfantasche befindliche Kultivierungsmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 8 ml DPBS gewaschen, um Medium- sowie Zellreste zu entfernen. Nachfolgend wurden 8 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS)-basierter, enzymfreier Zelldissoziationspuffer hinzugefügt und für etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den PBS-basierten, enzymfreien Zelldissoziationspuffer wurden die adhärenen MaCa-

Zellen sanft vom Flaschenboden abgelöst, ohne dabei oberflächliche Proteine zu beschädigen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen transferiert und auf ein Endvolumen von 10 ml mit DPBS aufgefüllt. Das 15 ml-Röhrchen wurde bei 1.100 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DPBS resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml *Protein LoBind Tube* überführt. Dieses wurde erneut bei 1.100 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Bei allen nachfolgenden Schritten wurden die Probengefäße stets auf Eis gelagert.

2.2.2.2 Zelllyse

Im Anschluss wurden die MaCa-Zellen mittels nicht-denaturierendem Lysepuffer lysiert. Je nach Größe des Zellpellets wurden 400 µl bis 600 µl des Lysepuffers zum Zellpellet hinzugefügt und resuspendiert. Das *Protein LoBind Tube* wurde für 20 Minuten bei 4 °C und 750 rpm geschüttelt und dann für 20 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit den zu analysierenden Proteinen in ein neues *Protein LoBind Tube* überführt.

2.2.2.3 Proteinquantifizierung

Für die nachfolgende Western Blot-Analyse und Quantifizierung der Proteinexpression in den Proben, war es von entscheidender Bedeutung, dass jede zu untersuchende Probe die gleiche Menge an Gesamtprotein enthielt.

Dafür wurde mittels *PierceTM Bicinchoninic Acid Assay (BCA) Protein Assay Kit* und Herstellerprotokoll unter Gebrauch des Tecans die Proteinkonzentration ermittelt. Der BCA-Test basiert auf der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen (Cu) zu Cu¹⁺ in einem alkalischen Medium durch Reaktion mit Proteinen und dem anschließenden Nachweis von Cu¹⁺ durch BCA mittels Kolorimetrie (89). Das Absorptionsmaximum des BCA/Cu-Komplexes liegt bei einer Wellenlänge von 562 nm (89).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde gemäß den Angaben des Herstellers eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen zwischen 0 µg/µl und 2,0 µg/µl aus BSA-Lösung hergestellt. Anschließend wurde das Detektionsgemisch, bestehend aus einer BCA- und Cu-Sulfatlösung, im Verhältnis 50:1 angefertigt. Die Standardproben wurden im Verhältnis 1:4 und die zu analysierenden Proteinproben wurden im Verhältnis 1:9 mit nicht-denaturierendem Lysepuffer verdünnt und in Duplikaten auf einer 96-Well-Platte aufgetragen. Die Platte wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und die Proteinkonzentration mittels Tecan kolorimetrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss, unter Verwendung von nicht-denaturierenden Lysepuffer, bei allen Proben auf 1 µg/µl eingestellt.

Nachfolgend wurden 20 µl der Proteinprobe mit einer Proteinkonzentration von 1 µg/µl in ein neues *Protein LoBind Tube* überführt, als „Lysat“ bezeichnet und bei 4 °C beiseitegestellt. Im Folgenden wird eine Probe ohne rVAR2, SpyC und *Beads* als Lysat bezeichnet. Das Lysat dient der Kontrolle des Vorkommens eines Proteins in der jeweiligen MaCa-Zelllinie. Die restliche Proteinprobe mit einer Proteinkonzentration von 1 µg/µl wurde auf je 300 µl *Aliquots* in *Protein LoBind Tubes* verteilt.

2.2.2.4 Vorbereitung von rVAR2 und magnetischen *Dynabeads*

Anschließend erfolgte die Vorbereitung von rVAR2 und den magnetischen *Beads*. Das native VAR2CSA-Protein hat nur eine kleine ofCS-Bindungsregion (75), was die Konjugation von rVAR2 an die *Beads* erschwert, da dies zu einer Behinderung der Bindung von rVAR2 an ofCS führen könnte (76). Um die Bindungskapazität von rVAR2 an ofCS nicht zu beeinträchtigen, wurde das Protein-Konjugationssystem, bestehend aus *SpyTag* (SpyT) und SpyC, verwendet (76). Das Prinzip der Bindung von rVAR2 an SpyC und magnetische *Beads* ist in Abbildung 4 dargestellt.

Das rVAR2-Protein enthält ein genetisch hinzugefügtes N-terminales, 13 Aminosäuren langes SpyT-Peptid. Durch die Inkubation von SpyT-enthaltenem rVAR2 mit korrespondierendem Biotin-gebundenem SpyC-Protein (76) wird eine irreversible Isopeptidbindung zwischen SpyT und SpyC gebildet (90) welche spezifisch, schnell, ertragreich und robust ist (91). Dies führt zu einer Biotinylierung von rVAR2. Das biotinylierte rVAR2-Protein wird im letzten Schritt an Streptavidin überzogene *Beads* mittels einer nicht-kovalenten Biotin-Streptavidin-Bindung immobilisiert. Durch Konjugation von rVAR2 an magnetische *Beads* mithilfe des SpyT/SpyC-Prinzips wird die ofCS-Bindungskapazität von rVAR2 erhalten. (76) SpyT-enthaltenes rVAR2 wurde mit SpyC bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

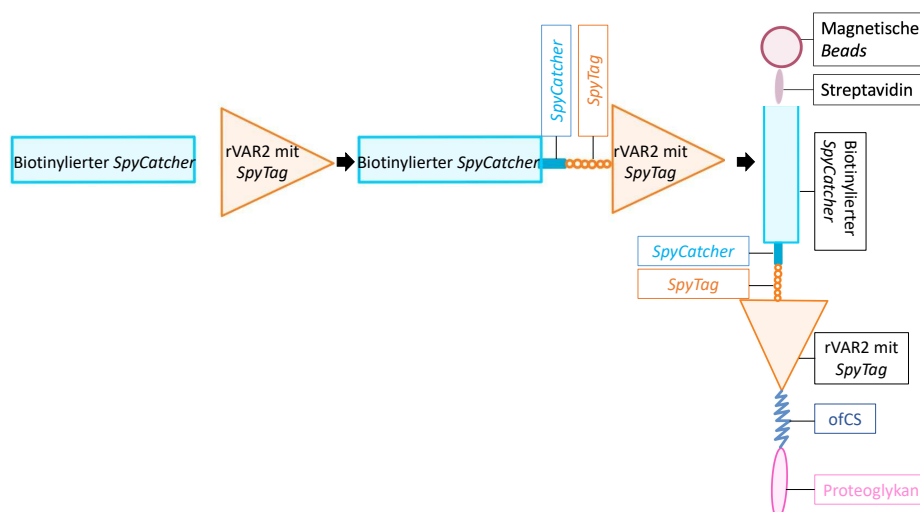


Abb. 4: Darstellung der Bindung von rVAR2, *SpyCatcher*, magnetischen *Beads* und Proteoglykanen mit oncofetalem Chondroitinsulfat (ofCS)

Das rVAR2-Protein bindet an Proteoglykane mit einer oncofetalen Chondroitinsulfat (ofCS)-Modifikation. Zudem bindet rVAR2 über seinen enthaltenen *SpyTag* an biotinylierten *SpyCatcher*. Über die Biotinylierung von *SpyCatcher* bindet dieser wiederum an Streptavidin-überzogene magnetische *Beads*.

Zur Vorbereitung der magnetischen *Beads* wurden diese kurz gevortext und anschließend pro Probe 75 µl *Beads* in ein *Protein LoBind Tube* überführt. Dieses wurde für 1 Minute auf einen Magneten gestellt, sodass die *Beads* vom magnetischen Feld angezogen wurden und der Puffer abgenommen werden konnte. Anschließend wurde das *Protein LoBind Tube* mit den enthaltenen *Beads* vom Magneten genommen und die *Beads* in 1 ml PF10-Puffer resuspendiert. Danach wurden die *Beads* mithilfe eines Isoflux-Magneten gewaschen. Das *Protein LoBind Tube* wurde erneut für 1 Minute auf den Magneten gestellt. Der Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Nach dem letzten Waschgang wurde der Puffer abgenommen und die *Beads* in 75 µl PF10-Puffer pro Probe resuspendiert.

Im nächsten Schritt wurde biotinyliertes rVAR2 zu den *Beads* hinzugefügt. *Protein LoBind Tubes*, welche *Beads* sowie rVAR2 beinhalteten wurden als „Ansatz“ bezeichnet. Biotinyliertes rVAR2 und *Beads* wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Dabei wurde das *Protein LoBind Tube* alle 10 Minuten mit den Fingern leicht beklopft, sodass sich die *Beads* nicht am Boden des *Tubes* absetzten und sich eine Biotin-Streptavidin-Bindung bilden konnte (76). Daraufhin wurden die Kontrollen sowie Ansätze erneut drei Mal mit PF10-Puffer gewaschen.

Zu den *Beads* mit rVAR2 und SpyC wurde im Anschluss die 300 µl Proteinprobe mit einer Konzentration von 1 µg/µl aus dem Schritt „2.2.2.3 Proteinquantifizierung“ hinzugefügt und bei 4 °C über Nacht bei ständiger Rotation inkubiert.

2.2.3 Proteinanalyse mittels Gelelektrophorese und Western Blot

Nach dem rVAR2-*Pulldown* wurde eine Western Blot-Analyse zur Detektion der von rVAR2 gebundenen ofCS-modifizierten Proteoglykane durchgeführt. Die Western Blot-Analyse stellt eine semiquantitative Analyse von Proteinen in einer Probe dar. Durch das Vorkommen bzw. die Abwesenheit von Proteinen und den Vergleich der Proteinmengen zwischen den Proben können Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Proteoglykanen mit ofCS-Modifikation auf verschiedenen Zelllinien gemacht werden.

Nach dem Auftrennen der Proteine in den Proben durch *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) *Polyacrylamide Gel*-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proben aus dem Polyacrylamid-Gel mittels Western Blot-Technik auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Im Anschluss erfolgte mittels Antikörperdetektion der Proteinnachweis auf der PVDF-Membran.

2.2.3.1 Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Am Folgetag wurden die Proben gewaschen. Dazu wurden diese für 1 Minute auf einen Magneten platziert und der Puffer abgenommen. Es wurde fünf Mal mit 300 µl PF10-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben in ein neues *Protein LoBind Tube* überführt und zwei Mal mit

300 µl PBS gewaschen. Die Proben wurden dann in 20 µl Elutionspuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Durch das Erhitzen wurden die *Beads* von der SpyC-rVAR2-Bindung gelöst.

Nachfolgend wurden die Proben für eine Minute auf einen Magneten platziert und der Überstand, welcher die zu analysierenden Proteine und SpyC-rVAR2 enthielt, in ein neues *Protein LoBind Tube* überführt. Zu den Proben wurde 3 µl Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt. Durch DTT wurden die Proteine in ihrer funktionellen Form erhalten und eine Oxidation zu Disulfidbrücken verhindert. Im Anschluss wurden die Proben rasch gevortext und zentrifugiert. Zu den 20 µl Lysat, welches am Vortag beiseitegestellt wurde, wurden 5 µl 4x Laemmli-Probenpuffer hinzugefügt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient zum Auftrennen der Proteine nach ihrer Masse. Nach Denaturierung der Proteine werden die Proteine durch Anlagerung von SDS proportional zu ihrer Masse negativ „beladen“. Im Anschluss erfolgt die Trennung der Proteine mittels angelegter Spannung nach Molekülgröße.

Für die SDS-PAGE wurde das SDS-Gel in die Laufkammer gestellt und mit 1x SDS-Puffer befüllt, sodass das Gel vollständig mit SDS-Puffer bedeckt war. Im Anschluss wurde das Gel mit den Proben sowie dem Marker *Precision Plus Protein All Blue Standards* beladen. Es wurde eine Spannung von 100 V für 20 Minuten und daraufhin eine Spannung von 150 V für 40 Minuten angelegt.

2.2.3.3 Membrantransfer

Anschließend wurden die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurden Gel, Filterpapier, Schwämme und PVDF-Membran in folgender Reihenfolge in eine Western Blot-Apparatur gegeben (s. Abb. 5):

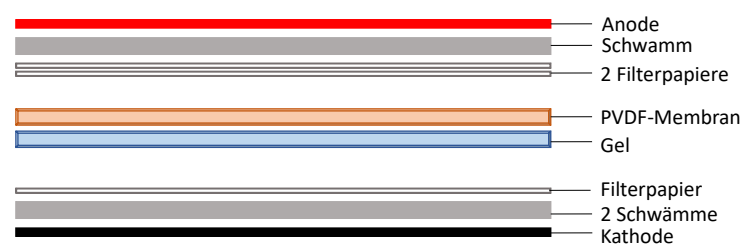


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Membrantransfers

PVDF = Polyvinylidenfluorid.

Zuvor wurde die PVDF-Membran rasch in Methanol getunkt. Anschließend wurden die PVDF-Membran, das SDS-Gel, die Schwämme und die Filterpapiere für ca. 10 Minuten in *Blotting*-Puffer eingelegt. Geblottet wurde bei 10 mA für 20 h bei 4 °C.

2.2.3.4 Blocking der PVDF-Membran

Aufgrund der noch vorhandenen freien Bindungsstellen für Proteine auf der PVDF-Membran nach dem Membrantransfer wurden diese zunächst mit Proteinen, welche nicht vom Antikörper erkannt werden, gesättigt. Hierfür wurde die Membran kurz in 1x *Tris-Buffered Saline with Tween20* (TBST) eingelegt. Im Anschluss wurde die Membran für 1,5 Stunden mit 5 % Bovinem Serumalbumin (BSA)-TBST bei Raumtemperatur inkubiert und somit mit unspezifischen Proteinen gesättigt. Nachfolgend wurde die Membran erneut kurz in 1x TBST gewaschen.

2.2.3.5 Antikörperdetektion

Zur Proteindetektion wurden zwei Antikörper verwendet. Während der Primärantikörper an das gesuchte Protein bindet, bindet der Sekundärantikörper an die Fc-Region des Primärantikörpers und wird anschließend mittels Chemilumineszenz sichtbar.

Der Primärantikörper wurde zunächst im Verhältnis 1:1000 in 5 % BSA-TBST verdünnt. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit 7 ml des verdünnten Primärantikörpers bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Primärantikörperlösung entweder verworfen oder für den späteren Gebrauch bei -18 °C eingefroren. Die Membran wurde drei Mal für jeweils 10 Minuten mit 1x TBST bei Raumtemperatur gewaschen, sodass nicht bzw. schwach gebundene Antikörper entfernt wurden.

Nachfolgend wurde der Sekundärantikörper im Verhältnis 1:2000 in 1 % BSA-TBST verdünnt. Die PVDF-Membran wurde 1,5 Stunden mit 10 ml des verdünnten Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur inkubiert und die Membran wie oben beschrieben drei Mal in TBST gewaschen.

Für die nachfolgende Detektion der gebundenen Sekundärantikörper wurde das *ECLTM Western Blotting Detection Reagenz* nach Herstellerprotokoll und der *ChemiDoc Imager* mit dem Programm *Image LabTM Software Version 5.0* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) verwendet. Die Membran wurde mit 1 ml ECL-Reagenz beträufelt, sodass die gesamte Membran gleichmäßig bedeckt war. Im Anschluss wurde die Membran in den *Imager* gelegt. Es wurde mittels einer kumulativen Belichtungsreihe von 1 bis 1000 Sekunden belichtet.

2.2.3.6 Quantitative Auswertung der Proteinbanden

Für die Bildauswertung wurden die Fotos der Gesamtproteinfärbung und der spezifisch markierten Proteinbanden gleichzeitig importiert. Für die Quantifizierung der Banden wurde ein Foto ausgewählt, in denen die Banden eine starke Signalintensität hatten, jedoch nicht überbelichtet waren. Die gesuchte Bande wurde anhand der Proteingröße auf der Proteinleiter (Marker) identifiziert. Nachfolgend wurden die Bilder mithilfe von *ImageJ/Fiji* quantifiziert.

2.2.3.7 Wiederholung der Antikörperdetektion mit Anti- β -Aktin als Primärantikörper

Im Anschluss an die Bildgebung wurde die PVDF-Membran drei Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1x TBST gewaschen. Zur Kontrolle der Waschvorgänge wurde nachfolgend eine Antikörperdetektion mit Anti- β -Aktin als Primärantikörper durchgeführt. Die Schritte entsprachen denen, wie bereits in den Abschnitten „2.2.3.5 Antikörperdetektion“ und „2.2.3.6 Quantitative Auswertung der Proteinproben“ beschrieben.

2.2.4 Kontrollen

Für die Kontrolle der spezifischen Bindung von rVAR2 an ofCS-modifizierte Proteoglykane wurden vier Kontrollen verwendet. Zu diesen Kontrollen gehören rVAR2-freie-*Beads*, β -Aktin, mutiertes rVAR2-Protein (rVAR2^{mut}) und das Enzym Chondroitinase ABC.

2.2.4.1 rVAR2-freie-*Beads*

Als eine der Kontrollen wurden magnetische *Beads* ohne Hinzugabe von rVAR2 und SpyC verwendet und als rVAR2-freie-*Beads* bezeichnet. Demzufolge wurden allein die *Beads* zu den Proteinproben hinzugefügt und nachfolgend eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die rVAR2-freien-*Beads* dienten zur Kontrolle, dass *Beads* ohne rVAR2 nicht an ofCS-modifizierte Proteoglykane binden.

2.2.4.2 β -Aktin

Als Qualitätskontrolle wurde das *Housekeeping*-Protein β -Aktin verwendet. Das β -Aktin-Protein ist ein hoch exprimiertes, unglykosyliertes Protein des Zellzytoskeletts mit einem molekularen Gewicht von etwa 42 kDa. Da es nicht glykosyliert ist, wird es nicht von rVAR2 gebunden und dient als Kontrolle für die durchgeführten Waschvorgänge.

2.2.4.3 rVAR2^{mut}

Als weitere Kontrolle wurde anstatt des Wildtyp rVAR2-Proteins (rVAR2^{wt}) das rVAR2^{mut}-Protein verwendet. Das rVAR2^{mut}-Protein hat eine Mutation in der ofCS-Bindedomäne der Aminosäuren 555-562 (92). Die Aminosäuresequenz von rVAR2^{wt}, bestehend aus zwei Tryptophanresten und angrenzenden Lysinresten, sind bei rVAR2^{mut} durch Alaninreste ersetzt (92,93). Dabei hat das verwendete rVAR2^{wt}-Protein die Aminosäuresequenz ⁵⁵⁵KKKWIWKK⁵⁶² und das rVAR2^{mut}-Protein die Aminosäuresequenz ⁵⁵⁵AAAAIAAA⁵⁶² (92). Die genauen Sequenzen von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} sind dem Anhang 6.1 zu entnehmen. Durch die Mutation verändert sich die CS-Bindungsregion und reduziert die Bindung von rVAR2^{mut} an ofCS (92). Demzufolge werden Proteine mit ofCS-Modifikation vermindert von rVAR2^{mut} gebunden. Der Unterschied zwischen rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Bei Verwendung von rVAR2^{mut} wurden alle oben beschriebenen Schritte, anstatt mit rVAR2^{wt}, mit rVAR2^{mut} durchgeführt.



Abb. 6: Darstellung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut}

Das rVAR2^{wt}-Protein kann an oncofetales Chondroitinsulfat (ofCS) auf Proteoglykanen binden. Durch eine Mutation der ofCS-Bindedomäne von rVAR2^{mut} bindet rVAR2^{mut} vermindert an ofCS. rVAR2^{wt} = Wildtyp rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*, rVAR2^{mut} = mutiertes rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*.

2.2.4.4 Chondroitinase ABC Enzym

Als weitere Kontrolle wurde das Enzym Chondroitinase ABC verwendet. Chondroitinase ABC degradiert spezifisch CS und spaltet die Seitenketten von CSPGs ab. Durch das Enzym wird die ofCS-Modifikation von Proteoglykanen entfernt, sodass CSPGs ohne ofCS-Modifikation nicht mehr durch rVAR2 gebunden werden. Der Unterschied zwischen rVAR2^{wt} und Chondroitinase ABC ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Die spezifische Bindung von rVAR2^{wt} an Proteoglykane mit ofCS-Modifikation wird durch Verwendung von Chondroitinase ABC deutlich.

Für die Chondroitinase-Behandlung der MaCa-Zellen wurde zunächst der Chondroitinase-Puffer mithilfe 19,6 ml DPBS, 0,4 ml FCS sowie 0,05 M wasserfreiem Natriumacetat hergestellt und auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

Die Chondroitinase-Behandlung wurde nach dem Ablösen der Zellen vor der Zelllyse durchgeführt. Nach dem Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden wurde das Zellpellet in 1 ml Chondroitinase-Puffer resuspendiert und 25 µl Chondroitinase ABC hinzugefügt. Zellpellets mit Chondroitinase ABC wurden für 30 Minuten bei 37 °C unter Rotation inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 1.100 rpm und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und die MaCa-Zellen lysiert. Das Protokoll wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

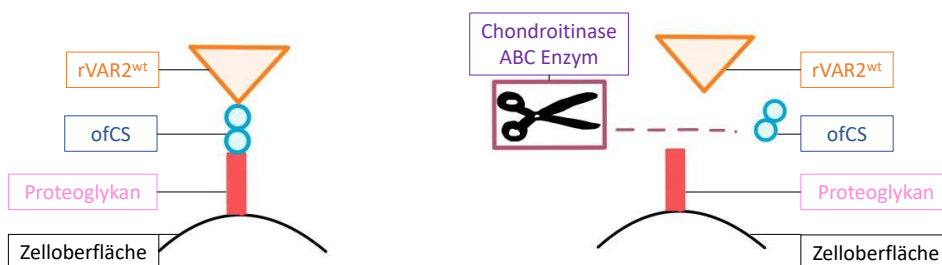


Abb. 7: Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} an oncofetales Chondroitinsulfat (ofCS) ohne Chondroitinase ABC Enzym und mit Verwendung von Chondroitinase ABC Enzym

Auf der linken Bildseite wird die Bindung von rVAR2^{wt} an ofCS auf Proteoglykanen dargestellt. Die rechte Bildseite zeigt die Abspaltung von ofCS durch das Enzym Chondroitinase ABC. Das rVAR2^{wt}-Protein kann nach Abspaltung von ofCS durch Chondroitinase nicht an Proteoglykane ohne ofCS-Modifikation binden.

2.2.5 Massenspektrometrie-Analyse

2.2.5.1 Prinzip der Massenspektrometrie-Analyse

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der Identität, Sequenz, Struktur, Menge, Funktion und Interaktionen von Proteinen (94,95). Eine häufig verwendete Methode ist dabei die *Bottom-Up* Massenspektrometrie-Analyse, bei der Proteine mittels einer Protease verdaut und im Anschluss mittels Flüssigchromatographie aufgetrennt werden (95). Die nachfolgend ionisierten Peptide werden von einem Massenspektrometer analysiert und deren Masse-zu-Ladungsverhältnis sowie elektrischen Signale gemessen (95). Die vom Detektor erfassten Signale hängen dabei von der Ionisierbarkeit, dem Ladungszustand und der Häufigkeit der Peptide ab (95). Zudem wird jedes Peptid erneut isoliert, fragmentiert und eine Massenspektrometrie-Analyse der fragmentierten Ionen durchgeführt (95). Im Anschluss wird die Aminosäuresequenz der Peptide bestimmt und die Identität und Häufigkeit der jeweiligen Proteine abgeleitet (95). Zur Peptididentifikation wird eine Datenbanksuche durchgeführt (95). Für diese Arbeit wurden folgende Datenbanken verwendet: „20220217_franken spy tag DBL1-ID2a.fasta“ und „20220118_Homo_sapiens_UP000005640_79038_entries.fasta“ (heruntergeladen am 18.01.2022) (96,97).

2.2.5.2 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie-Analyse

Die Massenspektrometrie wurde verwendet, um die Gesamtheit der von rVAR2 gebundenen ofCS-modifizierten Proteoglykanen auf MaCa-Zellen zu identifizieren.

Zur Vorbereitung der Proteinproben für die Massenspektrometrie wurde das Protokoll zum rVAR2-*Pulldown* wie beschrieben durchgeführt („2.2.2 *Pulldown* mit rVAR2“). Es ergaben sich jedoch folgende Unterschiede in der Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie im Gegensatz zur Probenvorbereitung für den Western Blot:

- 1.) Die Proteinproben zu je 300 µl mit einer Proteinkonzentration von 1 µg/µl wurden über Nacht mit rVAR2^{wt} bzw. rVAR2^{mut}, SpyC sowie *Beads* inkubiert. Anschließend wurden diese fünf Mal mit PF10-Puffer und zwei Mal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Proben in Elutionspuffer resuspendiert. Um für die Massenspektrometrie eine vierfache Proteinkonzentration zu erreichen, wurden je vier Proben rVAR2^{wt} bzw. rVAR2^{mut} nacheinander mit dem gleichen 20 µl Massenspektrometrie-Elutionspuffer resuspendiert und in einem *Protein LoBind Tube* gesammelt. Die Proben wurden im Anschluss erhitzt und der Überstand in ein neues *Protein LoBind Tube* überführt.
- 2.) Es wurde kein 1M DTT zu den Proben für die Massenspektrometrie hinzugefügt.

Die anschließende Massenspektrometrie wurde durch Dr. rer. nat. Gereon Poschmann, Arbeitsgruppe *Functional Proteomics*, Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität, durchgeführt.

2.2.6 Statistik

Die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen und Grafiken wurden mit *GoodNotes 5*, *Microsoft PowerPoint* Version 16.87 (24071426) sowie *Microsoft Excel* Version 16.87 (24071426) erstellt. Die Auswertung der Western Blot-Analysen erfolgte mit *ImageJ/Fiji*. Die Ergebnisse der Experimente wurden in Form von Mittelwerten mit Standardabweichung (STABW) dargestellt. Die Daten wurden mittels *GraphPad Prism* (Version 8), einer *Ordinary One-way ANOVA* sowie *Two-way ANOVA* und *Tukey's Multiple Comparisons Test* bei einem Konfidenzintervall von 95 % analysiert. Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Massenspektrometrie (*Student's t-Test* Statistik, *Significance Analysis of Microarrays*, *False Discovery Rate* von 5 %) wurde durch Dr. Gereon Poschmann, Arbeitsgruppe *Functional Proteomics and Protein Analysis* des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums der Heinrich-Heine-Universität, durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten

3.1.1 Optimierung der Präzipitation von rVAR2-Zielproteinen

Das erste Ziel dieser Promotionsarbeit ist der Nachweis von ofCS-modifizierten Proteoglykanen, die von rVAR2 gebunden werden und die rVAR2-basierte Anreicherung vermitteln. Um dieses Ziel zu erreichen wurde zunächst die Präzipitation von rVAR2-Zielproteinen mittels rVAR2-*Pulldown* und anschließender Western Blot-Analyse optimiert. Dies wurde mithilfe des durch Vorarbeiten von Hamna Mahmood, Hanna Wietz (98) und Caroline Krahn (99) bekannten rVAR2-Zielproteins NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen durchgeführt.

In der Western Blot-Analyse wurden im Lysat sowie im Ansatz mit rVAR2^{wt} zwei Signale detektiert, jeweils bei ca. 140 Kilodalton (kDa) und bei ca. 270 kDa (s. Abb. 8). Dabei ließ sich im Lysat ein starkes unteres Signal bei ca. 140 kDa nachweisen (s. Abb. 8). Im Gegensatz dazu war im *Pulldown* mit rVAR2^{wt} das obere Signal bei ca. 270 kDa stärker ausgeprägt als das untere Signal (s. Abb. 8). Nach Hinzugabe von Anti-β-Aktin als zweiten Primärantikörper wurde ein Signal auf Höhe von etwa 42 kDa im Lysat der MDA-MB-231 Zellen festgestellt (s. Abb. 8). Hingegen wurde nach Hinzufügen von Anti-β-Aktin nahezu kein Signal im Ansatz nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} erkennbar (s. Abb. 8). Durch dieses Experiment wurde ersichtlich, dass NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen vorhanden ist, rVAR2^{wt} an NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen bindet und NRP1 somit als ofCS-modifiziertes Proteoglykan die rVAR2^{wt} basierte Anreicherung vermittelt (s. Abb. 8).

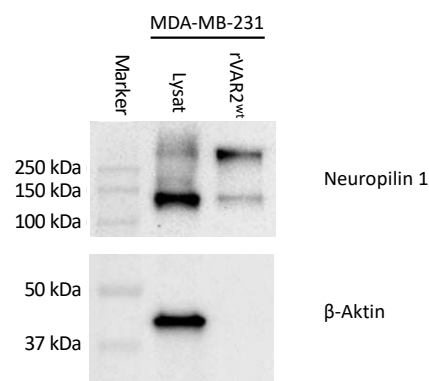


Abb. 8: Exemplarische Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 Zellen
Expression von Neuropilin 1 und β-Aktin auf MDA-MB-231 Zellen sowie Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 beziehungsweise β-Aktin auf MDA-MB-231 Zellen. kDa = Kilodalton, N = 9.

Anschließend wurde die Konzentration von rVAR2^{wt} für den rVAR2-*Pulldown* und die Western Blot-Analyse optimiert. Für die Optimierung der rVAR2-Konzentration wurde die Bindung von

verschiedenen rVAR2^{wt}-Mengen an NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen, durch einen Vergleich der Signalstärke im Western Blot, bestimmt.

Hierfür wurden drei verschiedene rVAR2^{wt}-Mengen verwendet. Ansatz 1 enthielt eine einfache rVAR2-Menge von je 18,74 µg pro Proteinprobe. Ansatz 2 enthielt die zweifache rVAR2-Menge von jeweils 37,48 µg pro Proteinprobe. Ansatz 3 enthielt die vierfache rVAR2^{wt}-Menge von je 74,96 µg pro Proteinprobe. Die verwendete SpyC-Menge wurde entsprechend der verwendeten rVAR2-Konzentration angepasst. Ansatz 1 enthielt 1,7 µg SpyC pro Proteinprobe. Ansatz 2 enthielt die zweifache SpyC-Menge von 3,4 µg pro Probe. Ansatz 3 enthielt 6,8 µg SpyC-Menge pro Probe. Als zusätzliche Kontrolle wurden rVAR2-freie-*Beads* verwendet.

Es wurde ein starkes Signal im Lysat bei ca. 140 kDa sowie ein schwächeres Signal bei ca. 270 kDa sichtbar (s. Abb. 9). In den Ansätzen mit verschiedenen rVAR2^{wt}-Mengen wurden jeweils ein ähnlich schwaches Signal bei ca. 140 kDa sowie ein stärkeres Signal bei etwa 270 kDa detektiert (s. Abb. 9). Im Ansatz mit den rVAR2-freien-*Beads* wurde kein Signal erkennbar (s. Abb. 9). Des Weiteren wurde nach Hinzugabe von Anti-β-Aktin ein starkes Signal bei ca. 42 kDa im Lysat erkennbar, während nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} bei allen verwendeten rVAR2^{wt}-Mengen ein ähnlich schwaches Signal bei ca. 42 kDa detektiert wurde (s. Abb. 9). Die Signalintensität bei zweifacher rVAR2-Konzentration war mit 12.587 artifiziellen Einheiten (aE) (SD +- 1.712,68 aE) am stärksten, gefolgt von der Signalintensität der einfachen rVAR2-Konzentration mit 10.357 aE (SD +- 4.985,73 aE) (s. Abb. 10). Das Signal bei vierfacher rVAR2-Konzentration war mit 7.179 aE am geringsten (SD +- 856,24 aE) (s. Abb. 10). Da bei Verwendung einer rVAR2-Menge von 37,48 µg und einer entsprechenden SpyC-Menge von 3,4 µg pro Proteinprobe die Signalintensität am stärksten war - wenn auch nicht signifikant -, wurde basierend auf diesem Ergebnis in den folgenden Experimenten eine rVAR2-Menge von 37,48 µg und eine SpyC-Menge von 3,4 µg pro Probe verwendet.

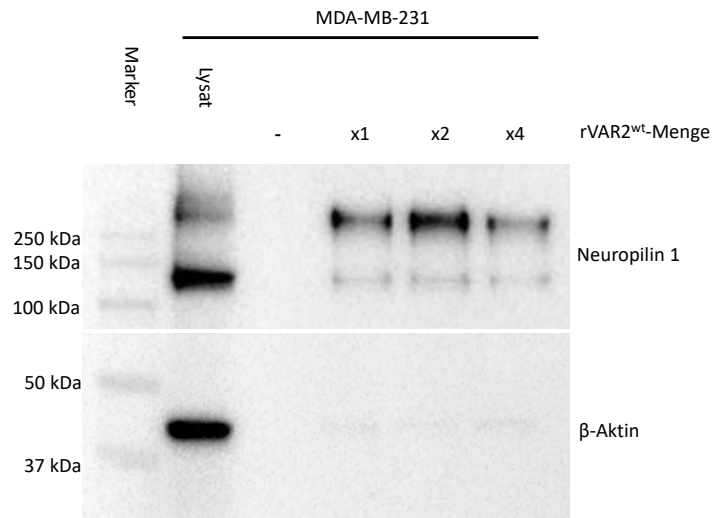


Abb. 9: Exemplarische Darstellung des Vergleiches der Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 Zellen bei Verwendung verschiedener rVAR2^{wt}-Mengen

Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 bei Verwendung verschiedener rVAR2^{wt}-Mengen auf MDA-MB-231 Zellen (oben). Expression von β-Aktin auf MDA-MB-231 Zellen und Bindung von rVAR2^{wt} in unterschiedlichen Mengen an β-Aktin auf MDA-MB-231 Zellen (unten). „-“ = rVAR2-freie-Beads, „x1“ = rVAR2-Pulldown mit einfacher Menge: 18,74 µg rVAR2^{wt} und 1,7 µg *SpyCatcher*. „x2“ = rVAR2-Pulldown mit zweifacher Menge: 37,48 µg rVAR2^{wt} und 3,4 µg *SpyCatcher*. „x4“ = rVAR2-Pulldown mit vierfacher Menge: 74,96 µg rVAR2^{wt} und 6,8 µg *SpyCatcher*. kDa = Kilodalton, N = 3.

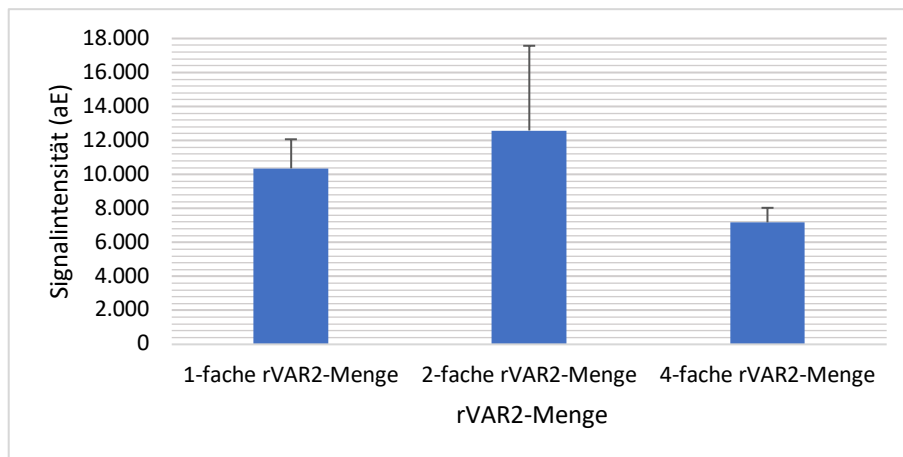


Abb. 10: Signalintensität bei Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 bei unterschiedlichen rVAR2^{wt}-Mengen

Einfache Menge: 18,74 µg rVAR2^{wt} und 1,7 µg *SpyCatcher*. Zweifache Menge: 37,48 µg rVAR2^{wt} und 3,4 µg *SpyCatcher*. Vierfache Menge: 74,96 µg rVAR2^{wt} und 6,8 µg *SpyCatcher*. Statistischer Test mit *Ordinary One-way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparisons Test*: einfache rVAR2-Menge vs. zweifache rVAR2-Menge: p = 0,6681, einfache rVAR2-Menge vs. vierfache rVAR2-Menge: p = 0,4639, zweifache rVAR2-Menge vs. vierfache rVAR2-Menge: p = 0,16. aE = artifizielle Einheiten, N = 3.

3.1.2 Etablierung von Kontrollen

Für die Massenspektrometrie ist die Verwendung von optimalen Kontrollen zur Überprüfung der spezifischen Bindung von rVAR2 an ofCS-modifizierte Proteoglykane von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurden verschiedene Kontrollen etabliert. Zu den vier Kontrollen zählen: rVAR2-freie-Beads, β-Aktin, rVAR2^{mut} und Chondroitinase ABC.

3.1.2.1 Kontrolle 1: rVAR2-freie-Beads

Zur Etablierung der Kontrolle wurden die MaCa-Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 verwendet und die Bindung von rVAR2-freien-Beads an NRP1 getestet. Es wurde ein Signal bei ca. 140 kDa sowie ein stärkeres Signal bei etwa 270 kDa in den Ansätzen der MDA-MB-231 Zellen und ein Signal bei etwa 270 kDa in den Ansätzen der MDA-MB-436 Zellen nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} sichtbar (s. Abb. 11). In den Ansätzen der luminalen MCF-7 Zellen nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* wurde kein Signal erkennbar (s. Abb. 11). Bei Verwendung der rVAR2-freien-Beads wurde bei der luminalen sowie bei den beiden triple-negativen MaCa-Zelllinien kein Signal detektiert (s. Abb. 11). Daraus folgt, dass rVAR2-freie-Beads nicht an NRP1 auf den verwendeten triple-negativen und luminalen MaCa-Zellen binden.

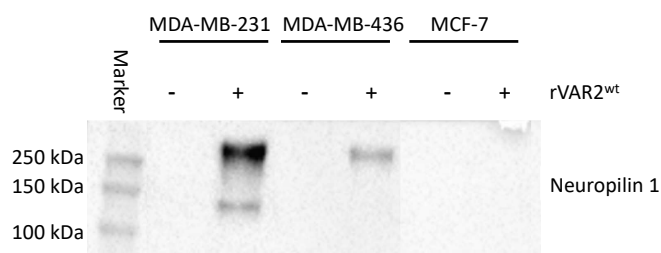


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der Bindung rVAR2-freier-Beads an Neuropilin 1 auf verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien im Vergleich zur Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf verschiedenen Brustkrebszelllinien

kDa = Kilodalton, N = 3.

3.1.2.2 Kontrolle 2: β -Aktin

Als Kontrolle für unspezifisch gebundene Proteine wurde das zelluläre Strukturprotein β -Aktin verwendet. Anti- β -Aktin wurde bei jedem rVAR2-*Pulldown* mit anschließendem Western Blot stets als zweiten Primärantikörper zur Qualitätskontrolle verwendet. In den Lysaten der MaCa-Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 wurden starke Signale bei ca. 42 kDa erkennbar (s. Abb. 12). Das β -Aktin-Protein wurde von allen drei verwendeten MaCa-Zelllinien exprimiert. In den Ansätzen nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} wurde nahezu kein Signal bei ca. 42 kDa nach Hinzugabe von Anti- β -Aktin als zweiten Primärantikörper detektiert (s. Abb. 12). Mithilfe dieser Kontrolle wurde deutlich, dass die Waschvorgänge nach Protokoll ausreichend sind und Proteine, welche nicht durch rVAR2^{wt} gebunden wurden, durch das Waschen entfernt wurden.

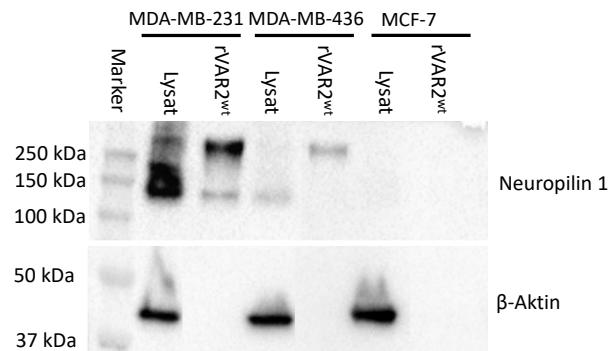


Abb. 12: Exemplarische Darstellung von β -Aktin im Zelllysat der Mammakarzinom-Zelllinien sowie Bindung von rVAR2^{wt} an β -Aktin

In der oberen Bildhälfte ist das Vorkommen von Neuropilin 1 im Lysat sowie in den Ansätzen nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} bei triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen dargestellt. In der unteren Bildhälfte ist das Vorkommen von β -Aktin im Lysat sowie in den Ansätzen nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} bei triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen dargestellt. kDa = Kilodalton, N = 3.

3.1.2.3 Kontrolle 3: rVAR2^{mut}

Als weitere Kontrolle wurde rVAR2^{mut} mit einer Mutation der ofCS-Binderegion verwendet. Es wurde die Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen verglichen. Im Ansatz mit rVAR2^{wt} wurden zwei Signale bei ca. 140 kDa und 270 kDa sichtbar (s. Abb. 13). Hingegen wurde im Ansatz mit rVAR2^{mut} nahezu kein Signal erkennbar (s. Abb. 13). Dies bedeutet, dass rVAR2^{wt} an NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen bindet, während rVAR2^{mut} kaum an NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen bindet. Durch die Mutation der ofCS-Bindedomäne von rVAR2^{mut} kann dieses kaum an ofCS-modifiziertes NRP1 binden. Durch dieses Experiment konnte die spezifische Bindung von rVAR2^{wt} an ofCS-modifizierte Proteoglykane nachgewiesen werden.

Das Vorhandensein von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} im Western Blot wurde mittels Verwendung des Anti-V5-Antikörpers überprüft, welcher an den V5-Tag von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} bindet (s. Abb. 14). Das rVAR2^{wt}- sowie das rVAR2^{mut}-Protein haben beide ein molekulares Gewicht von 121 kDa, während das SpyC-Protein ein molekulares Gewicht von 13 kDa aufweist (vgl. Tabelle 5, 2.1.5). Folglich war im Western Blot ein Signal auf Höhe von ca. 134 kDa zu erwarten. Im Western Blot wurde ein starkes Signal in etwa auf der erwarteten Höhe in den Ansätzen mit rVAR2^{wt} sowie in den Ansätzen mit rVAR2^{mut} sichtbar (s. Abb. 14). Somit wurde die erfolgreiche Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an die *Beads* nachgewiesen.

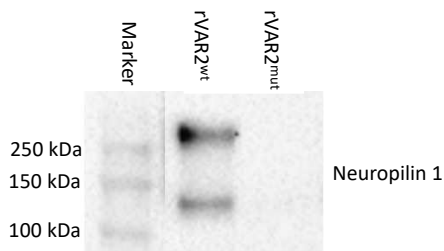


Abb. 13: Exemplarische Darstellung des Vergleiches der Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 Zellen
kDa = Kilodalton, N = 3.

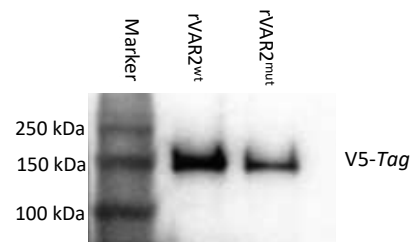


Abb. 14: Exemplarische Darstellung des Nachweises von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} im Western Blot mittels Anti-V5-Antikörper
kDa = Kilodalton, N = 3.

3.1.2.4 Kontrolle 4: Chondroitinase ABC

Mithilfe des Chondroitinase ABC Enzyms wurde die ofCS-Modifikation von Proteoglykanen entfernt, wodurch rVAR2^{wt} nicht mehr an CSPGs ohne ofCS binden konnte. Zur Etablierung der Kontrolle mit Chondroitinase ABC Enzym wurden die Bindung von rVAR2^{wt} an NRP1 auf triple-negativen MaCa-Zelllinien mit und ohne Verwendung von Chondroitinase verglichen.

Im Fall der MDA-MB-231 Zellen wurden im Ansatz mit rVAR2^{wt} ohne Chondroitinase zwei Signale auf Höhe von etwa 140 kDa und 270 kDa sichtbar (s. Abb. 15). Im Gegensatz hierzu war das untere Signal im Ansatz der MDA-MB-231 Zellen bei Verwendung von Chondroitinase deutlich schwächer, während kein oberes Signal detektiert wurde (s. Abb. 15). Im Fall der MDA-MB-436 Zellen mit rVAR2^{wt} ohne Chondroitinase wurde ein Signal bei ca. 270 kDa erkennbar (s. Abb. 15). Jedoch wurde im Ansatz der MDA-MB-436 Zellen mit Chondroitinase ABC kein Signal sichtbar (s. Abb. 5).

Aus dem Experiment mit Verwendung von Chondroitinase lässt sich ableiten, dass rVAR2^{wt} an eine glykosylierte Form von NRP1 auf den triple-negativen MaCa-Zellen MDA-MB-231 und MDA-MB-436 bindet.

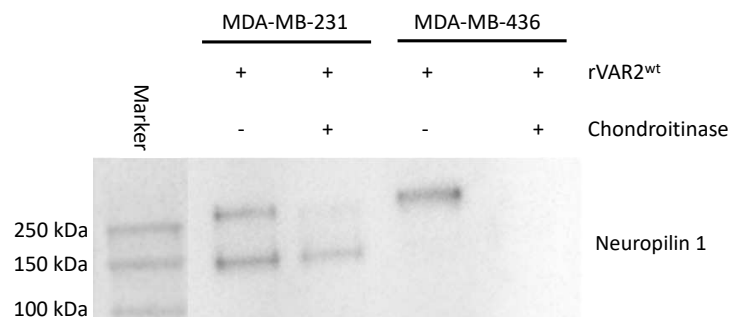


Abb. 15: Exemplarische Darstellung des Vergleiches der Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 und MDA-MB-436 Zellen mit Chondroitinase und ohne Chondroitinase-Behandlung
kDa = Kilodalton, N = 3.

Zusammenfassend wurde mittels der Kontrollen mit rVAR2-freie-*Beads*, β -Aktin, rVAR2^{mut} und Chondroitinase ABC die spezifische Bindung von rVAR2^{wt} an ofCS-modifizierte Proteoglykane erkennbar.

3.1.3 Vergleich von Neuropilin 1 als rVAR2-Zielprotein auf triple-negativen und luminalen MaCa-Zelllinien

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit ist der Vergleich der von rVAR2 gebundenen Proteoglykanen auf Zellen verschiedener MaCa-Zelllinien, welche verschiedene MaCa-Subtypen repräsentieren. Im folgenden Experiment wurde das Vorhandensein von NRP1 als Zielprotein von rVAR2^{wt} auf den triple-negativen MaCa-Zellen MDA-MB-231 und MDA-MB-436 sowie auf den luminalen MCF-7 Zellen untersucht und miteinander verglichen.

Bei dem Vergleich der Lysate wurden starke Signalintensitäten bei den triple-negativen MaCa-Zelllinien ersichtlich (s. Abb. 16). Es wurde v. a. ein starkes Signal auf Höhe von etwa 140 kDa und 270 kDa im Lysat der MDA-MB-231 Zellen detektiert (s. Abb. 16). Im Lysat der MDA-MB-436 Zellen wurde im Vergleich zu den MDA-MB-231 Zellen ein schwächeres Signal bei ca. 140 kDa sichtbar (s. Abb. 16). Im Lysat der MCF-7 Zellen war ein sehr schwaches Signal bei etwa 100 kDa bis 150 kDa vorhanden (s. Abb. 16).

Ein Vergleich der Expression von NRP1 auf den verschiedenen MaCa-Zelllinien erfolgte anhand der NRP1-Expression in den Lysaten nach Western Blot-Analyse (s. Abb. 17). Im Fall der MDA-MB-231 Zellen wurde eine Signalintensität von 34.489 aE detektiert (SD +- 5104 aE) (s. Abb. 17). Die Signalintensität der MDA-MB-436 Zellen war im Vergleich mit 6.723 aE vermindert (SD +- 5166 aE) (s. Abb. 17). Dabei war der Unterschied der Signalintensität zwischen den MDA-MB-231 und MDA-MB-436 Zellen statistisch signifikant. Im Vergleich zu den triple-negativen MaCa-Zellen wurde bei den luminalen MCF-7 Zellen eine deutlich geringere Signalintensität von 681 aE (SD +- 646 aE) detektiert (s. Abb. 17). Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in der Signalintensität zwischen den MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen, während der Unterschied der Signalintensität zwischen den MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen nicht statistisch signifikant war. Daraus folgt, dass NRP1 ein stark exprimiertes Protein auf triple-negativen MaCa-Zelllinien, v. a. auf MDA-MB-231 Zellen, ist. Im Vergleich ist NRP1 ein nur wenig exprimiertes Protein auf MCF-7 Zellen.

In dem Ansatz der MDA-MB-231 Zellen mit rVAR2^{wt} wurde ein starkes oberes Signal bei ca. 270 kDa sowie ein schwächeres unteres Signal bei ca. 140 kDa detektiert (s. Abb. 16). Im Ansatz der MDA-MB-436 Zellen mit rVAR2^{wt} wurde ein Signal bei etwa 270 kDa sichtbar, welches im Vergleich zu den MDA-MB-231 Zellen weniger intensiv war (s. Abb. 16). In dem Ansatz mit

rVAR2^{wt} in den luminalen MCF-7-Zellen wurde kein Signal erkennbar (s. Abb. 16). Hieraus folgt, dass NRP1 ein von rVAR2^{wt} stark gebundenes Proteoglykan auf triple-negativen MaCa-Zellen ist. NRP1 wird nur sehr schwach von MCF-7 Zellen exprimiert und wird nicht von rVAR2^{wt} auf luminalen MCF-7 Zellen gebunden. Demnach bindet rVAR2^{wt} an NRP1 v. a. auf triple-negativen MaCa-Zellen.

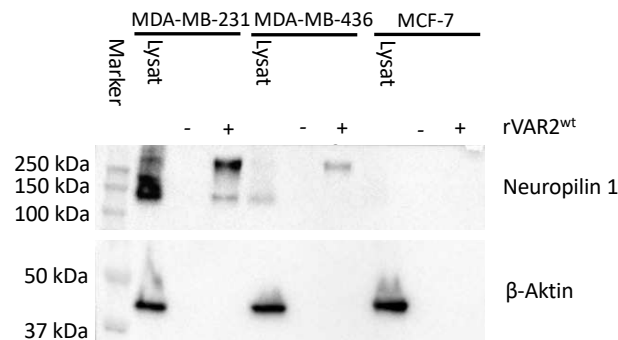


Abb. 16: Exemplarische Darstellung der Expression von Neuropilin 1 sowie des Vergleiches der Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 sowie auf der luminalen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7

Dargestellt ist das Vorkommen von Neuropilin 1 und β -Aktin im Lysat, in den Ansätzen nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} sowie nach Verwendung rVAR2-freier-Beads bei triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen. kDa = Kilodalton, N = 3.

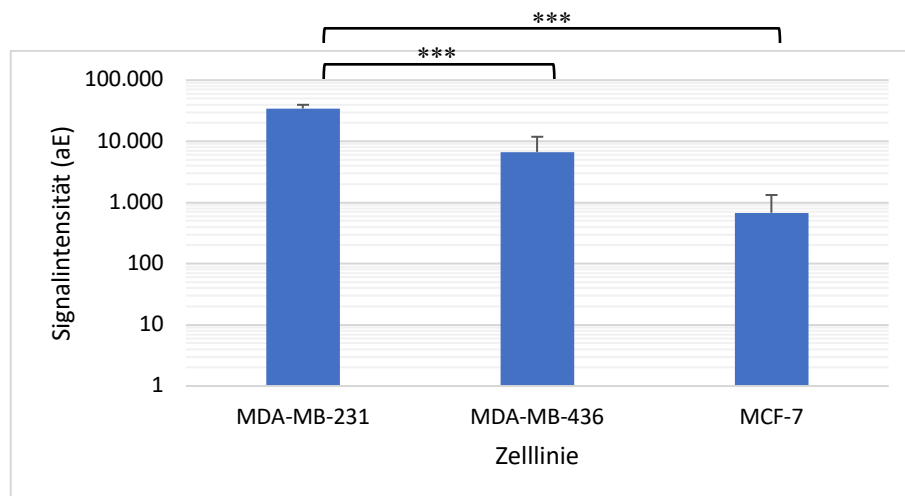


Abb. 17: Darstellung der Signalintensität der Expression von Neuropilin 1 auf triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zelllinien

Vergleich der Expression von Neuropilin 1 auf triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zelllinien anhand der Signalintensität nach Western Blot-Analyse. Statistischer Test mit *Ordinary One-way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparisons Test*, *** = $p < 0,001$, MDA-MB-231 vs. MDA-MB-436: $p = < 0,0001$, MDA-MB-231 vs. MCF-7: $p = < 0,0001$, MDA-MB-436 vs. MCF-7: $p = 0,2543$. aE = artifizielle Einheiten, N = 3.

Es wurde zudem die Bindung von rVAR2^{wt} sowie von rVAR2-freien-Beads an NRP1 auf triple-negativen MaCa-Zelllinien miteinander verglichen (s. Abb. 18). Nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* konnten bei den MDA-MB-231 Zellen Signale auf Höhe von etwa 140 kDa und 270 kDa und bei den MDA-MB-436 Zellen bei ca. 270 kDa detektiert werden (s. Abb.16). Es wurden keine Signale in den

Ansätzen mit rVAR2-freien-Beads sichtbar (s. Abb. 16). Bei den MDA-MB-231 Zellen wurde eine Signalintensität von 14.087,19 aE nach rVAR2^{wt}-Pull-down detektiert (SD +/- 5.409,06 aE) (s. Abb. 18). Im Gegensatz hierzu konnte keine Signalintensität nach Gebrauch der rVAR2-freien-Beads nachgewiesen werden (SD +/- 0 aE) (s. Abb. 18). Der Unterschied der Signalintensität zwischen den MDA-MB-231 Zellen nach rVAR2^{wt}-Pull-down und nach Verwendung rVAR2-freier-Beads war statistisch signifikant (s. Abb.18). Im Fall der MDA-MB-436 Zellen wurde eine Signalintensität von 6.033,03 aE festgestellt (SD +/- 4.445,89 aE) (s. Abb. 18). Auch bei den MDA-MB-436 Zellen konnte keine Signalintensität bei den rVAR2-freien-Beads detektiert werden (SD +/- 0 aE) (s. Abb. 18). Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in der Signalintensität bei den MDA-MB-436 Zellen nach rVAR2^{wt}-Pull-down und nach Verwendung rVAR2-freier-Beads (s. Abb. 18). Es wurde deutlich, dass rVAR2^{wt} NRP1 auf triple-negativen MaCa-Zellen detektiert, während die rVAR2-freien-Beads nicht an NRP1 auf triple-negativen MaCa-Zellen binden.

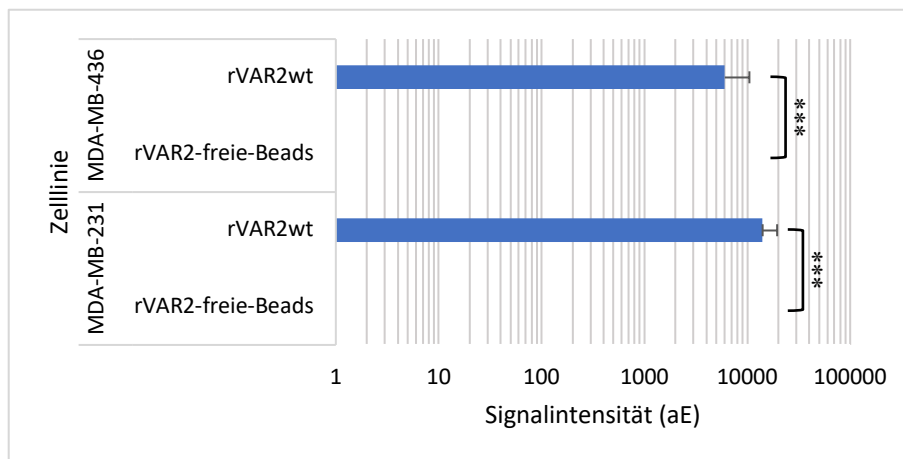


Abb. 18: Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 im Vergleich zur Bindung von rVAR2-freien-Beads an Neuropilin 1 auf triple-negativen Mammakarzinom-Zellen

Darstellung der Signalintensität bei Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2-freien-Beads an Neuropilin 1 auf MDA-MB-436 und MDA-MB-231 Zellen. Statistischer Test mit *Two-way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparisons Test* mit logarithmierten Werten zur Basis 10, der Wert „0“ wurde nicht logarithmiert. *** = $p < 0,001$, MDA-MB-231 rVAR2-freie-Beads vs. MDA-MB-231 rVAR2^{wt}: $p < 0,0001$, MDA-MB-436 rVAR2-freie-Beads vs. MDA-MB-436 rVAR2^{wt}: $p < 0,0001$. aE = artifizielle Einheiten, N = 3.

3.2 Massenspektrometrie-basierte Identifikation von rVAR2-Zielproteinen auf Mammakarzinom-Zellen

Das dritte Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Identifikation bislang unbekannter Proteoglykane auf MaCa-Zellen, deren oCS-Struktur von rVAR2 erkannt wird. Dafür wurde ein *Pull-down* mit rVAR2 und anschließend eine Massenspektrometrie-Analyse durchgeführt. Es wurden die triple-negativen MaCa-Zellen MDA-MB-231 und MDA-MB-436, sowie die luminalen MaCa-Zelllinie MCF-7 verwendet.

3.2.1 Analyse der Proben für die Massenspektrometrie-Analyse

Exemplarisch werden im Folgenden die Massenspektrometrie-Ergebnisse der MDA-MB-436 Zellen dargestellt. Die Ergebnisse für die MDA-MB-231 Zellen sind dem Anhang 6.2.1 und die Ergebnisse der MCF-7 Zellen sind dem Anhang 6.2.2 zu entnehmen.

Vor der Massenspektrometrie wurden die Kopräzipitate in ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, um die Gesamtheit aller isolierten Proteine in den Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} darzustellen. Die Mehrheit der Banden war sowohl in den Proben nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* als auch nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* vorhanden (s. Abb. 19). Exemplarisch sind Banden, welche in den Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} sichtbar waren, mit einem blauen Rechteck markiert (s. Abb. 19). Diese Proteine wurden demnach von rVAR2^{wt} sowie von rVAR2^{mut} gebunden. Hierbei wurde ersichtlich, dass die meisten Proteine unspezifisch von beiden rVAR2-Typen gebunden wurden (s. Abb. 19). Im Gegensatz dazu wurden einige Banden erkennbar, welche ausschließlich oder stärker in den Proben nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* vorhanden waren, jedoch nicht bzw. weniger in den Proben nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* (s. Abb. 19). Einige dieser Banden sind in Abbildung 19 beispielhaft rosa markiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass u. a. diese Banden die gesuchten potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine enthalten könnten. Dabei könnten die einzelnen Banden auch mehrere Proteine enthalten.

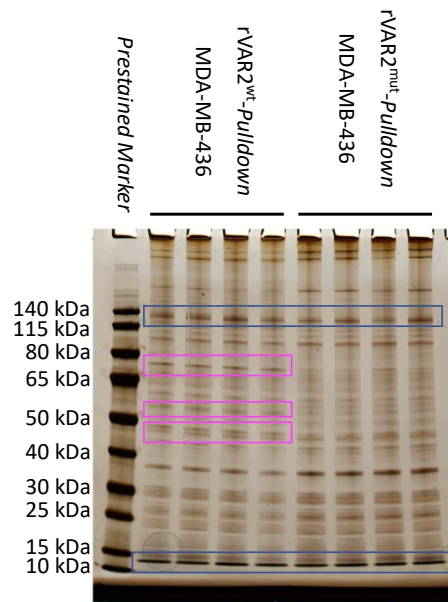


Abb. 19: Darstellung der Zielproteine von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} auf MDA-MB-436 Zellen im Polyacrylamidgel

Darstellung der MDA-MB-436 Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} im Polyacrylamidgel. Exemplarisch sind Banden blau umrandet, die sowohl in Proben nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* als auch nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* sichtbar waren. Rosa umrandet sind exemplarisch Banden, welche in allen Proben nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* zu erkennen waren, jedoch nicht beziehungsweise vermindert in Proben nach rVAR2^{mut}-*Pulldown*. kDa = Kilodalton.

Des Weiteren wurde die Homogenität der Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} miteinander sowie untereinander verglichen. In Abbildung 20 ist die Proben-Homogenität der jeweiligen Bedingung rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} mittels *Multiscatterplot* dargestellt. Der *Multiscatterplot* stellt die Homogenität der rVAR2^{wt}-Proben untereinander, grün umrandet, sowie der rVAR2^{mut}-Proben untereinander, rot umrandet, dar (s. Abb. 20). Bei Vergleich der rVAR2^{wt}-Proben sowie rVAR2^{mut}-Proben ist ein starkes positives, lineares Verhältnis der rVAR2^{wt}- und rVAR2^{mut}-Proben untereinander erkennbar (s. Abb. 20). Dies bedeutet, dass die jeweiligen Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} untereinander gleichartig waren. Zudem ist mittels *Multiscatterplot* die Homogenität der Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und nach *Pulldown* mit rVAR2^{mut} zueinander gegenübergestellt (s. Abb. 20). Die Homogenität der rVAR2^{wt}-Proben verglichen mit den rVAR2^{mut}-Proben ist in Abbildung 20 blau umrandet dargestellt. Hierbei ist ein positives, moderates lineares Verhältnis zueinander mit einigen Ausreißern erkennbar (s. Abb. 20).

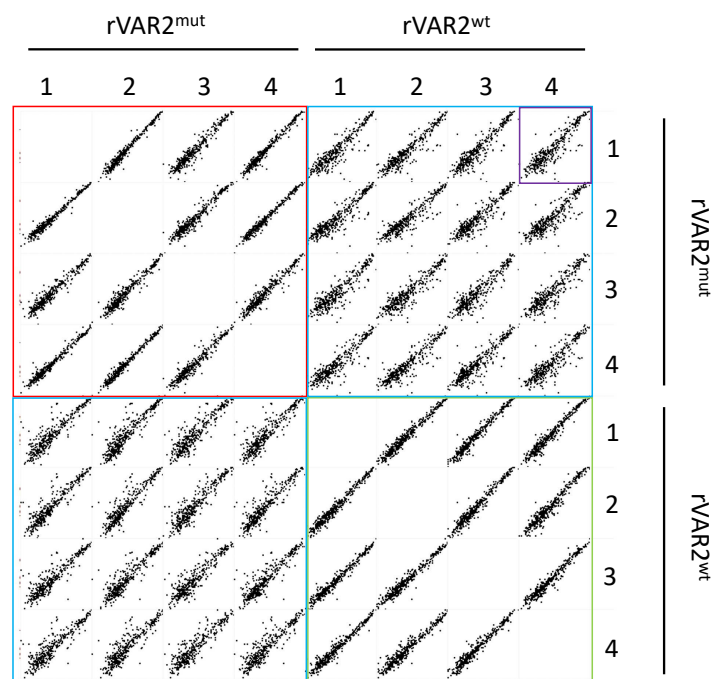


Abb. 20: Darstellung der Homogenität der MDA-MB-436 Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} im *Multiscatterplot*

Rot umrandet sind die *Scatterplots*, welche die Homogenität der Proben nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* untereinander zeigen. Grün umrandet sind die *Scatterplots*, welche die Homogenität der Proben nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* untereinander zeigen. Blau umrandet sind die *Scatterplots*, welche die Homogenität der Proben nach rVAR2^{wt}- und rVAR2^{mut}-*Pulldown* zueinander darstellen. Lila umrandet ist beispielhaft ein *Scatterplot*, welcher die Homogenität der Probe 4 nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* und der Probe 1 nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* zueinander darstellt.

Beispielhaft ist in Abbildung 21 ein *Scatterplot*, welcher in Abbildung 20 lila umrandet ist, vergrößert dargestellt. In Abbildung 21 wird die Homogenität der Proben rVAR2^{wt} Nummer 4 und rVAR2^{mut} Nummer 1 miteinander verglichen. Hierbei wird, wie auch im Polyacrylamid-Gel dargestellt (s. Abb. 19), erkennbar, dass die meisten Proteine in einem ähnlichen Verhältnis von rVAR2^{wt} sowie von rVAR2^{mut} gebunden wurden (s. Abb. 21). Jedoch können einige Ausreißer beobachtet

werden, welche vermehrt durch $rVAR2^{wt}$ und vermindert durch $rVAR2^{mut}$ gebunden wurden (s. Abb. 21). Beispielhaft ist ein solcher Ausreißer in Abbildung 21 orange umrandet. Dieser orange umrandete Punkt im *Scatterplot* stellt ein Protein dar, welches spezifisch von $rVAR2^{wt}$ gebunden wurde und somit ein gesuchtes potenzielles $rVAR2^{wt}$ -Zielprotein ist (s. Abb. 21). Des Weiteren sind einige Ausreißer erkennbar, beispielhaft braun umrandet, welche vermehrt von $rVAR2^{mut}$ und weniger durch $rVAR2^{wt}$ gebunden wurden (s. Abb. 21).

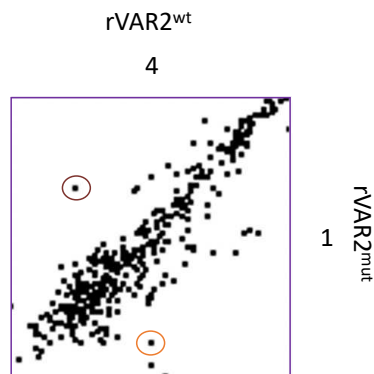


Abb. 21: Darstellung der Homogenität der $rVAR2^{wt}$ -Probe Nummer 4 und $rVAR2^{mut}$ -Probe Nummer 1 zueinander im *Scatterplot*

Der orange umrandete Punkt, stellt ein Protein dar, welches vermehrt durch $rVAR2^{wt}$ und vermindert durch $rVAR2^{mut}$ gebunden wurde. Der braun umrandete Punkt stellt ein Protein dar, welches vermehrt durch $rVAR2^{mut}$ und vermindert durch $rVAR2^{wt}$ gebunden wurde.

Auch in der *Hierarchical Cluster Analysis* ist die Homogenität der Proben der jeweiligen Bedingung nach *Pulldown* mit $rVAR2^{wt}$ und mit $rVAR2^{mut}$ dargestellt (s. Abb. 22). Anhand der *Cluster*-Analyse in Abbildung 22 wird deutlich, dass die Proben mit $rVAR2^{wt}$ und $rVAR2^{mut}$ Gemeinsamkeiten aufwiesen und sich die jeweiligen vier Proben mit $rVAR2^{wt}$ sowie die vier Proben mit $rVAR2^{mut}$ untereinander stark glichen sowie *Cluster* bildeten. Des Weiteren wird mittels der *Hierarchical Cluster Analysis* die Häufigkeit von verschiedenen Proteinen in den Proben mit $rVAR2^{wt}$ und $rVAR2^{mut}$ dargestellt (s. Abb. 22). Dabei kennzeichnet die Farbe Feuerrot ein hohes Vorkommen eines Proteins und die Farbe Gelb ein geringes Vorkommen eines Proteins in der jeweiligen Probe (s. Abb. 22). Die meisten Proben mit $rVAR2^{wt}$ und $rVAR2^{mut}$ in Abbildung 22 haben die gleiche Farbe. Demnach waren die meisten Proteine mit einer ähnlichen Häufigkeit in den Proben mit $rVAR2^{wt}$ und $rVAR2^{mut}$ vorhanden. Hieraus lässt sich schließen, dass die meisten Proteine unspezifisch von $rVAR2^{wt}$ sowie von $rVAR2^{mut}$ gebunden wurden. Einige Proteine waren jedoch vermehrt in Proben mit $rVAR2^{wt}$ und vermindert in Proben mit $rVAR2^{mut}$ vorhanden. Dies ist durch die rote Farbe der $rVAR2^{wt}$ -Proben und eine gelblichere Farbe der $rVAR2^{mut}$ -Proben erkennbar (s. Abb. 22). Beispielhaft sind drei solcher Bereiche, in Abbildung 22 blau umrandet. Proteine, welche vermehrt in Proben mit $rVAR2^{wt}$ vorhanden waren als in Proben mit $rVAR2^{mut}$, wurden spezifisch von $rVAR2^{wt}$ gebunden und stellen die gesuchten potenziellen $rVAR2^{wt}$ -Zielproteine mit ofCS-Modifikation dar.

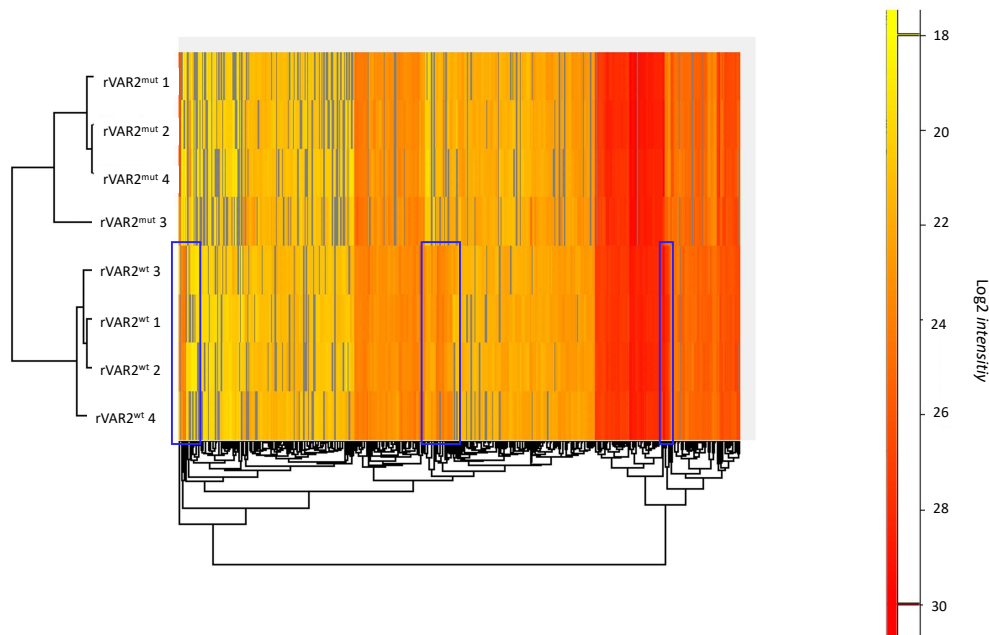


Abb. 22: Darstellung der *Hierarchical Cluster Analysis* der MDA-MB-436 Proben mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut}

Darstellung der Homogenität der MDA-MB-436 Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut}. Die Häufigkeit des Protein-Vorkommens ist anhand der Farbskala auf der rechten Bildseite dargestellt. Je öfter ein Protein in den Proben vorhanden war, desto intensiver die rote Farbe. Blau umrandet sind Bereiche, in denen Proteine häufiger in Proben mit rVAR2^{wt} vorhanden waren als in Proben mit rVAR2^{mut}.

Die Unterschiede in den detektierten Proteinen zwischen den Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und nach *Pulldown* mit rVAR2^{mut} sind in Abbildung 23 erkennbar. Auf der Abszisse ist die *Student's t-Test* Statistik der Proben mit rVAR2^{wt} sowie mit rVAR2^{mut} erkennbar (s. Abb. 23). Auf der Ordinate ist der *-Log Student's t-Test p-Value* der Proben mit rVAR2^{wt} und mit rVAR2^{mut} dargestellt (s. Abb. 23). Dabei sind die Proteine, welche signifikant und relevant häufiger in den Proben mit rVAR2^{wt} bzw. mit rVAR2^{mut} detektiert wurden, rot markiert (s. Abb. 23). Grau markiert sind Proteine, welche sich zwischen den Gruppen rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} nicht signifikant unterschieden haben (s. Abb. 23). Proteine, welche relevant häufiger durch rVAR2^{wt} gebunden wurden, also mit kleinem *Student's t-Test p-Value* und großer Differenz zwischen Proben mit rVAR2^{wt} und Proben mit rVAR2^{mut}, sind im *Volcano Plot* in der oberen rechten Bildecke zu finden (s. Abb. 23). Diese Proteine stellen die gesuchten potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine dar (s. Abb. 23). Beispiele für diese Proteine sind APLP2, CD44 und NRP1 (s. Abb. 23). Des Weiteren wurden einige Proteine signifikant vermehrt durch rVAR2^{mut} als durch rVAR2^{wt} gebunden, wie *FAU Ubiquitin Like and Ribosomal Protein S30 Fusion* (FAU) (s. Abb. 23).

Tabelle 9: Gennamen der jeweiligen potenziellen Zielproteine von rVAR2^{wt} auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen nach rVAR2-Pulldown und Massenspektrometrie-Analyse

MDA-MB-231	MDA-MB-436	MCF-7
NRP1	APLP2	PAF1
HLA-A	CD44	SDC1
APLP2	NRP1	LEO1
MMP14	CSPG4	SQSTM1
HLA-C;HLA-Cw	PAF1	HADHB
DLAT	WDR61	HADHA
GLG1	ABCD3	PODXL2
GTF2I	TMEM154	CD44
PRDX4	HLA-A;HLA-C; HLA-Cw	ZRANB2
WDR61	TPP2	APLP2
PAF1	MGST1	PLXNB1
CD74	CSF1	WDR61
LEO1	PODXL2	GTF2I
SQSTM1	SDC1	CDC73
TPP2	GTF2I	SDC4
SRGN	DLAT	AGRN
HADHB	SQSTM1	GLG1
HLA-B	GLG1	MVP
LAMC1	LRPPRC	SULF2
SDC1	MVP	UBTF
CSF1	OSBPL8	LAMC1
CD44	HADHB	OSBPL8
LAMB1	SRPX	LAMA5
MRPS34	LAMB1	LAMB2
ABCD3	SLIRP	XRCC5
KCTD10	HADHA	SF3B2
PDHX	LAMC1	GPC4
TFRC	SDC4	RPA1
OSBPL8	CAV1	COL18A1
AGRN	IMMT	XRCC6
PTRF	CCT6A	STAU2
HADHA	CCT3	COL12A1
CAV1	ATP5B	MUC5B
ERLIN1	EWSR1	LRPPRC
CSPG4	CHCHD3	MAGT1
SDC4	ATP5A1	RPS12
APP	FGF2	YBX1

MDA-MB-231	MDA-MB-436	MCF-7
SRPX	GPC1	RRP12
LACTB	PTRF	
LAMA5	XRCC5	
SDC2	VDAC2	
XRCC5	CHD1L	
LGALS1	HSP90AB1;HSP90AA1	
CAV2	GPC4	
CDC73	CCT8	
XRCC6	XRCC6	
KCTD13	YTHDF2	
AXL	PKM	
ERLIN2	ATAD3B	
UBTF	TCP1	
RPS12	GPC6	
BYSL	GTF3C3	
SSB	EEF1G	
LRP10	SDC2	
COL13A1	HIST1H1B	
ITM2B	HSPD1	
HNRNPC;HNRN- PCL3;HNRNPCL1;HNRN- PCL4;HNRNPCL2	GAPDH	
KRR1	BYSL	
TRA2A	VAPA	
	ATAD3A	
	PHB	
	TUBA1C;TUBA1B;TUBA8	
	SF3B3	
	KTN1	
	PHB2	
	HNRNPC	
	VIM	
	PURB	
	PABPC1;PABPC3	
	MTCH2	
	MAGT1	
	SRP9;DKFZp564M2223	
	ACP1	
	SLC25A3	

MDA-MB-231	MDA-MB-436	MCF-7
	TUBB4B;TUBB4A	
	TMCO1	
	MGST3	
	HIGD1A	
	CCT7	
	RPS12	
	EIF2B5	
	UPF1	
	MAGOHB;MAGOH	
	PABPC4	
	CDC73	
	ATP5O	
	RPA1	
	RPN1	
	CYC1	
	CCT2	
	SGPL1	
	ASPH	
	LARP1	
	RBM4	
	FAM120A	
	GNB2L1	
	RRP12	
	IARS	
	DDX6	
	ATXN2L	
	GTF3C5	
	RARS	
	AGRN	
	FUS	
	EPRS	
	SRSF7	
	KRR1	
	HIST1H4A	

Auflistung der Gennamen der jeweiligen signifikanten und relevanten potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen nach Massenspektrometrie und statistischer Auswertung mittels *Student's t-Test*, *Significance Analysis of Microarrays*, bei einer *False Discovery Rate* von 5 %. Die Gennamen, die für die jeweiligen Proteine codieren, sind nach *Student's t-Test* Test-Statistik sortiert. Die entsprechend zugehörigen Proteinennamen der hier aufgelisteten Gene sind dem Anhang 6.4 zu entnehmen.

Insgesamt wurden 115 Proteine auf den MDA-MB-436 Zellen, 63 Proteine auf den MDA-MB-231 und 38 Proteine auf den MCF-7 Zellen identifiziert, welche signifikant und relevant häufiger von rVAR2^{wt} als von rVAR2^{mut} gebunden wurden (s. Tabelle 9). Proteine, welche signifikant und relevant häufiger von rVAR2^{wt} gebunden wurden, stellen potenzielle rVAR2^{wt}-Zielproteine dar. Hieraus folgt, dass in der Massenspektrometrie die meisten potenziellen Zielproteine von rVAR2^{wt} auf MDA-MB-436 Zellen, gefolgt von MDA-MB-231 Zellen, gefunden wurden. Die wenigsten potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine konnten auf MCF-7 Zellen detektiert werden.

Bei den MDA-MB-231 Zellen wurde NRP1 als Protein mit dem größten Wert in der *Student's t-Test* Test-Statistik identifiziert, gefolgt von *Major Histocompatibility Complex Klasse 1 A* und APLP2 (s. Tabelle 9). Im Vergleich wurde bei den MDA-MB-436 Zellen APLP2 mit der größten *Student's t-Test* Test-Statistik detektiert, gefolgt von CD44 und NRP1 (s. Tabelle 9). Im Fall der MCF-7 Zellen wurde *RNA Polymerase II-Associated Factor 1 Homolog* als Protein mit dem größten *Student's t-Test* Test-Statistik Wert identifiziert, gefolgt von SDC1 und *RNA Polymerase-Associated Protein LEO1* (LEO1) (s. Tabelle 9).

Von allen detektierten potenziellen rVAR2-Zielproteinen, wurden 74 mögliche Zielproteine ausschließlich auf MDA-MB-436 Zellen, 26 potenzielle Zielproteine ausschließlich auf MDA-MB-231 Zellen und 10 mögliche Zielproteine ausschließlich auf MCF-7 Zellen identifiziert (s. Abb. 24). Zudem wurde durch den Vergleich der potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine auf den drei MaCa-Zelllinien deutlich, dass 18 aller detektierten signifikanten potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine auf allen drei MaCa-Zelllinien detektiert wurden (s. Abb. 24). Diese sind in Tabelle 10 aufgelistet. Des Weiteren wurden 16 aller potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine auf den beiden triple-negativen MaCa-Zelllinien detektiert (s. Abb. 24), welche in Tabelle 10 dargestellt sind. Es wurden drei mögliche rVAR2^{wt}-Zielproteine sowohl auf MDA-MB-231 als auch auf MCF-7 Zellen detektiert (s. Abb. 24). Diese drei Proteine sind LEO1, *Laminin Subunit Alpha 5* (LAMA5) und *Upstream Binding Transcription Factor* (UBTF) (s. Tabelle 10). Sieben potenzielle rVAR2^{wt}-Zielproteine wurden auf MDA-MB-436 sowie auf MCF-7 Zellen identifiziert (s. Abb. 24) und in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Auflistung der Gennamen der jeweiligen gemeinsamen potenziellen Zielproteine von rVAR2^{wt} auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen nach rVAR2-Pulldown und Massenspektrometrie-Analyse

MDA-MB-436, MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen	MDA-MB-436 und MDA-MB-231 Zellen	MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen	MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen
APLP2	ABCD3	LAMA5	LRPPRC
AGRN	BYSL	LEO1	GPC4
CD44	CAV1	UBTF	MAGT1
CDC73	CSF1		MVP
GLG1	CSPG4		PODXL2

MDA-MB-436, MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen	MDA-MB-436 und MDA-MB-231 Zellen	MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen	MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen
GTF2I	DLAT		RPA1
HADHA	HLA-A		RRP12
HADHB	HLA-C		
LAMC1	HNRNPC		
OSBPL8	KRR1		
PAF1	LAMB1		
RPS12	NRP1		
SDC1	PTRF		
SDC4	SDC2		
SQSTM1	SRPX		
WDR61	TPP2		
XRCC5			
XRCC6			

Die entsprechend zugehörigen Proteinennamen der hier aufgelisteten Gene sind dem Anhang 6.4 zu entnehmen. Die Gennamen sind in der Tabelle alphabetisch sortiert.

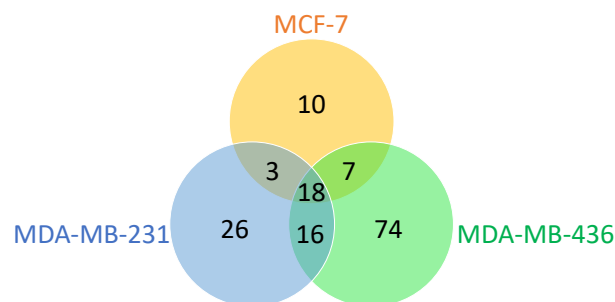


Abb. 24: Darstellung der Anzahl und Gemeinsamkeiten der potenziellen Zielproteine von rVAR2^{wt} auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen mittels Venn-Diagramm

3.3 Auswahl der rVAR2-Zielproteine mittels Literaturrecherche für die anschließende Western Blot-Analyse

Im Anschluss an die Massenspektrometrie wurde mittels Literaturrecherche eine Auswahl an potenziellen Zielproteinen von rVAR2^{wt} für die nachfolgende Validierung mittels Western Blot getroffen. Hierfür wurden zunächst mit Hilfe des Humanen Proteinatlas (100,101) sowie mittels UniProt, Verwendung von *UniProt Annotations*, wenn angegeben, (97) die Lokalisation sowie Glykosylierung der Proteine betrachtet.

Bei Bestimmung der Lokalisation der möglichen rVAR2-Zielproteine wurde besonderes auf das Vorhandensein der Proteine auf der Zelloberfläche geachtet, da dies von großer Bedeutung für die mögliche Verwendung von rVAR2 im Rahmen der *Liquid Biopsy* ist. Das rVAR2-Protein kann nur

an ofCS-modifizierten MaCa-Zellen im Blut binden, wenn die ofCS-modifizierten rVAR2-Zielproteine auf der Oberfläche der Tumorzelle exprimiert werden. Proteine mit einer ofCS-Modifikation, welche im Zellinneren exprimiert werden, würden bei intakter Zellmembran nicht von rVAR2 gebunden werden können.

Es wurde die Lokalisation von gemeinsamen potenziellen Zielproteinen von rVAR2^{wt} auf allen drei MaCa-Zelllinien sowie von gemeinsamen möglichen rVAR2^{wt}-Zielproteinen auf jeweils zwei MaCa-Zelllinien betrachtet. Von den 18 gemeinsamen potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteinen auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen kommen sechs Proteine auf der Zelloberfläche vor. Zu diesen sechs möglichen rVAR2^{wt}-Zielproteinen auf der Zelloberfläche gehören CD44, SDC4, APLP2, AGRN, *Laminin Subunit Gamma 1* (Lamc1) sowie SDC1 (s. Tabelle 11). Des Weiteren wurden von den 16 gemeinsamen potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteinen auf den triple-negativen MaCa-Zelllinien, folgende neun Proteine als Zelloberflächenproteine identifiziert: *Colony Stimulating Factor 1* (CSF1), *Caveolae Associated Protein 1*, Caveolin 1, CSPG4, NRP1, SRPX, SDC2, *Major Histocompatibility Complex, Class I, A* und *Major Histocompatibility Complex, Class I, C* (s. Tabelle 11). Zudem wurden vier potenzielle rVAR2^{wt}-Zielproteine, welche auf MDA-MB-436 sowie MCF-7 Zellen detektiert wurden, als Zelloberflächenproteine ermittelt. Zu diesen vier Proteinen gehören GPC4, *Podocalyxin Like 2*, Magnesium Transporter 1 und *Ribosomal RNA Processing 12 Homolog* (RRP12) (s. Tabelle 11). Es wurde keines der drei gemeinsamen potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine auf MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen als Zelloberflächenprotein identifiziert.

Tabelle 11: Übersicht der potenziellen Zielproteine von rVAR2^{wt} auf Mammakarzinom-Zellen mit Lokalisation auf der Zelloberfläche

MDA-MB-436, MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen	MDA-MB-436 und MDA-MB-231 Zellen	MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen
Aggrin	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>	Glypican 4
<i>Amyloid Beta Precursor like Protein 2</i>	<i>Caveolae Associated Protein 1</i>	Magnesium Transporter 1
CD44	Caveolin 1	<i>Podocalyxin Like 2</i>
<i>Laminin Subunit Gamma 1</i>	<i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4</i>	<i>Ribosomal RNA Processing 12 Homolog</i>
Syndecan 1	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, A</i>	
Syndecan 4	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, C</i>	
	Neuropilin 1	
	<i>Sushi Repeat-Containing Protein X-Linked</i>	
	Syndecan 2	

In Fettdruck hervorgehoben wurden Proteine, welche glykosyliert sind. Die Proteine sind in der Tabelle alphabetisch sortiert. Es wurden keine gemeinsamen potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine auf der Zelloberfläche von MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen gefunden.

Anschließend wurde die Glykosylierung der durch rVAR2^{wt} gebundenen Zelloberflächenproteine mittels Literaturrecherche betrachtet. Diese ist von Bedeutung, da rVAR2^{wt} allein an ofCS-glykosylierte Proteoglykane bindet. Hierbei wurden die 19 von rVAR2^{wt} gebundenen Zelloberflächenproteine aus Tabelle 11 betrachtet. Durch die Literaturrecherche konnte nachgewiesen werden, dass die folgenden 16 der in Tabelle 11 aufgelisteten Proteine glykosyliert sind: CD44, SDC4, SDC1, SDC2, AGRN, Lamc1, CSF1, CSPG4, NRP1, GPC4, APLP2, SRPX, *Podocalyxin Like 2*, Magnesium Transporter 1, *Major Histocompatibility Complex, Class I, A* und *Major Histocompatibility Complex, Class I, C*. Eine Auflistung über potenzielle von rVAR2^{wt} gebundenen Zelloberflächenproteine auf jeweils einer einzelnen MaCa-Zelllinie ist der Tabelle 16 im Anhang 6.5 zu entnehmen.

Im Anschluss wurden die identifizierten potenziellen rVAR2^{wt}-Zielproteine, welche auf der Zelloberfläche vorhanden und glykosyliert sind, mit bereits bekannten rVAR2-Zielproteinen verglichen. Hierfür wurde eine weitere Literaturrecherche durchgeführt. Dabei konnten CD44, SDC4, SDC1, SDC2, CSPG4, NRP1, GPC4 (72), AGRN, APLP2 und SRPX (86) als bekannte rVAR2-Zielproteine gefunden werden. Lamc1, CSF1, *Podocalyxin Like 2*, Magnesium Transporter 1, *Major Histocompatibility Complex, Class I, A* und *Major Histocompatibility Complex, Class I, C* wurden bisher noch nicht als rVAR2-Zielproteine identifiziert und stellen somit mögliche, derzeit noch unbekannte rVAR2-Zielproteine dar (72,86,102).

Zusammenfassend wurden mittels rVAR2-Pulldown, Massenspektrometrie und Literaturrecherche die folgenden 16 Zelloberflächenproteine als mögliche Zielproteoglykane von rVAR2^{wt} identifiziert: CD44, SDC4, SDC1, SDC2, AGRN, Lamc1, CSF1, CSPG4, NRP1, GPC4, APLP2, SRPX, *Podocalyxin Like 2*, Magnesium Transporter 1, *Major Histocompatibility Complex, Class I, A* und *Major Histocompatibility Complex, Class I, C*. Dabei sind Lamc1, CSF1, *Podocalyxin Like 2*, Magnesium Transporter 1, *Major Histocompatibility Complex, Class I, A* und *Major Histocompatibility Complex, Class I, C* noch unbekannte potenzielle Zielproteine von rVAR2^{wt}.

3.4 Validierung der detektierten rVAR2-Zielproteine mittels Western Blot-Analyse

Nach abgeschlossener Literaturrecherche wurden die folgenden drei, mittels Massenspektrometrie detektierten, potenziellen rVAR2-Zielproteine NRP1, CD44 sowie Lamc1 mithilfe einer Western Blot-Analyse validiert.

3.4.1 Validierung von Neuropilin 1 als rVAR2-Zielprotein mittels Western Blot-Analyse

Zunächst wurde NRP1 als rVAR2-Zielprotein auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen mittels Western Blot validiert. Hier wird auf den Abschnitt 3.1.3 verwiesen, in dem die Ergebnisse der Western Blot-Analyse der Expression von NRP1 auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen bereits beschrieben wurden. NRP1 wird auf allen drei MaCa-Zelllinien, jedoch v. a. von triple-negativen MaCa-Zellen, exprimiert. Auf den luminalen MCF-7 Zellen ist NRP1 nur sehr schwach vorhanden. Das rVAR2-Protein detektiert am meisten NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen, gefolgt von NRP1 auf MDA-MB-436 Zellen (s. 3.1.3).

Nach dem rVAR2^{wt}-*Pulldown* wurde in der Probe der MDA-MB-231 Zellen ein Signal mit starker Intensität bei ca. bei 270 kDa sowie ein schwächeres Signal auf Höhe von etwa 140 kDa sichtbar (s. Abb. 25). In der Probe der MDA-MB-436 Zellen wurde nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* auch ein Signal bei ca. 270 kDa detektiert. Das Signal im Fall der MDA-MB-436 Zellen war im Vergleich zur Probe der MDA-MB-231 Zellen schwächer (s. Abb. 25). In der Probe der MCF-7 Zellen war nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* kein Signal erkennbar (s. Abb. 25).

Bei Co-Präzipitation mit rVAR2^{mut} wurden nahezu keine Signale in den Proben der drei MaCa-Zelllinien sichtbar (s. Abb. 25). Im Fall der MDA-MB-231 Zellen wurde nach dem rVAR2^{wt}-*Pulldown* eine Signalintensität von 16.354 aE detektiert (SD +/- 11.795,12 aE) (s. Abb. 26). Im Gegensatz dazu wurde im Fall der MDA-MB-231 Zellen nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* eine sehr schwache Signalintensität von 75,81 aE ermittelt (SD +/- 131,31 aE) (s. Abb. 26). Der Unterschied der Signalintensität zwischen den MDA-MB-231 Zellen nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* war statistisch signifikant (s. Abb. 26). Bei den MDA-MB-436 Zellen wurde nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* eine Signalintensität von 2.810 aE nachgewiesen (SD +/- 1.040,84 aE), während nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* eine Signalintensität von 0 aE detektiert wurde (SD +/- 0 aE) (s. Abb. 26). Der Vergleich der Signalstärke zwischen den MDA-MB-436 Zellen nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* war statistisch signifikant (s. Abb. 26). Hieraus folgt, dass das rVAR2^{mut}-Protein kaum an NRP1 bindet.

Zusammenfassend konnte durch die Western Blot-Validierung NRP1 als ein spezifisches ofCS-modifiziertes Zielprotein von rVAR2^{wt} auf den triple-negativen MaCa-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 Zellen identifiziert werden. Hierbei ließ sich die stärkste Bindung von rVAR2^{wt} an NRP1 auf MDA-MB-231 Zellen beobachten. NRP1 stellt kein Zielprotein von rVAR2^{wt} auf den luminalen MCF-7 Zellen dar. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Massenspektrometrie überein, in denen NRP1 als Zielprotein von rVAR2^{wt} auf MDA-MB-231 und MDA-MB-436 Zellen, jedoch nicht auf MCF-7 Zellen, identifiziert wurde (s. Tabelle 10).

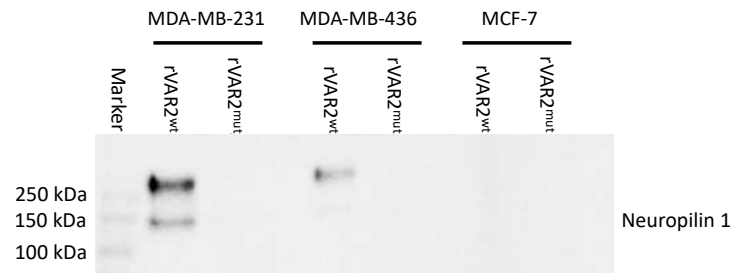


Abb. 25: Exemplarische Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an Neuropilin 1 auf triple-negativen und luminalen Brustkrebszelllinien
kDa = Kilodalton, N = 3.

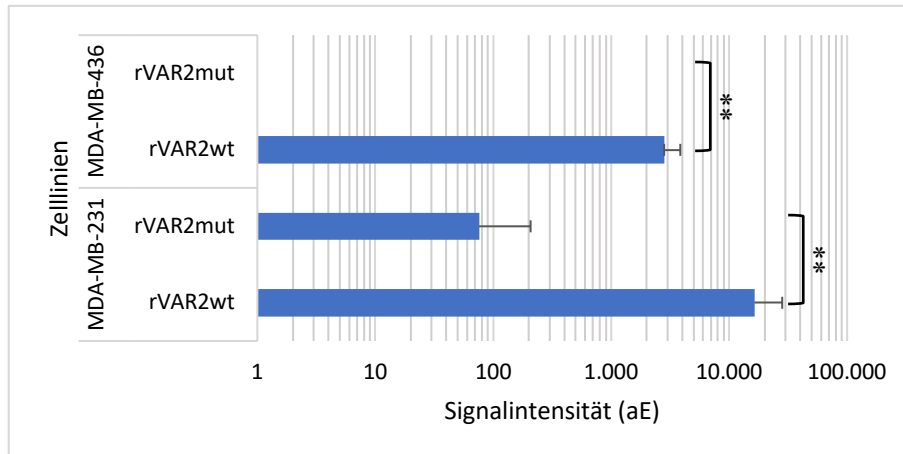


Abb. 26: Signalintensität des von rVAR2^{wt}- und rVAR2^{mut}-detektierten Neuropilin 1 auf triple-negativen Mammakarzinom-Zellen

Statistischer Test mit *Two-way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparisons Test* mit logarithmierten Werten zur Basis 10, der Wert „0“ wurde nicht logarithmiert. ** = $p < 0,01$, MDA-MB-231 rVAR2^{wt} vs. MDA-MB-231 rVAR2^{mut}: $p = 0,0017$, MDA-MB-436 rVAR2^{wt} vs. MDA-MB-436 rVAR2^{mut}: $p = 0,0015$. aE = artifizielle Einheiten, N = 3.

3.4.2 Validierung von CD44 als rVAR2-Zielprotein mittels Western Blot-Analyse

Des Weiteren wurde CD44 als rVAR2-Zielprotein auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen mittels Western Blot validiert. Im Lysat der MDA-MB-231 und MDA-MB-436 Zellen wurde ein Signal mit starker Intensität bei ca. 80 kDa detektiert (s. Abb. 27). Dabei war das Signal der MDA-MB-436 Zellen stärker ausgeprägt als das Signal der MDA-MB-231 Zellen (s. Abb. 27). Im Lysat der MCF-7 Zellen wurde ein sehr schwaches Signal bei ca. 80 kDa festgestellt (s. Abb. 27). Nach Hinzugabe von Anti- β -Aktin konnte ein starkes Signal im Lysat aller drei MaCa-Zelllinien auf Höhe von ca. 42 kDa detektiert werden (s. Abb. 27).

Die CD44-Expression auf allen drei MaCa-Zelllinien wurde anhand der Signalintensität im Western Blot miteinander verglichen (s. Abb. 28). Die Signalintensität von CD44 im Lysat der MDA-MB-436 Zellen war mit 39.677 aE (SD $\pm$ 16.410 aE) am stärksten, gefolgt von dem Signal der MDA-MB-231 Zellen mit einer Signalintensität von 32.169 aE (SD $\pm$ 8929 aE) (s. Abb. 28). Es bestand

kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von CD44 auf MDA-MB-231 und MDA-MB-436 Zellen. Die CD44-Expression der MCF-7 Zellen war, mit einer Signalintensität von 730 aE (SD $\pm$ 641 aE), am geringsten (s. Abb. 28). Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied bei Vergleich der CD44-Expression zwischen MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen, sowie zwischen MCF-7 und MDA-MB-436 Zellen.

Daraus folgt, dass CD44 von allen drei MaCa-Zelllinien, jedoch v. a. von den triple-negativen MaCa-Zellen, exprimiert wird. MDA-MB-436 Zellen exprimieren am meisten CD44, gefolgt von MDA-MB-231 Zellen. Die MCF-7 Zellen exprimieren am wenigsten CD44.

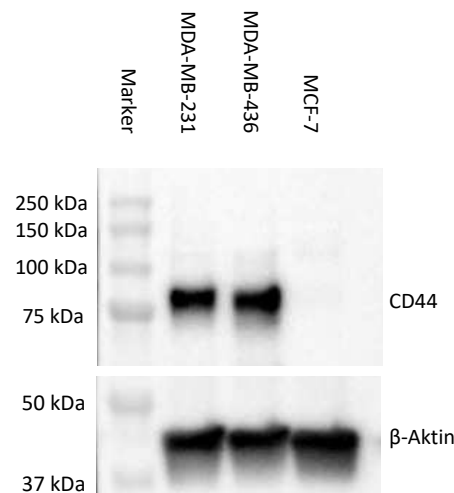


Abb. 27: Exemplarische Darstellung der CD44-Expression von triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen

CD44-Expression sowie β -Aktin-Expression von triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen. kDa = Kilodalton, N = 4.

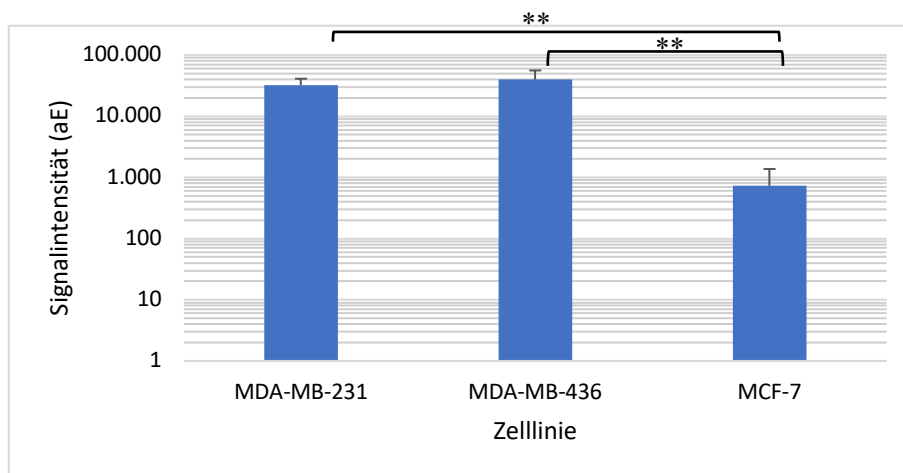


Abb. 28: Darstellung der Signalintensität der Expression von CD44 auf triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zelllinien

Statistischer Test mit *Ordinary One-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparisons Test*, ** = $p < 0,01$, MDA-MB-231 vs. MDA-MB-436: $p = 0,6045$, MDA-MB-231 vs. MCF-7: $p = 0,0066$, MDA-MB-436 vs. MCF-7: $p = 0,0017$. aE = artifizielle Einheiten, N = 4.

Die Abbildung 29 stellt die Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an CD44 auf triple-negativen und luminalen MaCa-Zellen dar. In der Probe der MDA-MB-436 Zellen wurde nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* ein Signal bei ca. 250 kDa sichtbar (s. Abb. 29). Nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* wurde in der Probe der MDA-MB-231 Zellen ein geringes Signal bei ca. 250 kDa erkennbar, welches im Vergleich zur Probe der MDA-MB-436 Zellen deutlich schwächer ausgeprägt war (s. Abb. 29). In der Probe der MCF-7 Zellen wurde nach Co-Präzipitation mit rVAR2^{wt} ein sehr schwaches Signal bei ca. 250 kDa detektiert (s. Abb. 29). Bei Co-Präzipitation mit rVAR2^{mut} wurden keine Signale in den Proben aller drei MaCa-Zelllinien erkennbar (s. Abb. 29).

In der Abbildung 30 sind die Signalintensitäten des von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} detektierten CD44 auf den drei MaCa-Zelllinien dargestellt. Im Fall der MDA-MB-436 Zellen wurde im Ansatz nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* die im Vergleich stärkste Signalintensität mit 9.873 aE detektiert (SD +/- 13.987,69 aE) (s. Abb. 30). Hingegen wurde bei den MDA-MB-436 Zellen im Ansatz nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* eine Signalintensität von 0 aE festgestellt (SD +/- 0 aE) (s. Abb. 30). Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied der Signalintensität zwischen den MDA-MB-436 Zellen nach rVAR2^{wt}- und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* (s. Abb. 30). Im Fall der MDA-MB-231 Zellen wurde nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* eine Signalintensität von 99 aE detektiert (SD +/- 116,36 aE), während im Ansatz nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* eine Signalintensität von 0 aE nachgewiesen wurde (SD +/- 0 aE) (s. Abb. 30). Bei den MCF-7 Zellen wurde im Ansatz nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* eine Signalintensität von 101 aE (SD +/- 129,42 aE) und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* eine Signalintensität von 0 aE (SD +/- 0 aE) detektiert (s. Abb. 30). Der Unterschied der Signalintensität zwischen den MDA-MB-231 Zellen im Ansatz nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown*, sowie der Unterschied der Signalintensität zwischen den MCF-7 Zellen im Ansatz nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* war nicht statistisch signifikant (s. Abb. 30). Jedoch waren die Signale des *Pulldowns* mit rVAR2^{wt} jeweils stärker ausgeprägt als die Signale des *Pulldowns* mit rVAR2^{mut} (s. Abb. 30). Es wurde ersichtlich, dass – auch wenn im Fall der MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen nicht signifikant – CD44 nicht von rVAR2^{mut} gebunden wird.

Zusammenfassend konnte durch die Western Blot-Validierung CD44 als spezifisches ofCS-modifiziertes Zielprotein von rVAR2^{wt} auf den triple-negativen MaCa-Zellen MDA-MB-436 identifiziert werden. Es wurde nur eine schwache Bindung des rVAR2^{wt}-Proteins an CD44 auf MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen detektiert. Diese Ergebnisse unterschieden sich mit denen der Massenspektrometrie. In der Massenspektrometrie wurde CD44 als ein signifikantes rVAR2^{wt}-Zielprotein mit einem jeweils großen Wert in der *Student's t-Test* Test-Statistik bei allen drei MaCa-Zelllinien detektiert (s. Tabelle 9).

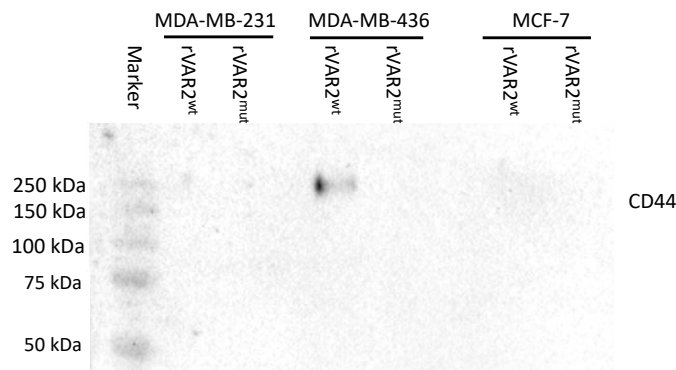


Abb. 29: Exemplarische Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an CD44 auf triple-negativen und luminalen Brustkrebszellen

kDa = Kilodalton, N = 3.

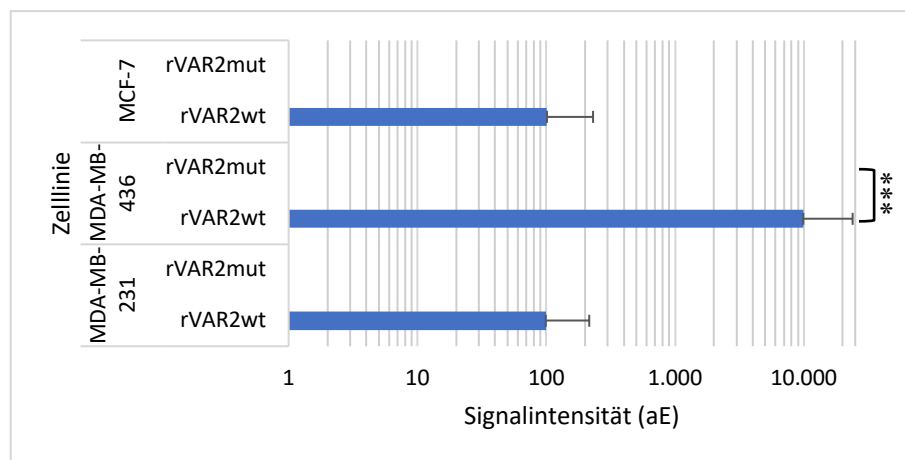


Abb. 30: Signalintensität des von rVAR2^{wt}- und rVAR2^{mut}-detektierten CD44 auf triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen

Statistischer Test mit *Two-way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparisons Test* mit logarithmierten Werten zur Basis 10, der Wert „0“ wurde nicht logarithmiert. *** = $p < 0,001$, MCF-7 rVAR2^{wt} vs. MCF-7 rVAR2^{mut}: $p = 0,3014$, MDA-MB-436 rVAR2^{wt} vs. MDA-MB-436 rVAR2^{mut}: $p = 0,0009$, MDA-MB-231 rVAR2^{wt} vs. MDA-MB-231 rVAR2^{mut}: $p = 0,2893$. aE = artifizielle Einheiten, N = 3.

3.4.3 Validierung von *Laminin Subunit Gamma 1* als rVAR2-Zielprotein mittels Western Blot-Analyse

Des Weiteren wurde Lamc1 als rVAR2-Zielprotein auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen mittels Western Blot validiert. Im Lysat der triple-negativen MaCa-Zelllinien wurde ein starkes Signal bei etwa 250 kDa erkennbar (s. Abb. 31). Dabei war das Signal des Lysats der MDA-MB-436 Zellen im Vergleich zum Signal des Lysats der MDA-MB-231 Zellen etwas stärker ausgeprägt (s. Abb. 31). Im Lysat der MCF-7 Zellen wurde ein, im Vergleich zu den triple-negativen MaCa-Zellen, schwächeres Signal bei ca. 250 kDa detektiert (s. Abb. 31). Nach Hinzugabe von Anti- β -Aktin als zweiten Primärantikörper wurde ein starkes Signal auf Höhe von ca. 42 kDa im Lysat von allen MaCa-Zelllinien sichtbar (s. Abb. 31).

Zum Vergleich der Lamc1-Expression zwischen den Zelllinien wurden die Signalintensitäten betrachtet (s. Abb. 32). Die Signalintensität der MDA-MB-436 Zellen war mit 22.728 aE (SD +- 7333 aE) am stärksten, gefolgt von dem Signal der MDA-MB-231 Zellen mit einer Intensität von 20.549 aE (SD +- 6761 aE) (s. Abb. 32). Der Unterschied in der Expression von Lamc1 auf MDA-MB-231 vs. MDA-MB-436 Zellen war nicht statistisch signifikant. Die MCF-7 Zellen zeigten die schwächste Signalintensität der Lamc1-Expression mit 9.436 aE (SD +- 5162 aE) (s. Abb. 32). Der Unterschied in der Expression von Lamc1 von MDA-MB-231 im Vergleich zur Lamc1-Expression von MCF-7 Zellen war nicht statistisch signifikant. Jedoch bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von Lamc1 von MDA-MB-436 vs. von MCF-7 Zellen (s. Abb. 32). Hieraus folgt, dass Lamc1 von allen drei MaCa-Zelllinien, jedoch v. a. von triple-negativen MaCa-Zellen, exprimiert wird. Lamc1 wurde am stärksten in den Proben der MDA-MB-436 Zellen detektiert, gefolgt von den Proben der MDA-MB-231 Zellen.

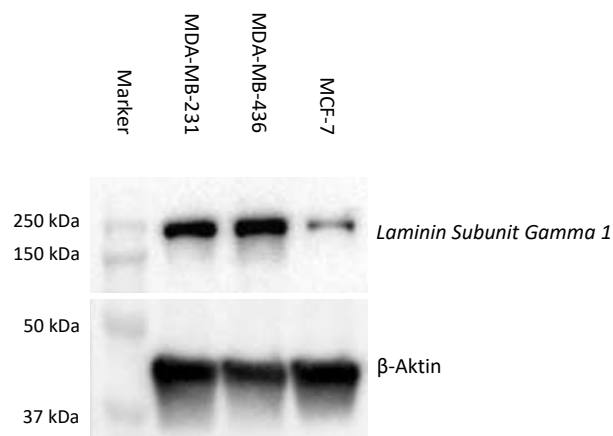


Abb. 31: Exemplarische Darstellung der Expression von *Laminin Subunit Gamma 1* auf triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen

Expression von *Laminin Subunit Gamma 1* und β-Aktin von triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen. kDa = Kilodalton, N = 4.

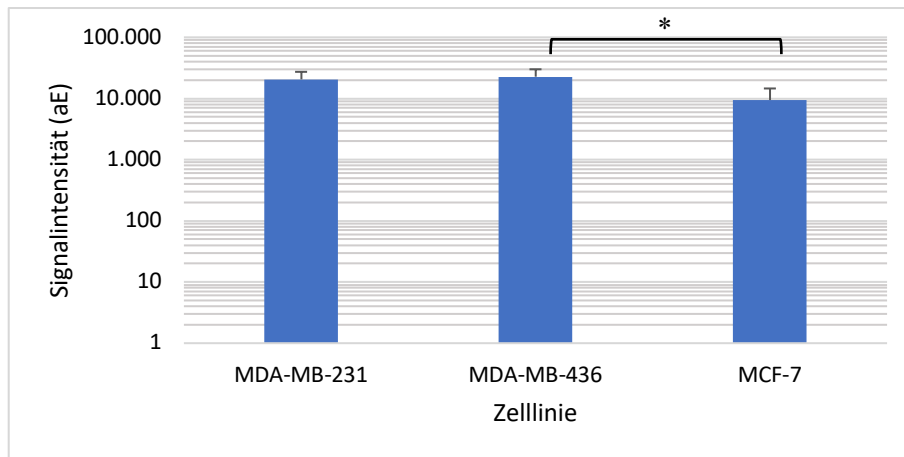


Abb. 32: Darstellung der Signalintensität der Expression von *Laminin Subunit Gamma 1* auf triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zelllinien

Statistischer Test mit *Ordinary One-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparisons Test*; * = $p < 0,05$, MDA-MB-231 vs. MDA-MB-436: $p = 0,8845$, MDA-MB-231 vs. MCF-7: $p = 0,0886$, MDA-MB-436 vs. MCF-7: $p = 0,0423$. aE = artifizielle Einheiten, N = 4.

Nach dem rVAR2^{wt}-*Pulldown* wurde in den Ansätzen der MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen ein schwaches Signal bei ca. 250 kDa sichtbar (s. Abb. 33). Bei Co-Präzipitation mit rVAR2^{mut} wurden deutlich schwächere Signale in den Ansätzen der triple-negativen MaCa-Zelllinien erkennbar (s. Abb. 33). Bei den MCF-7 Zellen wurde nach Co-Präzipitation mit rVAR2^{mut} ein leichtes Signal bei etwa 250 kDa sichtbar (s. Abb. 33).

Bei Vergleich der Signalintensität wurde im Ansatz der MDA-MB-231 Zellen nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* eine Signalintensität von 6.025 aE detektiert (SD +/- 6.616,34 aE) (s. Abb. 34). Nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* wurde im Ansatz der MDA-MB-231 Zellen hingegen eine Signalintensität von 979 aE festgestellt (SD +/- 1519,47 aE) (s. Abb. 34). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Signalstärke zwischen den MDA-MB-231 Zellen nach rVAR2^{wt}- und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* (s. Abb. 34). Das Signal des Ansatzes mit rVAR2^{wt} war jedoch deutlich stärker ausgeprägt als das Signal des Ansatzes mit rVAR2^{mut} (s. Abb. 33). Im Fall der MDA-MB-436 Zellen wurde nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* eine Signalintensität von 1.448 aE detektiert (SD +/- 876,52 aE), während nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* eine Signalintensität von 0 aE festgestellt wurde (SD +/- 0 aE) (s. Abb. 34). Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Signalintensität zwischen dem Ansatz der MDA-MB-436 Zellen nach rVAR2^{wt}- und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* (s. Abb. 34). Im Ansatz der MCF-7 Zellen wurde nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* eine Signalintensität von 1.823 aE festgestellt (SD +/- 1856,91 aE), während nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* eine Signalintensität von 181 aE detektiert wurde (SD +/- 214,3 aE) (s. Abb. 34). Der Unterschied in der Signalstärke zwischen den MCF-7 Zellen nach rVAR2^{wt}- und nach rVAR2^{mut}-*Pulldown* war nicht statistisch signifikant, wobei das Signal des Ansatzes mit rVAR2^{wt} stärker ausgeprägt war als das Signal des Ansatzes mit rVAR2^{mut} (s. Abb. 33).

Durch die Western Blot-Validierung wurde Lamc1 als ein Zielprotein von rVAR2^{wt} auf den MaCa-Zellen MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 identifiziert. Das rVAR2^{wt}-Protein bindet Lamc1 v. a. auf MDA-MB-231 Zellen, gefolgt von MCF-7 Zellen (s. Abb. 34). Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Massenspektrometrie überein, in denen Lamc1 als ein mögliches rVAR2^{wt}-Zielprotein auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zelllinien detektiert wurde (s. Tabelle 10). Im Gegensatz zu keiner bzw. einer minimalen Signalintensität bei der Bindung von rVAR2^{mut} an NRP1 und CD44 auf allen drei MaCa-Zelllinien, konnte eine Bindung von rVAR2^{mut} an Lamc1, v. a. auf MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen festgestellt werden.

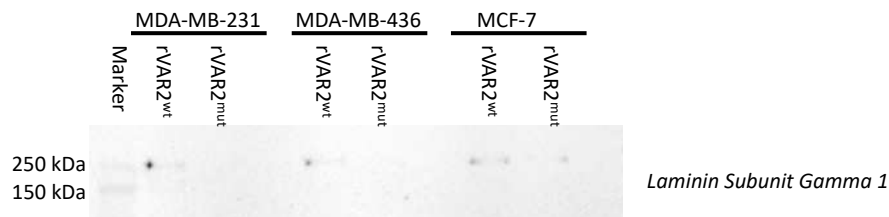


Abb. 33: Exemplarische Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an *Laminin Subunit Gamma 1* auf triple-negativen und luminalen Brustkrebszellen
kDa = Kilodalton, N=3.

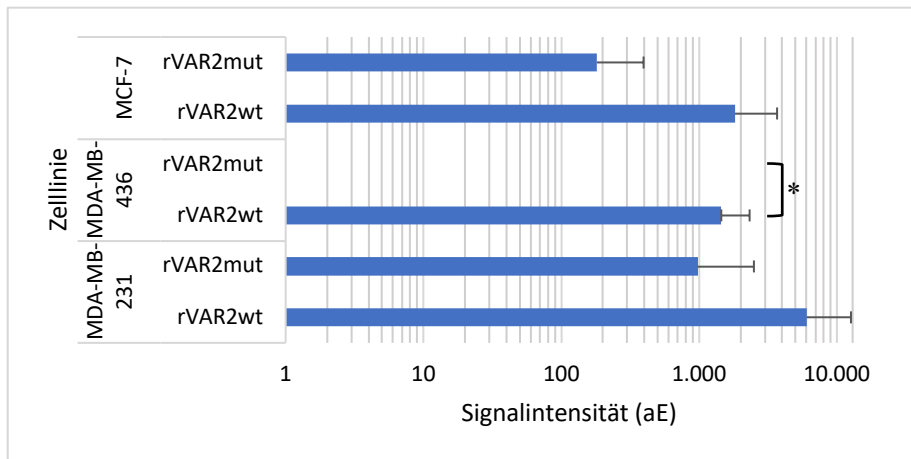


Abb. 34: Signalintensität des von rVAR2^{wt}- und rVAR2^{mut}-detektierten *Laminin Subunit Gamma 1* auf triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen

Statistischer Test mit *Two-way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparisons Test* mit logarithmierten Werten zur Basis 10, der Wert „0“ wurde nicht logarithmiert. * = $p < 0,05$, MCF-7 rVAR2^{wt} vs. MCF-7 rVAR2^{mut}: $p = 0,4157$, MDA-MB-436 rVAR2^{wt} vs. MDA-MB-436 rVAR2^{mut}: $p = 0,019$, MDA-MB-231 rVAR2^{wt} vs. MDA-MB-231 rVAR2^{mut}: $p = 0,339$. aE = artifizielle Einheiten, N = 3.

4 Diskussion

Das Ziel einer Krebstherapie besteht darin eine individuelle, personalisierte Therapie für Krebspatienten zu finden. Durch diverse Nachteile der herkömmlichen Gewebebiopsien wächst das Interesse daran Methoden zur Detektion von Krebszellen im Blut im Rahmen einer *Liquid Biopsy* zu finden. Eine Methode kann das in dieser Arbeit thematisierte rVAR2 darstellen.

In dieser Promotionsarbeit wurden die Zielproteine von rVAR2 auf triple-negativen und luminalen MaCa-Zelllinien mittels rVAR2-*Pulldown*, Massenspektrometrie und Western Blot untersucht. Im Folgenden werden Limitationen dieser Arbeit aufgeführt sowie die erzielten Ergebnisse im Kontext der aktuellen Wissenschaft diskutiert.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Limitationen der Auswertung des Western Blots

Der Western Blot ist eine Methode zur Identifizierung sowie Quantifizierung von Proteinen (103). Aufgrund eines linearen Zusammenhangs zwischen der Signalintensität sowie Proteinmenge kann eine semiquantitative Aussage getroffen werden (104,105). Durch die große Anzahl der Analyseschritte (Zelllyse, Bestimmung der Proteinkonzentration, Probenbefüllung der SDS-Gele, Übertragung auf die PVDF-Membran, mehrere Waschvorgänge, Detektion mittels Primär- und Sekundärantikörpern) können einige Ungenauigkeiten entstehen. Alegria-Schaffer *et al.* (104) haben einige Empfehlungen zur Optimierung des Western Blots aufgelistet. Um in dieser Arbeit das Problem der unterschiedlichen Übertragbarkeit von Proteinen von dem Gel auf die Membran zu minimieren (104), wurde stets ein möglichst niedriger elektrischer Strom von 10 mA für die Dauer von 20 Stunden angelegt. Des Weiteren ist das Signal im Western Blot von der Spezifität und Selektivität eines Primärantikörpers abhängig (105). Dabei kann z. B. ein Antigen durch eine Modifikation verändert und somit nicht mehr durch den Primärantikörper erkannt werden. In dieser Arbeit wurde dieses Problem dadurch adressiert, dass jeweils Antikörper verschiedener Klone in Vorarbeiten getestet wurden.

4.1.2 Limitationen der Auswertung der Massenspektrometriedaten

Eine Limitation der *Bottom-Up* Massenspektrometrie-Analyse (vgl. 2.2.5.1) besteht darin, dass Peptidmengen zu Proteingruppen zusammengefasst werden und folglich die Komplexität des Proteoms sowie von Proteoformen, durch Spleißvarianten und posttranslationale Proteinmodifikationen, übersehen werden (106). In vorherigen Arbeiten wurde das Vorkommen von verschiedenen Proteoformen pro Protein auf ca. 100 Proteoformen geschätzt (106,107). Die Aggregation von Peptiden zu Proteingruppen kann folglich verzerrte Ergebnisse liefern und wichtige biologische Unterschiede

zwischen den Peptiden können verloren werden (106). Alternativ könnten Methoden verwendet werden, welche alle Peptide betrachten und somit verschiedene Proteoformen und dessen posttranslationale Modifikationen und Spleißvarianten einschließen (106). Eine weitere Methode kann die Kombination der *Bottom-Up* und *Top-Down* Proteomik sein (106). Die *Bottom-Up* Proteomik umfasst die proteolytische Verdauung der Proteine vor der Massenspektrometrie und die Identifikation der Proteine aus einzelnen fragmentierten Peptiden (95). Die *Top-Down* Proteomik beinhaltet die Charakterisierung intakter Proteine mit dem Vorteil der Identifikation von Proteinmodifikationen, Spleißvarianten und posttranslationalen Modifikationen (108,109). Mithilfe von *Bottom-Up* als auch *Top-Down* Massenspektrometrie-Analysen könnten weitere Proteoformen identifiziert werden (106).

4.1.3 Limitationen der verwendeten Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die ofCS-modifizierten Proteoglykane, welche durch rVAR2 gebunden werden, auf zwei triple-negativen MaCa-Zelllinien und einer Luminal A MaCa-Zelllinie charakterisiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der ofCS-modifizierten Proteoglykane zwischen diesen beiden MaCa-Subtypen, sollte in Zukunft noch eine weitere Luminal A MaCa-Zelllinie analysiert werden. Zudem besteht das Interesse weitere Zelllinien anderer MaCa-Subtypen, wie z. B. Luminal B und HER2/neu-positiv, auf das Vorhandensein von ofCS-modifizierten Proteoglykanen zu untersuchen, um das volle Spektrum der Proteoglykane mit ofCS-Modifikation auf allen MaCa-Subtypen darzustellen.

Eine weitere Limitation besteht in dem Gebrauch von Zelllinien in dieser Arbeit. Das zukünftige Ziel ist die Identifikation von CTCs im Blut von Patienten mithilfe von rVAR2. In dieser Arbeit wurden jedoch MaCa-Zelllinien verwendet und keine CTCs. Infolgedessen sollten in Zukunft die rVAR2-Zielproteine auf CTCs charakterisiert werden, da sich diese möglicherweise von den rVAR2-Zielproteinen auf den Zelllinien unterscheiden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden NRP1, CD44 sowie Lamc1 als von rVAR2 gebundene CS-Proteoglykane identifiziert. Dabei konnte NRP1 als ein rVAR2-Zielprotein auf den triple-negativen MaCa-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 bestimmt werden (vgl. 3.4.1). Lamc1 wurde als neues rVAR2^{wt}-Zielprotein auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MCF-7 Zellen (vgl. 3.4.3) und CD44 als rVAR2-Zielprotein v. a. auf MDA-MB-436 Zellen identifiziert (vgl. 3.4.2).

4.2.1 Neuropilin 1 als Zielprotein von rVAR2

Im Zuge mehrerer Arbeiten wurde NRP1 als ein Zielprotein von rVAR2 auf unterschiedlichen Tumorzellen nachgewiesen (vgl. 3.3). Beispielsweise konnten Oo *et al.* (84) NRP1 als ein ofCS-

modifiziertes Zielprotein von rVAR2 auf nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen identifizieren (vgl. 1.6.3). Des Weiteren wurde durch die Arbeit von Bang-Christensen *et al.* (72) NRP1 als rVAR2-Zielprotein auf Gliomazellen ermittelt (vgl. 1.6.3).

Der Anti-NRP1-Antikörper detektiert NRP1 bei einem molekularen Gewicht von etwa 103 kDa. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in den Ansätzen der MDA-MB-231 Zellen mit rVAR2^{wt} zwei Signale im Western Blot bei ca. 140 kDa und ca. 270 kDa und in den Ansätzen der MDA-MB-436 Zellen mit rVAR2^{wt} ein Signal bei etwa 270 kDa detektiert (vgl. 3.4.1). Die verschiedenen Signale in den Proben mit rVAR2^{wt} lassen sich dabei durch verschiedene Formen von NRP1, welche eine unterschiedliche Glykosylierung aufweisen, erklären. Bedingt durch die verschiedene Glykosylierung und verschiedene Isoformen mit individuellem Molekulargewicht, erhält man im Western Blot Signale von unterschiedlicher Größe. Die untere Bande bei den MDA-MB-231 Zellen lässt sich somit durch eine geringere Glykosylierung von NRP1 im Vergleich zur oberen Bande begründen. Es wurde zudem ersichtlich, dass NRP1 nur sehr schwach auf den luminalen MCF-7 Zellen exprimiert wird und kein rVAR2-Zielprotein auf MCF-7 Zellen ist (vgl. 3.1.3).

Die Kontrollen mit rVAR2^{mut} (vgl. 3.1.2.3, 3.4.1) und Chondroitinase ABC Enzym (vgl. 3.1.2.4) belegen, dass NRP1 ein spezifisches ofCS-modifiziertes Zielprotein von rVAR2^{wt} darstellt. Dabei lässt sich das Signal bei ca. 140 kDa im Ansatz der MDA-MB-231 Zellen mit Chondroitinase ABC Enzym (vgl. 3.1.2.4, Abb. 15), durch internalisierte rVAR2^{wt}-Zielproteine in MDA-MB-231 Zellen erklären. Internalisierte Proteoglykane sind durch ihre Lokalisation in der Zelle nicht für das Chondroitinase ABC Enzym erreichbar. In dieser Arbeit wurde das Chondroitinase ABC Enzym vor der Zelllyse verwendet, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Zellmembran intakt war (vgl. 2.2.4.4). Folglich konnte das Chondroitinase ABC Enzym nur eine ofCS-Modifikation von Proteoglykanen auf der Zelloberfläche degradieren, jedoch nicht eine ofCS-Modifikation von internalisierten Proteoglykanen. Der *Pulldown* mit rVAR2 wurde hingegen nach der Zelllyse durchgeführt (vgl. 2.2.2). Somit konnte rVAR2 auch an internalisierte Proteoglykane binden, welche für die Chondroitinase nicht zugänglich waren, und das Signal im Western Blot erklären.

Wang *et al.* (110) wiesen in ihrer Arbeit nach, dass rVAR2 nicht nur an oberflächliche CSPGs bindet, sondern auch in die Krebszelle internalisiert wird. Durch die Bindung an CS auf der Zelloberfläche, wird rVAR2 über unterschiedliche endozytäre Wege, wie Clathrin-abhängig, Clathrin-unabhängig oder über Makropinozytose, internalisiert (110). Nach der Aufnahme von rVAR2 in die frühen Endosomen wird es anschließend von den Zellen ausgeschieden (110). Dies spielt eine wichtige Rolle bei dem Einsatz von rVAR2 für den Transport von Medikamenten, da rVAR2 somit Medikamente direkt in die Tumorzelle transportieren könnte. Dabei wäre es von Bedeutung Medikamente zu nutzen, welche die größte Wirksamkeit in den frühen Endosomen haben (110).

NRP1 zählt zur Familie der Neuropiline und ist ein, u. a. auf der Zellmembran vorkommendes, Glykoprotein (111). Es besitzt eine intra-, extrazelluläre sowie transmembrane Domäne und besteht aus 923 Aminosäuren (112). NRP1 besitzt eine GAG-Kette, die sich je nach Zellart aus Heparin- oder Chondroitinsulfat zusammensetzt, dessen Funktion noch nicht abschließend geklärt ist (44). Neuropiline stellen hochaffine Rezeptoren für Klasse 3-Semaphorine sowie für VEGF wie VEGF₁₆₅ dar (111,113). Dabei ist VEGF₁₆₅ eine VEGF-Form, welche für die pathologische Angiogenese verantwortlich ist (112).

NRP1 wird von verschiedenen „normalen“ Zellen wie T-Zellen sowie von Tumorzellen verschiedener Tumorarten, wie z. B. Gliomazellen, Pankreas-, Brust- und Lungenkrebs, exprimiert (112). Dabei stellen NRP1 und NRP2 die einzigen Rezeptoren für VEGF auf der Oberfläche von Tumorzellen dar (113). Sie haben einen relevanten Einfluss auf die Tumorentstehung sowie Tumorentwicklung (112). Über die Bildung des NRP1/VEGF/VEGF-Rezeptor-2-Komplexes, die Bindung von Wachstumsfaktoren, wie *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) und PDGF-Rezeptor, fördert NRP1 mittels Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors und über den NRP1-ABL-Signalweg das Tumorstadium und die Tumorentstehung (112). Des Weiteren interagiert NRP1 mit Zytokinen, wie FGF, PlGF, sowie mit Membranproteinen, wie Integrinen und TGF-Rezeptoren (112). Bei Betrachtung des Einflusses von NRP1 auf Tumore wurde eine veränderte Expression von NRP1 bei Prostata-, Brust-, Pankreas- und Lungenkrebs festgestellt, welche mit einer schlechten Prognose verbunden ist (112,114). Eine veränderte NRP1-Expression führte zu einer Förderung der Proliferation, Angiogenese und Metastasierung (114). Des Weiteren ist NRP1 mittels TGF- β , *Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells* (NF- κ B), sowie über die Regulation der EMT an der Tumorstadium und -migration beteiligt (112). Dies ist besonders für die *Liquid Biopsy* von Interesse, da CTCs nach EMT nicht mittels des *CellSearch*-Systems detektiert werden können, jedoch rVAR2 an CTCs nach EMT binden kann (vgl. 1.5.1, 1.6.3) (76). Da NRP1 auch auf „normalen“ Körperzellen wie Leukozyten und nicht nur Tumorzellen vorhanden ist, kann NRP1 allein jedoch nicht zur Detektion von CTCs mittels *Liquid Biopsy* verwendet werden. Erst die tumorspezifische Glykosylierung von NRP1 durch ofCS und die daraufhin spezifische Bindung von rVAR2 an ofCS-modifiziertes NRP1 ermöglicht eine spezifische Detektion von NRP1 auf CTCs (vgl. 1.6.1).

NRP1 spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen einer MaCa-Erkrankung. Die Menge von NRP1 ist im Plasma sowie im Tumorgewebe in fortgeschrittenen nodalen und metastasierten MaCa-Stadien im Vergleich zu lokalen MaCa-Stadien erhöht (115). Hu *et al.* (112) haben belegt, dass NRP1 in metastasierten Zellen wie MDA-MB-231 hoch exprimiert ist und eine NRP1-Überexpression die Bindung von *Hepatocyte Growth Factor* an c-Met fördert. Dies führt zu einer erhöhten Zellmigration (112). Eine Inaktivierung von NRP1 in MDA-MB-231 Zellen führt hingegen zu einer verminderten Zellmigration und Metastasierung (116). Des Weiteren konnten Zhang *et al.* (117) einen Einfluss

von NRP1 auf die EMT beim MaCa feststellen. NRP1 aktiviert auch beim MaCa den TGF- β -Signalweg, welcher einen wichtigen Einfluss auf die Progression von triple-negativem MaCa hat und die EMT fördert (117). Ferner hemmt die Micro-Ribonucleinsäure miR-124-3p über die Herunterregulierung von NRP1 die Proliferation, Migration und EMT von triple-negativen MaCa-Zellen (117).

Demzufolge hat NRP1 über verschiedene Mechanismen einen großen Einfluss auf die Tumorbilogie und -progression, was auch beim MaCa von Bedeutung ist. Die Bindung von rVAR2 an ofCS-glykosyliertes NRP1 auf triple-negativen MaCa-Zellen kann eine bedeutende Rolle in der Therapie dieses MaCa-Subtyps spielen. Das rVAR2-Protein kann somit eine spezifische Therapie für diesen sonst nur schwer behandelbaren Subtypen darstellen.

4.2.2 CD44 als Zielprotein von rVAR2

CD44 ist ein bekanntes Zielprotein von rVAR2 auf Tumorzellen (vgl. 3.3). Zum Beispiel konnten Oo *et al.* (84) CD44 als ein ofCS-modifiziertes Zielprotein von rVAR2 auf Zellen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms identifizieren (vgl. 1.6.3). Zudem wurde durch die Arbeiten von Bang-Christensen *et al.* (72) CD44 als ein rVAR2-Zielprotein auf Gliomazellen ermittelt (vgl. 1.6.3).

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass CD44 v. a. auf Zellen des triple-negativen MaCa-Subtyps vorhanden ist und nur in einem geringeren Maß von der luminalen MaCa-Zelllinie MCF-7 exprimiert wird (vgl. 3.4.2). Das CD44-Protein hat ein molekulares Gewicht von etwa 82 kDa. Nach dem rVAR2^{wt}-*Pulldown* wurde ein deutliches Signal in der Probe der MDA-MB-436 Zellen bei ca. 250 kDa detektiert, während in den Proben der MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden konnte (vgl. 3.4.2). Das Ergebnis der Western Blot-Analyse unterscheidet sich von den Ergebnissen der Massenspektrometrie, in denen CD44 auf allen drei MaCa-Zelllinien mit einem großen Wert in der *Student's t-Test* Test Statistik detektiert wurde (s. Tabelle 9).

Es gibt zwei mögliche Gründe für das schwache Signal der CD44-Detektion nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* im Western Blot auf MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen. Zum einen ist es möglich, dass rVAR2 nur einen ganz kleinen Teil von CD44 auf beiden MaCa-Zelllinien bindet, sodass man nur eine schwache Signalintensität im Western Blot detektiert. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass die luminalen MCF-7 Zellen ohnehin vermindert CD44, im Vergleich zu den triple-negativen MaCa-Zelllinien, exprimieren (vgl. 3.4.2). Zum anderen ist es möglich, dass rVAR2 an CD44 bindet, jedoch eine spezifische glykosylierte Form des CD44-Proteins vorliegt, welche die Antikörperbindestelle von CD44 abschirmt. Der CD44-Antikörper richtet sich gegen die unglykosylierte Form des Antigens, sodass der Antikörper eine spezifische Glykosylierung von CD44 nicht erkennt. Somit würde CD44 vermindert im Western Blot detektiert werden. Des Weiteren können sich die Gründe für die

verminderte Signalintensität auch je nach Zelllinie unterscheiden. Die Bindung von rVAR2 an einen kleinen Teil von CD44 kann der Grund für das schwache Signal bei den MCF-7 Zellen sein, während eine Glykosylierung von CD44 die Ursache für ein schwaches Signal bei den MDA-MB-231 Zellen sein kann. Das Chondroitinase ABC Enzym kann verwendet werden um dies herauszufinden. Dabei sollte die Chondroitinase, nicht wie im Rahmen dieser Arbeit vor dem rVAR2-*Pulldown* (vgl. 2.2.4.4), nach dem *Pulldown* mit rVAR2 verwendet werden. Infolgedessen würde die ofCS-Modifikation von CD44 entfernt werden, der CD44-Antikörper könnte an CD44 binden und ein Signal im Western Blot sichtbar werden.

Im Vergleich zum detektierten Signal nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* in der Probe der MDA-MB-436 Zellen bei ca. 250 kDa, wurde im Lysat ein Signal bei ca. 80 kDa detektiert (vgl. 3.4.2). Der Unterschied in den detektierten Signalen im Lysat von ca. 80 kDa und im rVAR2-Ansatz der MDA-MB-436 Zellen von ca. 250 kDa, deutet auf eine Bindung von rVAR2 an stark glykosyliertes CD44 hin. Dies ist im Lysat unterrepräsentiert. Diese Beobachtung ist auch bei den rVAR2-Zielproteinen NRP1 und Lamc1 feststellbar. Im Western Blot nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* wurde bei der Detektion von NRP1 ein Signal bei ca. 270 kDa (vgl. 3.4.1) und bei der Detektion von Lamc1 ein Signal bei etwa 250 kDa (vgl. 3.4.3) sichtbar. Die Bindung von rVAR2 an stark glykosylierte Zielproteine erklärt die hohe kDa-Zahl und somit die molekulare Größe der Proteine im Western Blot. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass eine spezifische glykosylierte Form des CD44-Proteins ein Zielprotein von rVAR2^{wt}, v. a. auf den triple-negativen MDA-MB-436 Zellen, darstellt. Mithilfe der Kontrolle von rVAR2^{mut} wurde CD44 als ein spezifisches ofCS-modifiziertes Zielprotein von rVAR2^{wt} identifiziert (vgl. 3.4.2).

CD44 ist ein von verschiedenen Zelltypen exprimiertes transmembranes Proteoglykan mit verschiedenen GAG-Ketten, wie Chondroitin-, Heparan- oder Dermatan-sulfat (44). Es ist u. a. bei der Hämatopoese, bei Entzündungsprozessen sowie bei der Wundheilung beteiligt (44). CD44 spielt auch im Rahmen der Tumورprogression eine relevante Rolle (44). Dabei stellt CD44 einen onkogenen Regulator und Krebsstammzellmarker in verschiedenen Tumorarten dar (118). Es ist an der Tumormetastasierung sowie dem Überleben und der Plastizität von CTCs beteiligt (44). Dabei scheint v. a. das Vorhandensein des CD44-Proteins auf CTCs ein entscheidender Faktor für die Tumورprogression zu sein. Die Expression von CD44 auf CTCs ist im Vergleich zu der CD44-Expression auf Gewebebiopsien desselben Patienten deutlich verstärkt (44,119). Die vermehrte Expression von CD44 sowie von CD44-Spleißvarianten auf CTCs und Primärtumorzellen fördert die Tumorigenität, Metastasierungsfähigkeit, Medikamenten-Resistenz sowie die Fähigkeit zur Rezidivbildung (44). Zudem fördert CD44 auf CTCs, über homophile Interaktionen, der Aktivierung der Serin/Threonin-Protein Kinase 2 und der *Focal Adhesion Kinase*, die CTC-*Cluster*-Bildung und Kolonisierung (44).

Dabei spielen CD44-positive Tumorzellen eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen Tumorarten (44). Beispielsweise wurde eine vermehrte Metastasierungsfähigkeit von CD44-positiven CTCs beim Magen- und Mundhöhlenkarzinom festgestellt (44). Es wurde deutlich, dass eine erhöhte CD44-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben und vermehrter Metastasierung bei Gliomen (120), Pankreastumoren (121) und kolorektalen Karzinomen assoziiert ist (122). Auch beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom ist eine Expression des CD44 mit einer vermehrten Tumorprogression, Metastasierung sowie Medikamentenresistenz assoziiert (118). Kong *et al.* (123) konnten CD44 beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom sowie beim triple-negativen MaCa als positiven Regulator der Expression von PD-L1 ermitteln, was wiederum zur Suppression des Immunsystems und zur Tumorprogression führt. Neben der Beteiligung von CD44 bei CTCs hat CD44 auch über die Bindung von Serglycin einen Einfluss auf die EMT, die Zellmotilität sowie den Schutz vor Anoikis (44). Dies ist besonders von Interesse für die *Liquid Biopsy*, da rVAR2 eine mögliche Methode darstellt, um CTCs auch nach der EMT zu detektieren (vgl. 1.5.1).

Zudem spielen CD44-positive Tumorzellen, v. a. CTCs, eine entscheidende Rolle im Rahmen einer MaCa-Erkrankung. CTC-Cluster beim MaCa, welche assoziiert sind mit einem schlechteren Gesamtüberleben, weisen eine vermehrte CD44-Expression auf (44). Zudem konnte CD44 auf einer Subgruppe von MaCa-CTCs, welche die Metastasierung initiieren, charakterisiert werden (124). Daraus lässt sich schließen, dass CD44, aufgrund der ubiquitären Expression von CD44 auf Tumorzellen sowie CTCs, ein geeigneter Marker für die Prognose sowie Therapieadhärenz von Tumorerkrankungen zu sein scheint (44). CD44 wird auch auf normalen Zellen exprimiert (125). Daher könnte die spezifische CD44-Detektion von rVAR2, v. a. auf triple-negativen MDA-MB-436 Zellen, eine wichtige Rolle bei der Detektion sowie der Therapie des MaCas spielen.

4.2.3 Laminin Subunit Gamma 1 als Zielprotein von rVAR2

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression von Lamc1 auf MaCa-Zellen, v. a. auf triple-negativen, sowie die Detektion von Lamc1 durch rVAR2 festgestellt werden (vgl. 3.4.3). Lamc1 hat ein molekulares Gewicht von etwa 178 kDa. Dieses kann durch Glykosylierungen, verschiedene Isoformen oder eine unvollständige Denaturierung im Western Blot variieren. Nach dem *Pulldown* mit rVAR2^{wt} konnte ein leichtes Signal bei etwa 250 kDa in allen Proben der verwendeten triple-negativen und luminalen MaCa-Zelllinien detektiert werden (vgl. 3.4.3). Hieraus lässt sich schließen, dass Lamc1 ein mit ähnlicher Stärke gebundenes Zielprotein von rVAR2^{wt} auf MDA-MB-231, MDA-MB-436 sowie MCF-7 Zellen darstellt. Dabei wird vorausgesetzt, dass rVAR2 nicht nur einen kleinen Teil von Lamc1 bindet oder eine stark glykosylierte Form von Lamc1 vorliegt, welche nicht durch den Lamc1-Antikörper detektiert wird und somit nur eine verminderte Signalstärke im Western Blot sichtbar werden würde.

Mittels der Kontrolle rVAR2^{mut} wurde deutlich, dass Lamc1 ein spezifisches ofCS-modifiziertes Zielprotein von rVAR2^{wt} auf MDA-MB-436 Zellen ist (vgl. 3.4.3). Es wurde keine Bindung von Lamc1 durch rVAR2^{mut} auf MDA-MB-436 Zellen detektiert. Im Gegensatz dazu wurde eine Bindung von rVAR2^{mut} an Lamc1 auf MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen im Western Blot festgestellt (vgl. 3.4.3). Vergleicht man dies zur Bindung von rVAR2^{mut} an NRP1, wurde eine leichte Bindung von rVAR2^{mut} an NRP1 bei den MDA-MB-231 Zellen detektiert (vgl. 3.4.1). Es wurde keine Bindung von rVAR2^{mut} an NRP1 auf MDA-MB-436 Zellen festgestellt (vgl. 3.4.1). Vergleicht man die Bindung von rVAR2^{mut} an CD44, wurde keine Bindung von rVAR2^{mut} an CD44 auf allen drei MaCa-Zelllinien detektiert (vgl. 3.4.2). Mögliche Erklärungen für die Signale im rVAR2^{mut}-Pull-down könnten eine Bindung von rVAR2^{mut} an weitere Proteoglykan-Formen oder eine Antikörper-Kreuzreaktivität sein.

Lamc1 zählt zur Familie der Laminine, bestehend aus insgesamt 16 Lamimintypen (79). Laminine sind Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix und stellen einen der Hauptbestandteile der Basalmembran von Epi- und Endothelien dar (79). Sie sind heterotrimere Proteine, bestehend aus drei Polypeptidketten, und binden an Kollagene, Proteoglykane, Integrine und weitere Adhäsionsproteine (79). Laminine beeinflussen embryo- und morphogenetische Prozesse (79) sowie die Zelladhäsion, Migration und Differenzierung (126). Verschiedene Laminin-Formen sind zudem an der Invasion von Tumoren, der Angiogenese sowie der Metastasierung beteiligt (126). Dabei spielt Lamc1 bei verschiedenen Tumorarten eine Rolle. Beispielsweise wird Lamc1 beim Endometriumkarzinom vermehrt exprimiert (127). Es ist assoziiert mit einem aggressiveren histologischen Typ, der Invasion in das Lymphsystem, der Lymphknotenmetastasierung sowie einem verminderten Gesamtüberleben (127). Kunitomi *et al.* (127) konnten demonstrieren, dass der *Knockdown* von Lamc1 in Endometrium-Krebszellen zu einer veränderten Expression verschiedener Gene, wie der Tumorsuppressorgene *Leucine Zipper Transcription Factor like 1* und *SEL1L Adaptor Ubiquitin Ligase*, führt.

Durch Arbeiten von Fang *et al.* (128) wurde eine Überexpression von Lamc1 in Ösophagus-Plattenepithelkarzinomzellen, durch TGF- β über *SMAD Family Member 4* und SP1-Transkriptionsfaktoren, festgestellt. Über die Akt-Nf κ B-Matrix-Metallopeptidase-9/14-Signalkaskade sowie die *C-X-C Motif Chemokine Ligand 1*-Sekretion fördert Lamc1 die Tumorphiliferation, -progression sowie Tumorzellmigration und führt zu einer schlechteren Prognose beim Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (128). Auch im Rahmen des Magenkarzinoms spielt Lamc1 eine prognostisch wichtige Rolle. Dabei konnten Xi *et al.* (129) darlegen, dass Patienten mit einem Magenkarzinom eine vermehrte Expression von Lamc1 und ein geringeres Gesamtüberleben hatten. Weitere Tumore, bei denen Lamc1 in der Tumorbilogie beteiligt ist und die Zellproliferation, Migration, Invasion und EMT fördert, sind Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (130).

Zudem spielt Lamc1 im Rahmen einer MaCa-Erkrankung eine entscheidende Rolle. Hierbei konnten Wang *et al.* (131) ein vermehrtes Vorkommen von Lamc1 auf MaCa-Gewebe, im Gegensatz zu Nicht-Karzinom-Gewebe, beobachten. Lamc1 fördert im Rahmen des MaCas, u. a. mittels SHNG6/micro-RNA-543 und Phosphatidylinositol-4-Phosphat 3-Kinase/AKT-Signalweg, die Tumorzellproliferation, -migration und die EMT (131). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Lamc1 einen relevanten Einfluss auf die Progression verschiedener Tumore, wie auch dem MaCa, hat. Die Bindung von rVAR2 an ofCS-modifiziertes Lamc1 auf MaCa-Zellen kann in Zukunft bei der Detektion von Tumorzellen bedeutsam sein.

4.3 rVAR2 im Kontext der zielgerichteten Therapie

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass NRP1, CD44 – und bedingt Lamc1, aufgrund des Signals im Western Blot nach rVAR2^{mut}-*Pulldown*, wenn auch deutlich geringer als im rVAR2^{wt}-*Pulldown* (vgl. 3.4.3) – rVAR2-Zielproteine auf MaCa-Zellen sind. Hierbei ergaben sich relevante Unterschiede in denen von rVAR2 gebundenen Proteoglykanen auf triple-negativen und luminalen MaCa-Zelllinien (vgl. 3.2.2, 3.4). In der Western Blot-Analyse wurde sowohl bei NRP1, CD44 als auch Lamc1 ein stärkeres Signal nach rVAR2^{wt}-*Pulldown* bei den verwendeten triple-negativen MaCa-Zellen im Vergleich zu der luminalen MCF-7 Zelllinie sichtbar (vgl. 3.4). Eine Erklärung hierfür könnte eine verstärkte ofCS-Modifizierung der rVAR2-Zielproteine auf triple-negativen MaCa-Zellen sein. Eine weitere Ursache könnte eine höhere Expression der identifizierten rVAR2-Zielproteine auf triple-negativen MaCa-Zellen als auf luminalen MaCa-Zellen sein (vgl. 3.4).

NRP1, CD44 und Lamc1 können als Zielproteine von rVAR2 auf triple-negativen MaCa-Zellen zukünftig eine maßgebliche Rolle in der Anwendung von rVAR2 bei der *Liquid Biopsy* spielen. Dies ist von besonderem Interesse, weil der triple-negative Subtyp den aggressivsten MaCa-Subtyp darstellt (15,132). Er ist gekennzeichnet durch eine starke Invasivität, eine hohe Rezidivrate sowie ein vermindertes Gesamtüberleben (133). Molekulare Marker sind vom großen Interesse, um eine spezifische Therapie für diesen Subtypen zu finden (50). Problematisch ist, dass der triple-negative Subtyp eine fehlende Expression von sensitiven sowie spezifischen molekularen Markern aufweist (134,135). Die Tumorzellen sind durch die EMT nur schlecht mittels *CellSearch* auffindbar (48). Um die triple-negativen Tumorzellen detektieren zu können, kann die Bindung von ofCS-modifiziertem NRP1, CD44 und bedingt auch Lamc1 durch rVAR2 die Detektion von triple-negativen MaCa-Zellen im Rahmen einer *Liquid Biopsy* ermöglichen. Dies ist nicht nur für die Detektion der Tumorzellen von Bedeutung, sondern ermöglicht darüberhinaus anhand der Tumorzellanalyse eine patientenspezifische Therapie zu finden.

Eine Möglichkeit der zielgenauen Tumorthherapie ist die Verwendung von *Antibody Drug Conjugates* (ADC). ADCs bestehen aus einem Antikörper, welcher mit einer hohen Affinität und Spezifität an das Tumorantigen bindet, einer *Linker*-Region sowie einem zytotoxischen Wirkstoff (136). Sie sollen, durch eine spezifische Bindung an Tumorzellen, die Wirksamkeit einer Chemotherapie erhöhen und gleichzeitig systemische Nebenwirkungen vermindern (136). Die derzeit von der FDA zugelassenen ADCs für die Therapie des metastasierten MaCa umfassen u. a. Trastuzumab-Emtansin, Trastuzumab-Deruxtecan, Sacituzumab-Govitecan und Datopotamab-Deruxtecan (137).

Auch rVAR2 ist im Rahmen der zielgenauen MaCa-Therapie als Transportvehikel für zytotoxische Mittel von besonderem Interesse. Durch die Bindung von rVAR2 an NRP1, CD44 und Lamc1 könnten Therapiemittel unmittelbar zur Tumorzelle transportiert werden und eine wichtige Rolle in der spezifischen Therapie des MaCa spielen. Salanti *et al.* (71) konnten den Einsatz von rVAR2 für den Transport von Toxinen nachweisen. Dabei wurde ersichtlich, dass rVAR2 in den Colontumorzellen Colo205, C32 und B16 Melanomzellen sowie PC-3 Prostatakrebszellen internalisiert wird (71). An rVAR2 gekoppelte Toxine könnten somit in die unmittelbare Tumornähe transportiert werden (71). Das rVAR2-Protein mit gekoppeltem Diphtherietoxin (DT388) und Hemiasterlin-Toxin (KT886) hat Tumorzellen mit ofCS-Modifikation *in vitro* sowie *in vivo* gebunden und diese vernichtet, ohne dabei zytotoxische Nebenwirkungen zu haben (71). Dabei wurden durch rVAR2-DT388 epitheliale sowie mesenchymale Tumorzellen, wie B16 Melanomzellen, PC-3 Prostatazellen, Colo205 Colonzellen und RH30 Rhabdomyosarkomzellen, *in vitro* effizient vernichtet, ohne dabei auf die primär humanen Endothelzellen HUVEC zu wirken (71). Zudem konnte durch rVAR2-DT388 das Wachstum der PC-3 Prostatakrebszellen *in vivo* signifikant vermindert werden (71). Durch das rVAR2-KT886 Konjugat VDC886 wurden insgesamt 33 Krebszelllinien unterschiedlicher Herkunft effektiv *in vitro* vernichtet (71). Zu diesen 33 Zelllinien gehörten auch die triple-negativen MDA-MB-231 und MDA-MB-468 Zellen sowie die luminalen MCF-7 Zellen, dessen Wachstum effektiv durch VDC886 inhibiert wurde (71). *In vivo* wurde mittels VDC886 eine signifikante Wachstumshemmung der non-Hodgkin Lymphom-Zelllinie Karpas299 sowie der PC-3 Zellen festgestellt (71). Auch das Wachstum der metastatischen 4T1 MaCa-Zellen konnte *in vitro* sowie *in vivo* durch eine VDC886-Behandlung gehemmt und das Überleben von Mäusen mit 4T1-Knochenmetastasen signifikant verbessert werden (71).

Somit könnte rVAR2 neben der Verwendung zur Detektion von Tumorzellen im Rahmen der *Liquid Biopsy* auch als Transportvehikel für zytotoxische Therapien dienen. Das MaCa, v. a. der triple-negative Subtyp, könnte so spezifisch therapiert werden.

4.4 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels eines rVAR2-*Pulldowns*, einer anschließenden Massenspektrometrie-Analyse sowie der Validierung mittels Western Blot, ofCS-modifizierte Proteoglykane auf den triple-negativen MaCa-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 sowie der luminalen MaCa-Zelllinie MCF-7 identifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen zahlreiche Ansatzpunkte für ergänzende und weiterführende Experimente zu. Zunächst sollten die Ergebnisse der Western Blot-Validierung für NRP1, CD44 und Lamc1 neben rVAR2^{mut} zusätzlich mithilfe von Chondroitinase ABC Enzym kontrolliert werden. Hierfür sollte das Chondroitinase ABC Enzym vor dem *Pulldown* mit rVAR2 eingesetzt werden, sodass die ofCS-Modifikation der Proteoglykane durch Chondroitinase degradiert wird und rVAR2 nicht mehr an die Zielproteine ohne ofCS-Modifikation binden kann. Dies ist ein Nachweis, dass die in Rahmen dieser Arbeit beobachtete Bindung von rVAR2 an NRP1, CD44 und Lamc1 tatsächlich über ofCS stattfindet. Ein weiteres Experiment mit Chondroitinase ABC Enzym wäre die Verwendung von Chondroitinase nach dem rVAR2-*Pulldown* um mögliche stark glykolysierte Formen der Zielproteine, welche durch eine Glykosylierung im Western Blot nicht sichtbar wurden, zu detektieren.

Auch die Ergebnisse der Massenspektrometrie sollten mit weiteren Methoden validiert werden. Ein Beispiel für eine anderweitige Methode stellt die PLA-Analyse dar, bei der die Protein-Protein-Interaktion sowie Co-Lokalisierung von rVAR2 und jeweils NRP1, CD44 und Lamc1 validiert werden kann.

Des Weiteren sollten Experimente mittels rVAR2-*Pulldown*, Massenspektrometrie sowie Western Blot zur Bestimmung der rVAR2-Zielproteine auf MaCa-Gewebe ergänzt werden. Von besonderem Interesse ist hierbei das Gewebe von Patienten mit triple-negativem MaCa, da die verwendeten triple-negativen MaCa-Zellen im Rahmen dieses Projektes eine verstärkte Expression von rVAR2-Zielproteinen als die luminalen MCF-7 Zellen aufwiesen. Hierbei wäre zudem der Vergleich zwischen rVAR2-Zielproteinen auf MaCa-Zelllinien sowie auf MaCa-Gewebe interessant. Schließlich sollten weiterführende Experimente den Effekt der Bindung von zytotoxischen Substanzen an rVAR2 auf das Wachstum von MaCa-Zelllinien untersuchen.

Zusammenfassend kann durch diese Arbeit demonstriert werden, dass das rekombinante Malariaprotein rVAR2 spezifisch an ofCS-modifizierte Proteoglykane, v. a. auf triple-negativen MaCa-Zellen, bindet. Infolgedessen könnten CTCs, v. a. vom triple-negativen Subtyp, im Rahmen einer *Liquid Biopsy* durch rVAR2 spezifisch und in einer größeren, heterogeneren Menge detektiert werden. Mittels Kopplung zytotoxischer Mittel an rVAR2 könnten speziell triple-negative Tumore zielgerichtet

therapiert werden und somit eine personalisierte Therapie ermöglichen. In breiter Anwendung könnte mithilfe von rVAR2 die Krebstherapie, insbesondere für triple-negative Karzinome, in gewisser Art und Weise revolutioniert werden. Hiervon würden nicht nur sehr viele Menschen direkt profitieren, auch ökonomisch gesehen könnten viele, derzeit teure, aber nur schlecht wirksame und mit großen Nebenwirkungen verbundene, Krebstherapien vermieden werden. Die Forschung dahingehend fortzuführen und zu intensivieren, erscheint nach derzeitigem Forschungsstand sehr vielversprechend.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
2. Kellner U, Frahm SO, Mawrin C, Krams M, Schüller S. *Kurzlehrbuch Pathologie.* Vol. 3. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019.
3. Weinberg RA. *The Biology of Cancer.* Vol. 2. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2014.
4. Höfler G, Kreipe HH, Moch H. *Pathologie Das Lehrbuch.* Vol. 6. Elsevier GmbH; 2019.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646–74.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57–70.
7. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan 1;12(1):31–46.
8. Cancer [Internet]. [cited 2022 Feb 18]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
9. Uhl B. *Gynäkologie und Geburtshilfe compact.* Vol. 6. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018.
10. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [Internet]. Vol. Version 4.4, AWMF Registernummer: 032-045OL. 2021 [cited 2025 Sep 29]. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
11. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023 Jan 12;73(1):17–48.
12. Breast cancer [Internet]. [cited 2022 Feb 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>

13. Goerke K, Valet A. Gynäkologie und Geburtshilfe hoch2 professional. Vol. 1. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2020.
14. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med. 2010 Nov 11;363(20):1938–86.
15. Fallahpour S, Navaneelan T, De P, Borgo A. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. CMAJ Open. 2017 Sep 25;5(3):E734–9.
16. Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfleiderer A. Gynäkologie und Geburtshilfe. Vol. 5. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2007.
17. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [Internet]. Vol. Kurzversion 4.1, AWMF Registernummer: 032-045OL. 2018 [cited 2022 Sep 16]. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
18. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Krebsfrüherkennungs-Richtlinie (KFE-RL): Erweiterung der oberen Altersgrenzen im Mammographie-Screening-Programm sowie weitere Änderungen [Internet]. 2023 Sep [cited 2025 Oct 7]. Available from: https://www.g-ba.de/downloads/39-261-6183/2023-09-21_KFE-RL_Erweiterung-obere-Altersgrenzen-Mammographie_BAnz.pdf
19. Ibrance : EPAR - Product Information (Last updated: 07/03/2025) [Internet]. 2016 Nov [cited 2025 Oct 10]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ibrance-epar-product-information_en.pdf
20. Kisqali : EPAR - Product Information (Last updated: 25/09/2025) [Internet]. 2017 Aug [cited 2025 Oct 10]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kisqali-epar-product-information_en.pdf
21. Verzenios : EPAR - Product information (Last updated: 07/03/2025) [Internet]. 2018 Oct [cited 2025 Oct 10]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/verzenios-epar-product-information_en.pdf
22. Ditsch N, Kolberg-Liedtke C, Friedrich M, Jackisch C, Albert US, Banys-Paluchowski M, et al. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2021. Breast Care. 2021 Jun 1;16(3):214–27.

23. Cortes J, Rugo HS, Cescon DW, Im SA, Yusof MM, Gallardo C, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022 Jul;387(3):217–26.
24. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb;382(9):810–21.
25. Gennari A, André F, Barrios CH, Cortés J, de Azambuja E, DeMichele A, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2021 Dec;32(12):1475–95.
26. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12:252–64.
27. Yu Y, Jin X, Zhu X, Xu Y, Si W, Zhao J. PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in metastatic triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2023 Jun 12;14.
28. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017 Aug 10;377(6):523–33.
29. Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 Controls Homology-Directed DNA Repair. *Mol Cell*. 1999 Oct;4(4):511–8.
30. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: The roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Apr;7(4).
31. Daly MB, Pal T, Berry MP, Buys SS, Dickson P, Domchek SM, et al. Genetic/familial high-risk assessment: Breast, ovarian, and pancreatic, version 2.2021. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021 Jan;19(1):77–102.
32. Amé JC, Spenlehauer C, De Murcia G. The PARP superfamily. *BioEssays*. 2004 Jul 19;26(8):882–93.
33. Bai P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol Cell*. 2015 Jun 18;58(6):947–58.

34. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* 2006 Aug 15;66(16):8109–15.
35. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers. *New England Journal of Medicine.* 2009 Jul 9;361(2):123–34.
36. Daly GR, AlRawashdeh MM, McGrath J, Dowling GP, Cox L, Naidoo S, et al. PARP Inhibitors in Breast Cancer: a Short Communication. *Curr Oncol Rep.* 2024 Jan 2;26:103–13.
37. Lynparza : EPAR - Product Information (Last updated: 31/07/2025) [Internet]. 2015 Jan [cited 2025 Oct 8]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lynparza-epar-product-information_en.pdf
38. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee KH, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation . *New England Journal of Medicine.* 2018 Aug;379(8):753–63.
39. Talzenna : EPAR - Product Information (Last updated: 18/07/2025) [Internet]. 2019 Jul [cited 2025 Oct 8]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/talzenna-epar-product-information_en.pdf
40. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009 Apr;9(4):274–84.
41. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene.* 2003 Oct 3;22(42):6524–36.
42. Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med.* 2018 Aug;12(4):361–73.
43. Gröger CJ, Grubinger M, Waldhör T, Vierlinger K, Mikulits W. Meta-analysis of gene expression signatures defining the epithelial to mesenchymal transition during cancer progression. *PLoS One.* 2012 Dec 10;7(12):e51136.
44. Ahrens TD, Bang-Christensen SR, Jørgensen AM, Løppke C, Spliid CB, Sand NT, et al. The Role of Proteoglycans in Cancer Metastasis and Circulating Tumor Cell Analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Aug 26;8.

45. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Feb 21;15:178–96.
46. Imani S, Hosseinifard H, Cheng J, Wei C, Fu J. Prognostic Value of EMT-inducing Transcription Factors (EMT-TFs) in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep.* 2016 Jun 23;6.
47. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Nov 20;20:69–84.
48. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2012 May 16;12(178).
49. Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res.* 2013 Nov 1;73(21):6384–8.
50. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.* 2013 Jan;59(1):110–8.
51. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 2016;6(5):479–91.
52. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol.* 2018 Aug 29;10.
53. Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med.* 2017 Apr 6;15.
54. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 15;18(20):5701–10.
55. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical prospects of liquid biopsies. *Nat Biomed Eng.* 2017 Apr 12;1.
56. Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Jun;6(6):339–51.

57. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016 Jan 20;529:298–306.
58. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014 Jul 31;14:623–31.
59. Janni WJ, Rack B, Terstappen LWMM, Pierga JY, Taran FA, Fehm T, et al. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016 May 15;22(10):2583–93.
60. Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2008 Jan 8;13(1):58–68.
61. Bidard FC, Proudhon C, Pierga JY. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol Oncol*. 2016 Mar;10(3):418–30.
62. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the cell search system. *Clinical Cancer Research*. 2007 Feb 1;13(3):920–8.
63. Florence Schaffner, Jean-Louis Merlin, Nikolas von Bubnoff, editors. *Tumor Liquid Biopsies*. 1st ed. Springer Cham; 2020.
64. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781–91.
65. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*. 2019 May;3(6):165–80.
66. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells*. 2020 Aug 5;9(8):1836.
67. Franken B, de Groot MR, Mastboom WJ, Vermes I, van der Palen J, Tibbe AG, et al. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2012 Oct 22;14(5).

68. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol.* 2013 Jun;31(6):539–44.
69. Janni W, Friedl TWP, Yab TC, Bidard FC, Cristofanilli M, Hayes DF, et al. Clinical Validity of Repeated Circulating Tumor Cell Enumeration as an Early Treatment Monitoring Tool for Metastatic Breast Cancer in the PREDICT Global Pooled Analysis. *Clinical Cancer Research.* 2025 Jun;31(11):2196–209.
70. Saveria T, Oleinikov A V, Wiliamson K, Chaturvedi R, Lograsso J, Keitany GJ, et al. Antibodies to Escherichia coli-expressed C-terminal domains of Plasmodium falciparum variant surface antigen 2-chondroitin sulfate A (VAR2CSA) inhibit binding of CSA-adherent parasites to placental tissue. *Infect Immun.* 2013 Apr;81(4):1031–9.
71. Salanti A, Clausen TM, Agerbæk MØ, Al Nakouzi N, Dahlbäck M, Oo HZ, et al. Targeting Human Cancer by a Glycosaminoglycan Binding Malaria Protein. *Cancer Cell.* 2015 Oct;28(4):500–14.
72. Bang-Christensen SR, Pedersen RS, Pereira MA, Clausen TM, Løppke C, Sand NT, et al. Capture and Detection of Circulating Glioma Cells Using the Recombinant VAR2CSA Malaria Protein. *Cells.* 2019 Aug 28;8(9).
73. Salanti A, Dahlbäck M, Turner L, Nielsen MA, Barfod L, Magistrado P, et al. Evidence for the Involvement of VAR2CSA in Pregnancy-associated Malaria. *Journal of Experimental Medicine.* 2004 Nov 1;200(9):1197–203.
74. Chen YH, Narimatsu Y, Clausen TM, Gomes C, Karlsson R, Steentoft C, et al. The GAG-Ome: a cell-based library of displayed glycosaminoglycans. *Nat Methods.* 2018 Aug 13;15:881–8.
75. Clausen TM, Christoffersen S, Dahlbäck M, Langkilde AE, Jensen KE, Resende M, et al. Structural and Functional Insight into How the Plasmodium falciparum VAR2CSA Protein Mediates Binding to Chondroitin Sulfate A in Placental Malaria. *J Biol Chem.* 2012 Jul;287(28):23332–45.
76. Agerbæk M, Bang-Christensen SR, Yang MH, Clausen TM, Pereira MA, Sharma S, et al. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat Commun.* 2018 Aug 16;9(1).

77. Ma R, Lian T, Huang R, Renn JP, Petersen JD, Zimmerberg J, et al. Structural basis for placental malaria mediated by *Plasmodium falciparum* VAR2CSA. *Nat Microbiol.* 2021;6(3):380–91.
78. Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update.* 2007;13(2):121–41.
79. Müller-Esterl W. *Biochemie*. Vol. 3. Springer Berlin; 2018.
80. Wang J, Svendsen A, Kmiecik J, Immervoll H, Skaftnesmo KO, Planagumà J, et al. Targeting the NG2/CSPG4 Proteoglycan Retards Tumour Growth and Angiogenesis in Preclinical Models of GBM and Melanoma. *PLoS One.* 2011 Jul 29;6(7):e23062.
81. Santra M, Eichstetter I, Iozzo R V. An Anti-oncogenic Role for Decorin. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Nov;275(45):35153–61.
82. Iozzo R V., Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2011 May;15(5):1013–31.
83. Toba-Ichihashi Y, Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M. Up-regulation of Syndecan-4 contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem Biophys Rep.* 2016 Mar;5:1–7.
84. Oo HZ, Lohinai Z, Khazamipour N, Lo J, Kumar G, Pihl J, et al. Oncofetal Chondroitin Sulfate Is a Highly Expressed Therapeutic Target in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Sep 6;13(17):4489.
85. Khazamipour N, Al-Nakouzi N, Oo HZ, Ørum-Madsen M, Steino A, Sorensen PH, et al. Oncofetal Chondroitin Sulfate: A Putative Therapeutic Target in Adult and Pediatric Solid Tumors. *Cells.* 2020 Mar 28;9(4):818.
86. Clausen TM, Pereira MA, Al Nakouzi N, Oo HZ, Agerbæk MØ, Lee S, et al. Oncofetal Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans Are Key Players in Integrin Signaling and Tumor Cell Motility. *Molecular Cancer Research.* 2016;14(12):1288–99.
87. Clausen TM, Kumar G, Ibsen EK, Ørum-Madsen MS, Hurtado-Coll A, Gustavsson T, et al. A simple method for detecting oncofetal chondroitin sulfate glycosaminoglycans in bladder cancer urine. *Cell Death Discov.* 2020 Jul 27;6, Article number 65(1).

88. Seiler R, Oo HZ, Tortora D, Clausen TM, Wang CK, Kumar G, et al. An Oncofetal Glycosaminoglycan Modification Provides Therapeutic Access to Cisplatin-resistant Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2017 Jul;72(1):142–50.
89. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76–85.
90. Thrane S, Janitzek CM, Matondo S, Resende M, Gustavsson T, Adriaan De Jongh W, et al. Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines. *J Nanobiotechnol.* 2016 Apr;14, Article no. 30.
91. Zakeri B, Fierer JO, Celik E, Chittock EC, Schwarz-Linek U, Moy VT, et al. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012 Mar;109(12).
92. Løppke C, Ugleholdt R, Secher CF, Sand NT, Mujollari J, Gustavsson T, et al. Multi-cancer detection of circulating tumor cells by targeting oncofetal chondroitin sulfate. *NPJ Precis Oncol.* 2025 May;9, Article no.: 144(1).
93. Wang K, Dagil R, Lavstsen T, Misra SK, Spliid CB, Wang Y, et al. Cryo-EM reveals the architecture of placental malaria VAR2CSA and provides molecular insight into chondroitin sulfate binding. *Nat Commun.* 2021 May 19;12(Article number: 2956).
94. Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol.* 2010 Jul 9;28(7):695–709.
95. Shuken SR. An Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *J Proteome Res.* 2023 Jul 7;22(7):2151–71.
96. UniProt [Internet]. [cited 2022 Jan 18]. Available from: <https://www.uniprot.org/proteomes>
97. Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Adesina A, Ahmad S, et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(Database issue):D609–17.
98. Wietz HL. Etablierung eines Workflows zur CTC-Anreicherung bei Mammakarzinompatientinnen mithilfe des rekombinanten Malariaproteins VAR2CSA (rVAR2) [Internet]. [cited 2025 Mar 5]. Available from: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=68572>

99. Krahn C. CTC Isolation bei Mammakarzinompatientinnen mithilfe von rekombinantem VAR2CSA (rVAR2) [Internet]. [cited 2025 Jan 24]. Available from: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=58773>
100. Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2023 Feb 28]. Available from: <https://www.proteinatlas.org>
101. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (1979). 2015 Jan 23;347(6220).
102. Toledo AG, Pihl J, Spliid CB, Persson A, Nilsson J, Pereira MA, et al. An affinity chromatography and glycoproteomics workflow to profile the chondroitin sulfate proteoglycans that interact with malarial VAR2CSA in the placenta and in cancer. *Glycobiology*. 2020 Dec 9;30(12):989–1002.
103. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979 Sep;76(9):4350–4.
104. Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K. Chapter 33 Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection. In: Burgess RR, Deutscher MP, editors. *Methods in Enzymology*. 2nd ed. 2009. p. 573–99.
105. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2020 Mar;593:113608.
106. Plubell DL, Käll L, Webb-Robertson BJ, Bramer LM, Ives A, Kelleher NL, et al. Putting Humpty Dumpty Back Together Again: What Does Protein Quantification Mean in Bottom-Up Proteomics? *J Proteome Res*. 2022 Apr 1;21(4):891–8.
107. Aebersold R, Agar JN, Amster IJ, Baker MS, Bertozzi CR, Boja ES, et al. How many human proteoforms are there? *Nat Chem Biol*. 2018 Feb 14;14(3):206–14.
108. Roberts DS, Loo JA, Tsybin YO, Liu X, Wu S, Chamot-Rooke J, et al. Top-down proteomics. *Nature Reviews Methods Primers*. 2024;4(1).
109. Meng F, Cargile BJ, Miller LM, Forbes AJ, Johnson JR, Kelleher NL. Informatics and multiplexing of intact protein identification in bacteria and the archaea. *Nat Biotechnol*. 2001 Oct;19(10):952–7.

110. Wang CK, Nelepcu I, Hui D, Oo HZ, Truong S, Zhao S, et al. Internalization and trafficking of CSPG-bound recombinant VAR2CSA lectins in cancer cells. *Sci Rep.* 2022 Feb;12(1).
111. Chuckran CA, Liu C, Bruno TC, Workman CJ, Vignali DA. Neuropilin-1: a checkpoint target with unique implications for cancer immunology and immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2020 Jul 15;8(2):e000967.
112. Hu C, Jiang X. Role of NRP-1 in VEGF-VEGFR2-Independent Tumorigenesis. *Target Oncol.* 2016 Aug 26;11(4):501–5.
113. Rossignol M, Gagnon ML, Klagsbrun M. Genomic Organization of Human Neuropilin-1 and Neuropilin-2 Genes: Identification and Distribution of Splice Variants and Soluble Isoforms. *Genomics.* 2000 Dec 1;70(2):211–22.
114. Cao H, Li Y, Huang L, Bai B, Xu Z. Clinicopathological Significance of Neuropilin 1 Expression in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Dis Markers.* 2020 Sep 19;2020.
115. Naik A, Al-Zeheimi N, Bakheit CS, Al Riyami M, Al Jarrah A, Al Moundhri MS, et al. Neuropilin-1 Associated Molecules in the Blood Distinguish Poor Prognosis Breast Cancer: A Cross-Sectional Study. *Sci Rep.* 2017 Jun 12;7(1):3301.
116. Al-Zeheimi N, Gao Y, Greer PA, Adham SA. Neuropilin-1 Knockout and Rescue Confirms Its Role to Promote Metastasis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 25;24(9):7792.
117. Zhang J, Zhang X, Li Z, Wang Q, Shi Y, Jiang X, et al. The miR-124-3p/Neuropilin-1 Axis Contributes to the Proliferation and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer Cells and Co-Activates the TGF- β Pathway. *Front Oncol.* 2021 Apr 12;11.
118. Yin J, Zhang H, Wu X, Zhang Y, Li J, Shen J, et al. CD44 inhibition attenuates EGFR signaling and enhances cisplatin sensitivity in human EGFR wild-type non-small-cell lung cancer cells. *Int J Mol Med.* 2020 Jun;45(6):1783–92.
119. Okabe H, Ishimoto T, Mima K, Nakagawa S, Hayashi H, Kuroki H, et al. CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2014 Feb;110(4):958–66.
120. Wu G, Song X, Liu J, Li S, Gao W, Qiu M, et al. Expression of CD44 and the survival in glioma: a meta-analysis. *Biosci Rep.* 2020 Apr 30;40(4).

121. Liu Y, Wu T, Lu D, Zhen J, Zhang L. CD44 overexpression related to lymph node metastasis and poor prognosis of pancreatic cancer. *Int J Biol Markers*. 2018 Aug 23;33(3):308–13.
122. Wang Z, Tang Y, Xie L, Huang A, Xue C, Gu Z, et al. The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2019 Apr 30;9.
123. Kong T, Ahn R, Yang K, Zhu X, Fu Z, Morin G, et al. CD44 Promotes PD-L1 Expression and Its Tumor-Intrinsic Function in Breast and Lung Cancers. *Cancer Res*. 2020 Feb 1;80(3):444–57.
124. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013 Jun;31(6):539–44.
125. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front Cell Dev Biol*. 2017 Mar 23;5(MAR).
126. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2002 Jun;12(3):197–207.
127. Kunitomi H, Kobayashi Y, Wu RC, Takeda T, Tominaga E, Banno K, et al. LAMC1 is a prognostic factor and a potential therapeutic target in endometrial cancer. *J Gynecol Oncol*. 2020 Mar;31(2).
128. Fang L, Che Y, Zhang C, Huang J, Lei Y, Lu Z, et al. LAMC1 upregulation via TGFβ induces inflammatory cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma via NF-κB–CXCL1–STAT3. *Mol Oncol*. 2021 Nov;15(11):3125–46.
129. Xi D, Jia Q, Liu X, Zhang L, Xu B, Ma Z, et al. LAMC1 is a Novel Prognostic Factor and a Potential Therapeutic Target in Gastric Cancer. *Int J Gen Med*. 2022 Mar 19;15:3183–98.
130. Yu Z, Wang X, Niu K, Sun L, Li D. LncRNA TM4SF19-AS1 exacerbates cell proliferation, migration, invasion, and EMT in head and neck squamous cell carcinoma via enhancing LAMC1 expression. *Cancer Biol Ther*. 2022 Dec 31;23(1):1–9.
131. Wang YQ, Huang G, Chen J, Cao H, Xu WT. LncRNA SNHG6 promotes breast cancer progression and epithelial-mesenchymal transition via miR-543/LAMC1 axis. *Breast Cancer Res Treat*. 2021 Jul;188(1):1–14.

132. Lu YJ, Wang P, Wang X, Peng J, Zhu YW, Shen N. The significant prognostic value of circulating tumor cells in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Mar 17;7(24):37361–9.
133. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*. 2020 Jun 9;22.
134. Manoochchri M, Borhani N, Gerhäuser C, Assenov Y, Schönung M, Hielscher T, et al. DNA methylation biomarkers for noninvasive detection of triple-negative breast cancer using liquid biopsy. *Int J Cancer*. 2023 Mar;152(5):1025–35.
135. Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Jan;161(2):279–87.
136. Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody–drug conjugates for cancer. *The Lancet*. 2019 Aug 31;394(10200):793–804.
137. Li N, Yang L, Zhao Z, Du T, Liang G, Li N, et al. Antibody-drug conjugates in breast cancer: current evidence and future directions. Vol. 14, *Experimental Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2025.

6 Anhang

6.1 Sequenzen von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut}

6.1.1 Sequenz von rVAR2^{wt}

MGAHIVMVDAYKPTKNKIEEYLGAKSDDSKIDELLKADPSEVEYYRSGGDGDYLNKNICKITV
NHSDSGKYDPCEKKLPPYDDNDQWKCCQNSSDGSQKPNICVPPRRERLCTYNLENLKFD
KIRDNNAFLADVLLTARNEGEKIVQNHDPDTNSSNVCNALERSFADLADIIRGTDQWKGTNSN
LEKNLQMFQAKIRENDKVLQDKYPKDQKYTKLREAWWNANRQKVWEVITCGARSNDLLIKR
GWRGSGKSDRKNFELCRKCGHYEKEVPTKLDYVPQFLRWLTEWIEDFYREKQNLIDDME
RHREECTREDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCECVKKWKTEWENQENKYKDLYEQNKNT
SQKNTSRYDDYVKDFFEKLEANYSSLENYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANH
NDEACNCNESGISSVGQAQTSQPSSNKTCTHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIE
DTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYK
CDKCKSGTSRS**KKKWIIWKK**SSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCEDVKD
INFDTKCKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDILKGTISIWDN
EYTKDLELNLQNNFGKLFQKGIKKNNNTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWTAMKHGAE
MNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVTNCKSCKE
SGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKR
NRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGADK
APWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPGNTPYRYKYACQCKIPTNEETC
DDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDSSGRGELEGK
PIPNLLGLDSTRTGHHHHH

Abb. 35: Darstellung der Aminosäuresequenz von rVAR2^{wt}

Gelb markiert sind die Aminosäuren 555-562, welche im rVAR2^{mut}-Protein mutiert sind.

6.1.2 Sequenz von rVAR2^{mut}

MGAHIVMVDAYKPTKNKIEEYLGAKSDDSKIDELLKADPSEVEYYRSGGDGDYLNKNICKITV
NHSDSGKYDPCEKKLPPYDDNDQWKCCQNSSDGSQKPNICVPPRRERLCTYNLENLKFD
KIRDNNAFLADVLLTARNEGEKIVQNHDPDTNSSNVCNALERSFADLADIIRGTDQWKGTNSN
LEKNLQMFQAKIRENDKVLQDKYPKDQKYTKLREAWWNANRQKVWEVITCGARSNDLLIKR
GWRGSGKSDRKNFELCRKCGHYEKEVPTKLDYVPQFLRWLTEWIEDFYREKQNLIDDME
RHREECTREDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCECVKKWKTEWENQENKYKDLYEQNKNT
SQKNTSRYDDYVKDFFEKLEANYSSLENYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANH
NDEACNCNESGISSVGQAQTSQPSSNKTCTHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIE
DTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYK
CDKCKSGTSRS**AAAAIAAA**SSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCEDVKD
INFDTKCKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDILKGTISIWDN
EYTKDLELNLQNNFGKLFQKGIKKNNNTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWTAMKHGAE
MNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVTNCKSCKE
SGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKR
NRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGADK
APWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPGNTPYRYKYACQCKIPTNEETC
DDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDSSGRGELEGK
PIPNLLGLDSTRTGHHHHH

Abb. 36: Darstellung der Aminosäuresequenz von rVAR2^{mut}

Die Mutation von rVAR2^{mut} innerhalb der CS-Bindungsregion der Aminosäuren 555-562 ist in gelber Farbe markiert.

6.2 Analyse der Proben für die Massenspektrometrie-Analyse: MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen

6.2.1 MDA-MB-231 Zellen

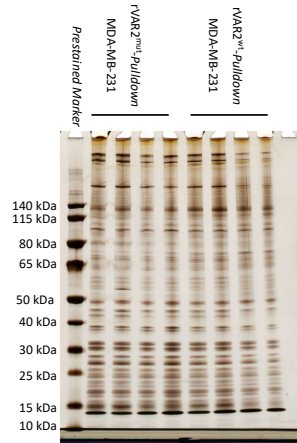


Abb. 37: Darstellung der Zielproteine von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} auf MDA-MB-231 Zellen im Polyacrylamidgel
Darstellung der MDA-MB-231 Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} im Polyacrylamidgel. kDa = Kilo-dalton.

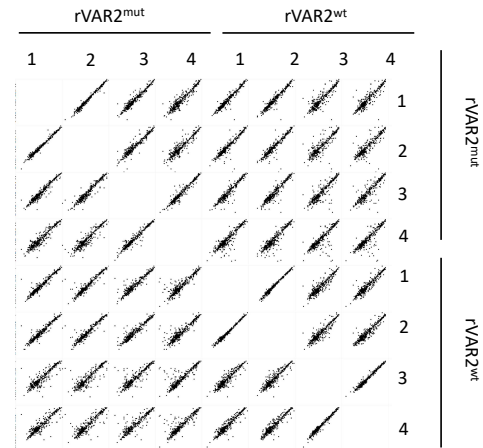


Abb. 38: Darstellung der Homogenität der MDA-MB-231 Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} im Multiscatter-plot

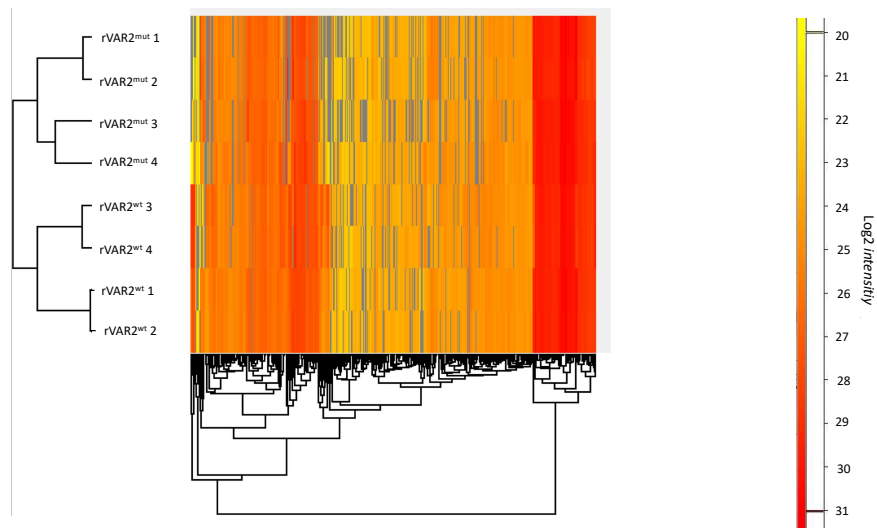


Abb. 39: Darstellung der Hierarchical Cluster Analysis der MDA-MB-231 Proben mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut}

Darstellung der Homogenität der MDA-MB-231 Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut}. Die Häufigkeit des Protein-Vorkommens ist anhand der Farbskala auf der rechten Bildseite dargestellt. Je öfter ein Protein in den Proben vorhanden war, desto intensiver die rote Farbe.

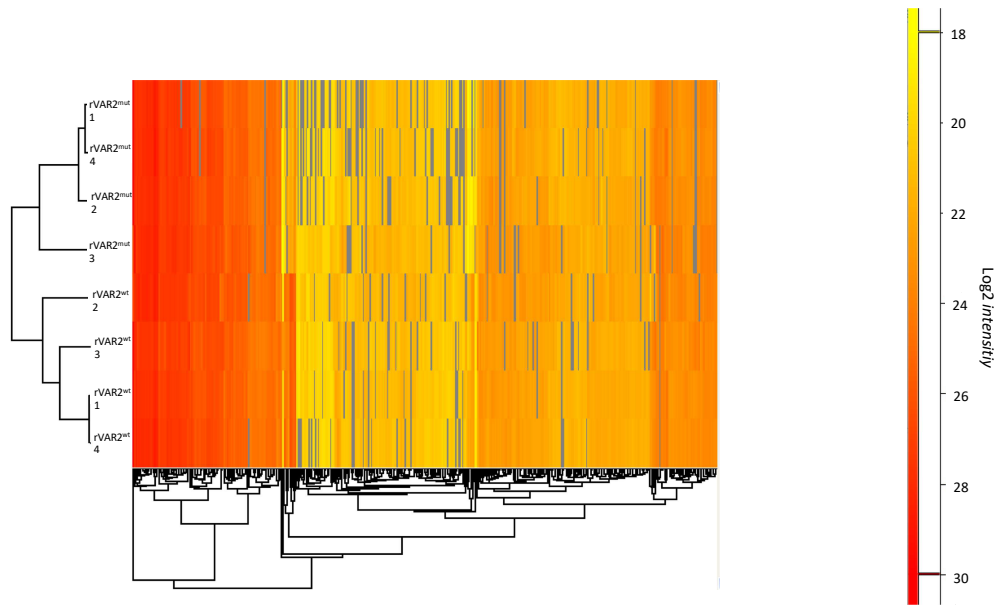


Abb. 43: Darstellung der *Hierarchical Cluster Analysis* der MCF-7 Proben mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut}
 Darstellung der Homogenität der MCF-7 Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut}. Die Häufigkeit des Protein-Vorkommens ist anhand der Farbskala auf der rechten Bildseite dargestellt. Je öfter ein Protein in den Proben vorhanden war, desto intensiver die rote Farbe.

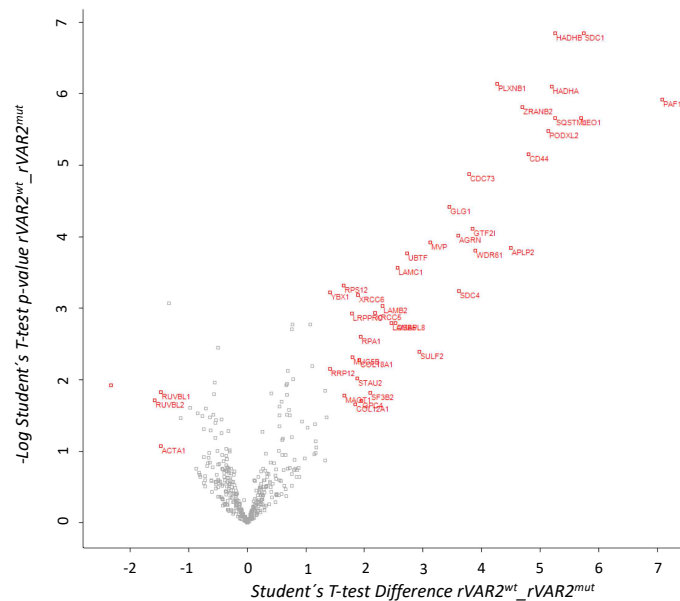


Abb. 44: Darstellung der Proteine in den MCF-7 Proben nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} im *Volcano Plot*

In rot dargestellt sind Proteine, welche signifikant und relevant vermehrt durch rVAR2^{wt} beziehungsweise rVAR2^{mut} gebunden wurden. Grau markiert sind Proteine, die sich zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschieden haben. Auf der Abzisse ist die Differenz eines Proteins zwischen den Proben mit rVAR2^{wt} und mit rVAR2^{mut} aufgetragen. Auf der Ordinate ist der *-Log Student's t-Test p-Value* angegeben.

6.3 Massenspektrometrie-Analyse: *Student's t-Test, Significance Analysis of Microarrays, False Discovery Rate 5 %*

6.3.1 MDA-MB-231 Zellen

Tabelle 12: Darstellung der *Student's t-Test* Statistik der MDA-MB-231-Proben, *Significance Analysis of Microarrays, False Discovery Rate* von 5 %

Gen	Standardabweichung rVAR2 ^{mut}	Standardabweichung rVAR2 ^{wt}	-Log Student's T-test p-Value rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}	Student's T-test q-Value rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}	Student's T-test Statistic rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}
NRP1	NaN	109223000	4,94681	0	6,11588
HLA-A	NaN	52159000	5,26987	0	5,92784
APLP2	265661	150854000	4,41129	0	5,63902
MMP14	NaN	20430700	5,70637	0	5,28656
HLA-C;HLA-Cw	NaN	7974530	5,82533	0	5,01609
DLAT	NaN	160089000	3,94811	0	4,91137
GLG1	NaN	90278600	3,81588	0	4,62075
GTF2I	NaN	14672200	4,84355	0	4,4211
PRDX4	NaN	59278700	4,19107	0	4,37024
WDR61	NaN	13758500	4,25428	0	4,14134
PAF1	NaN	10369200	3,69989	0	4,05056
CD74	NaN	7610150	5,06818	0	4,01729
LEO1	NaN	4327010	4,27065	0	3,99669
SQSTM1	NaN	67853700	3,7611	0	3,91577
TPP2	NaN	13056200	4,66886	0	3,90185
SRGN	NaN	34514100	3,68527	0	3,88301
HADHB	6860150	154798000	3,00185	0	3,85669
HLA-B	NaN	8236960	4,50886	0	3,7567
LAMC1	NaN	4930540	5,04628	0	3,65851
SDC1	NaN	78612300	3,08364	0	3,64112
CSF1	NaN	7197130	3,7766	0	3,56577
CD44	NaN	54366500	3,11622	0	3,49417
LAMB1	NaN	6940950	4,32635	0	3,42847
MRPS34	NaN	2459410	5,19289	0	3,39716
ABCD3	NaN	19230200	3,26822	0	3,33081
KCTD10	NaN	10794700	3,48126	0	3,32257
PDHX	NaN	27889400	3,1668	0	3,30116
TFRC	NaN	12797300	3,56544	0	3,27233
OSBPL8	238934	130555000	2,80786	0	3,20393
AGRN	NaN	17256500	3,43113	0	3,19568
PTRF	NaN	49805000	2,73857	0	3,08406
HADHA	9192770	134839000	2,41082	0	3,0674

CAV1	7164690	122541000	2,57852	0	2,9067
ERLIN1	NaN	37055100	2,6343	0	2,73777
CSPG4	NaN	80019300	2,20907	0	2,57228
SDC4	3136720	92841400	2,08977	0	2,50705
APP	NaN	4970300	3,468	0	2,47447
SRPX	3737240	16092000	2,52018	0	2,45102
LACTB	5887230	7250590	3,12694	0,00136585	2,35163
LAMA5	NaN	5385520	2,73705	0,00130233	2,32604
SDC2	819543	67354200	2,00262	0,00245455	2,23013
XRCC5	7818500	12117600	3,09043	0,00364444	2,18202
LGALS1	NaN	9432880	2,61542	0,00443478	2,14627
CAV2	NaN	12488400	2,06028	0,00434043	2,10651
CDC73	NaN	3561650	3,14539	0,00425	2,10505
XRCC6	14529400	4451930	4,58606	0,0084898	2,01026
KCTD13	NaN	11755400	1,9556	0,01	1,96134
AXL	NaN	14138600	1,87829	0,00980392	1,94536
ERLIN2	NaN	7890580	2,17145	0,0112308	1,79744
UBTF	12020700	42830400	1,6886	0,0133585	1,74838
RPS12	8024940	6413600	3,64941	0,0131111	1,72411
BYSL	NaN	1098200	2,31873	0,0128727	1,70881
SSB	NaN	1549480	2,53504	0,0174286	1,57713
LRP10	NaN	5080450	1,61967	0,0242807	1,50694
COL13A1	2024450	16220800	1,30938	0,0363448	1,42439
ITM2B	NaN	9528070	1,18795	0,0357288	1,41931
HNRNPC;HNRN- PCL3;HNRN- PCL1;HNRN- PCL4;HNRNPCL2	10362400	8827850	2,02657	0,0367213	1,40135
KRR1	384333	3161180	1,69551	0,0392903	1,38478
TRA2A	847046	5058670	1,44323	0,0426667	1,36888

Sortiert nach *Student's t-Test* Test-Statistik. rVAR2^{wt} = Wildtyp rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*, rVAR2^{mut} = mutiertes rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*.

6.3.2 MDA-MB-436 Zellen

Tabelle 13: Darstellung der *Student's t-Test* Statistik der MDA-MB-436-Proben, *Significance Analysis of Microarrays*, *False Discovery Rate* von 5 %

Gen	Standardabweichung rVAR2 ^{mut}	Standardabweichung rVAR2 ^{wt}	-Log Student's T-test p-value rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}	Student's T-test q-value rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}	Student's T-test Test statistic rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}
APLP2	NaN	0,299562	7,91473	0	10,0961
CD44	NaN	0,211284	6,49455	0	8,96566
NRP1	NaN	0,228313	5,8925	0	6,7686
CSPG4	NaN	0,407355	5,80943	0	6,36125

PAF1	NaN	0,198362	7,32407	0	5,49602
WDR61	NaN	0,174815	6,63972	0	5,38943
ABCD3	NaN	0,260254	5,74235	0	5,02388
TMEM154	NaN	0,437817	4,88972	0	4,73757
HLA-C;HLA-A;HLA-Cw	NaN	0,248739	5,90486	0	4,67352
TPP2	0,671259	0,358331	4,57797	0	4,48154
MGST1	0,0867916	0,370241	4,63988	0	4,31502
CSF1	NaN	0,302338	4,39748	0	4,13405
OXL2	NaN	0,429753	4,31239	0	3,87574
SDC1	0,573722	0,225922	4,41564	0	3,647
GTF2I	0,786343	0,217222	3,87597	0	3,49371
DLAT	NaN	0,621242	3,92739	0	3,38472
SQSTM1	0,478239	0,257822	4,42394	0	3,35976
GLG1	1,57454	0,497129	2,9248	0	3,33818
LRPPRC	0,116241	0,184109	6,18851	0	3,31283
MVP	NaN	0,323314	5,06522	0	3,26311
OSBPL8	NaN	0,277126	2,74558	0	3,23377
HADHB	0,584693	0,224743	3,94707	0	3,04833
SRPX	NaN	0,232184	2,7589	0	2,93579
LAMB1	NaN	0,220672	4,75176	0	2,88864
SLIRP	0,434664	0,198246	4,25205	0	2,86466
HADHA	0,646212	0,235072	3,63828	0	2,85051
LAMC1	NaN	0,325967	3,37932	0	2,8175
SDC4	0,39537	0,329985	4,06	0	2,79479
CAV1	NaN	0,646636	2,48317	0	2,77112
IMMT	NaN	0,283709	2,63888	0	2,62528
CCT6A	0,373035	0,0908731	4,31777	0	2,50403
CCT3	0,21658	0,225936	4,55921	0	2,35408
ATP5B	0,251181	0,516496	3,44928	0	2,33999
EWSR1	NaN	0,650009	1,89342	0,00140541	2,20794
CHCHD3	NaN	0,3499	2,69505	0,00136842	2,19947
ATP5A1	0,393314	0,207723	3,68425	0,0028	2,1569
FGF2	0,271648	0,269196	3,90504	0,00273171	2,11138
GPC1	0,201674	0,45179	3,44721	0,00266667	2,10859
PTRF	0,50534	0,503397	2,87856	0,00260465	2,10523
XRCC5	0,165999	0,325219	3,96553	0,00254545	2,08923
VDAC2	0,181485	0,663999	2,01982	0,00506667	2,02194
CHD1L	NaN	0,478296	2,51472	0,00495652	2,00785

HSP90AB 1;HSP90A A1	0,437275	0,379468	2,72607	0,00485106	1,97335
GPC4	0,0385436	0,266775	2,54229	0,00475	1,95526
CCT8	0,354003	0,119651	2,58399	0,00465306	1,94579
XRCC6	0,229299	0,223595	4,03653	0,00456	1,94205
YTHDF2	NaN	0,489726	2,06948	0,00447059	1,89298
PKM	NaN	0,539629	1,92925	0,00430189	1,87208
ATAD3B	0,313873	0,205278	3,46933	0,00568421	1,73597
TCP1	0,316335	0,197056	3,475	0,00558621	1,73181
GPC6	0,519002	0,416544	2,48906	0,00623729	1,68539
GTF3C3	0,130671	0,190151	3,41821	0,00603279	1,65052
EEF1G	0,44784	0,800904	2,02	0,00593548	1,62341
SDC2	0,226623	0,889736	1,95537	0,00636364	1,56963
HIST1H1 B	NaN	0,427777	1,21377	0,00716418	1,55333
HSPD1	0,187765	0,0832031	4,38282	0,00705882	1,54962
GAPDH	0,208089	0,511561	2,51499	0,00868571	1,50731
BYSL	0,122818	0,296711	3,26008	0,0103562	1,40821
VAPA	0,0744981	0,169684	1,85811	0,010973	1,39299
ATAD3A	0,343077	0,219887	2,79383	0,0106842	1,37815
PHB	NaN	0,0623724	1,3003	0,0112727	1,36599
TUBA1C; TUBA1B; TUBA8	0,269778	0,572563	2,10958	0,0126667	1,35486
SF3B3	0,247559	0,24634	1,49521	0,0125063	1,35473
KTN1	0,108526	0,399079	1,466	0,0121975	1,34651
PHB2	0,076576	0,0840182	1,51137	0,0120488	1,34312
HNRNPC	0,112275	0,0586425	5,03744	0,0122824	1,31349
VIM	0,683361	0,537523	1,68111	0,0121395	1,30676
PURB	0,309137	0,285727	1,25733	0,0122222	1,26922
PABPC1; PABPC3	0,196042	0,0951833	3,73594	0,0142174	1,2524
MTCH2	NaN	0,164567	1,332	0,0140645	1,25141
MAGT1	0,0721595	0,320684	2,02158	0,0144421	1,23626
SRP9;DK FZp564M 2223	0,517191	0,0857475	0,923459	0,015	1,23469
ACP1	NaN	0,0515046	1,34236	0,0180619	1,20908
SLC25A3	0,477109	0,220376	1,15838	0,0178776	1,20817
TUBB4B; TUBB4A	0,237848	0,65038	1,78468	0,017697	1,20735
TMCO1	0,478527	0,500946	1,04089	0,0178218	1,19314
MGST3	0,818761	0,24646	1,18576	0,0179417	1,18189
HIGD1A	0,305991	0,49296	1,38097	0,0183462	1,17949
CCT7	0,253739	0,149057	1,39702	0,0248972	1,11113

RPS12	0,235659	0,222785	2,69867	0,0251481	1,10778
EIF2B5	0,0649641	0,44423	1,25221	0,025945	1,10572
UPF1	NaN	0,152915	1,14426	0,0257091	1,10455
MAG-OHB;MA-GOH	0,317159	0,104529	1,27769	0,0267143	1,08675
PABPC4	0,14716	0,100201	3,80375	0,027469	1,08266
CDC73	0,826569	0,595148	1,28621	0,0269913	1,08089
ATP5O	0,285236	0,173783	2,58992	0,0273448	1,07838
RPA1	NaN	0,106491	0,861839	0,0275932	1,07475
RPN1	0,0707004	0,121735	4,27092	0,028	1,06436
CYC1	0,197975	0,0941202	3,33569	0,0277686	1,06413
CCT2	0,148011	0,349839	1,12889	0,0279032	1,06091
SGPL1	0,277716	0,131903	2,68628	0,02944	1,05597
ASPH	0,355273	0,0498955	2,40716	0,0290625	1,04587
LARP1	NaN	0,213341	0,987672	0,0289846	1,03286
RBM4	NaN	0,0398085	1,19822	0,0324478	1,00002
FAM120A	0,103255	0,215519	1,04557	0,0362628	0,989041
GNB2L1	0,41848	0,56867	1,41584	0,0376812	0,979047
RRP12	0,219308	0,298024	1,4662	0,0388777	0,970211
IARS	0,344384	0,238692	1,97643	0,0417063	0,947689
DDX6	0,0648131	0,266907	0,991328	0,0414167	0,945817
ATXN2L	NaN	0,251197	0,769615	0,0418483	0,941943
GTF3C5	NaN	0,507287	0,791781	0,0415616	0,941901
RARS	0,297242	0,169856	2,24958	0,0431351	0,934277
AGRN	NaN	0,483157	0,898622	0,0438389	0,931926
FUS	0,232683	0,967061	1,05373	0,0444768	0,921146
EPRS	0,221062	0,200591	2,44127	0,0441842	0,920057
SRSF7	NaN	0,0934776	0,621529	0,0454805	0,91351
KRR1	NaN	0,121316	1,44659	0,0464872	0,903672
HIST1H4A	0,374232	0,0682812	2,00835	0,0465342	0,896302

Sortiert nach *Student's t-Test* Test-Statistik. rVAR2^{wt} = Wildtyp rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*, rVAR2^{mut} = mutiertes rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*.

6.3.3 MCF-7 Zellen

Tabelle 14: Darstellung der *Student's t-Test* Statistik der MCF-7-Proben, *Significance Analysis of Microarrays*, *False Discovery Rate* von 5 %

Gen	Standard-abweichung rVAR2 ^{mut}	Standardabweichung rVAR2 ^{wt}	-Log Student's T-test p-value rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}	Student's T-test q-value rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}	Student's T-test Test statistic rVAR2 ^{wt} rVAR2 ^{mut}
PAF1	71176,6	5188290	5,91726	0	7,08079
SDC1	908656	12682700	6,84372	0	5,74558
LEO1	NaN	978723	5,66096	0	5,69852

SQSTM1	NaN	3621390	5,65768	0	5,2542
HADHB	492567	10172500	6,84536	0	5,25354
HADHA	463294	10750000	6,09472	0	5,1986
PODXL2	NaN	3257210	5,47976	0	5,14062
CD44	NaN	4542150	5,15013	0	4,79981
ZRANB2	NaN	248076	5,81078	0	4,69314
APLP2	NaN	6290060	3,84781	0	4,50322
PLXNB1	NaN	487070	6,13529	0	4,26236
WDR61	530867	13863400	3,80074	0	3,89262
GTF2I	240523	1703250	4,10808	0	3,84676
CDC73	NaN	453778	4,87562	0	3,78354
SDC4	1014420	7892030	3,23835	0	3,61095
AGRN	107841	2080390	4,01691	0	3,59814
GLG1	282404	1406280	4,41965	0	3,45124
MVP	NaN	656924	3,9172	0	3,13077
SULF2	NaN	2757660	2,39186	0	2,93619
UBTF	3045310	12551200	3,76409	0	2,72757
LAMC1	90439	999388	3,56805	0	2,5689
OSBPL8	NaN	666262	2,79055	0	2,52899
LAMA5	108493	1423310	2,79497	0	2,45805
LAMB2	NaN	773896	3,02848	0	2,30907
XRCC5	1108080	4928050	2,93689	0	2,18038
SF3B2	NaN	470670	1,81434	0,00251852	2,09907
GPC4	NaN	882033	1,70398	0,00242857	1,94546
RPA1	19721,6	1041550	2,60587	0,00234483	1,9341
COL18A1	88607,3	1541110	2,2813	0,00226667	1,91525
XRCC6	2754800	6386410	3,18082	0,00490323	1,8891
STAU2	NaN	319064	2,01601	0,00475	1,88183
COL12A1	NaN	673655	1,65868	0,00593939	1,84772
MUC5B	NaN	571089	2,31967	0,00776471	1,80108
LRPPRC	374574	574505	2,92842	0,00754286	1,7824
MAGT1	NaN	427166	1,78114	0,0135556	1,6558
RPS12	1050190	1219440	3,31446	0,0131892	1,64202
YBX1	3442370	14063500	3,21997	0,0428293	1,41758
RRP12	NaN	110906	2,14991	0,0430476	1,41368

Sortiert nach *Student's t-Test* Test-Statistik. rVAR2^{wt} = Wildtyp rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*, rVAR2^{mut} = mutiertes rekombinantes *Variant Surface Antigen 2*.

6.4 Proteinnamen der in Tabelle 9 aufgelisteten Gene

Tabelle 15: Auflistung der Gene sowie der zugehörigen Proteine aus Tabelle 9

Genname	Proteinname
ABCD3	<i>ATP-Binding Cassette Sub-Family D Member 3</i>
ACP1	<i>Acid Phosphatase 1</i>
AGRN	<i>Agrin</i>
APLP2	<i>Amyloid-like Protein 2</i>
APP	<i>Amyloid beta Precursor Protein</i>
ASPH	<i>Aspartyl/Asparaginyl beta-Hydroxylase</i>
ATAD3A	<i>ATPase Family AAA Domain-Containing Protein 3A</i>
ATAD3B	<i>ATPase Family AAA Domain-Containing Protein 3B</i>
ATP5A1	<i>ATP Synthase Subunit alpha</i>
ATP5B	<i>ATP Synthase Subunit beta</i>
ATP5O	<i>ATP Synthase Subunit O, mitochondrial</i>
ATXN2L	<i>Ataxin-2-like Protein</i>
AXL	<i>AXL Receptor Tyrosine Kinase</i>
BYSL	<i>Bystin Like</i>
CAV1	<i>Caveolin 1</i>
CAV2	<i>Caveolin 2</i>
CCT2	<i>Chaperonin Containing TCP1 Subunit 2</i>
CCT3	<i>Chaperonin Containing TCP1 Subunit 3</i>
CCT6A	<i>Chaperonin Containing TCP1 Subunit 6A</i>
CCT7	<i>Chaperonin Containing TCP1 Subunit 7</i>
CCT8	<i>Chaperonin Containing TCP1 Subunit 8</i>
CD44	<i>CD44 Antigen</i>
CD74	<i>CD74 Molecule</i>
CDC73	<i>Cell Division Cycle 73</i>
CHCHD3	<i>Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 3</i>
CHD1L	<i>Chromodomain-Helicase-DNA-Binding Protein 1-like</i>
COL12A1	<i>Collagen alpha-1(XII) Chain</i>
COL13A1	<i>Collagen Type XIII alpha 1 Chain</i>
COL18A1	<i>Collagen alpha-1(XVIII) Chain</i>
CSF1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
CSPG4	<i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4</i>
CYC1	<i>Cytochrome c1</i>
DDX6	<i>DEAD-box Helicase 6</i>
DLAT	<i>Dihydrolipoamide S-Acetyltransferase</i>
EEF1G	<i>Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 gamma</i>
EIF2B5	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Subunit epsilon</i>
EPRS	<i>Glutamyl-Prolyl-tRNA Synthetase</i>
ERLIN1	<i>ER Lipid Raft Associated 1</i>

ERLIN2	<i>ER Lipid Raft Associated 2</i>
EWSR1	<i>EWS RNA Binding Protein 1</i>
FAM120A	<i>Family with Sequence Similarity 120A</i>
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FUS	<i>FUS RNA Binding Protein</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GLG1	<i>Golgi Apparatus Protein 1</i>
GNB2L1	<i>Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunit beta-2-like 1</i>
GPC1	Glypican 1
GPC4	Glypican 4
GPC6	Glypican 6
GTF2I	<i>General Transcription Factor II-I</i>
GTF3C3	<i>General Transcription Factor IIIC Subunit 3</i>
GTF3C5	<i>General Transcription Factor IIIC Subunit 5</i>
HADHA	<i>Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Trifunctional Multienzyme Complex Subunit alpha</i>
HADHB	<i>Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Trifunctional Multienzyme Complex Subunit beta</i>
HIGD1A	<i>HIG1 Domain Family Member 1A, mitochondrial</i>
HIST1H1B	<i>Histone H1.5</i>
HIST1H4A	<i>Histone H4</i>
HLA-A	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, A</i>
HLA-B	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, B</i>
HLA-C;HLA-A;HLA-Cw	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, C; Major Histocompatibility Complex, Class I, A</i>
HNRNPC;HNRN-PCL3;HNRN-PCL1;HNRN-PCL4;HNRN-PCL2	<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins C1/C2;Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C-like 3;Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C-like 1;Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C-like 4;Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C-like 2</i>
HSP90AB1;HSP90AA1	<i>Heat Shock Protein HSP 90-beta;Heat Shock Protein HSP 90-alpha</i>
HSPD1	<i>Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1</i>
IARS	<i>Isoleucyl-tRNA Synthetase 1</i>
IMMT	<i>Inner Membrane Mitochondrial Protein</i>
ITM2B	<i>Integral Membrane Protein 2B</i>
KCTD10	<i>Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 10</i>
KCTD13	<i>Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 13</i>
KRR1	<i>KRR1 Small Subunit Processome Component Homolog</i>
KTN1	<i>Kinectin</i>
LACTB	<i>Lactamase beta</i>
LAMA5	<i>Laminin Subunit Alpha 5</i>
LAMB1	<i>Laminin Subunit Beta 1</i>
LAMB2	<i>Laminin Subunit Beta 2</i>

LAMC1	<i>Laminin Subunit Gamma 1</i>
LARP1	<i>La Ribonucleoprotein 1, Translational Regulator</i>
LEO1	<i>LEO1 Homolog, Paf1/RNA Polymerase II Complex Component</i>
LGALS1	<i>Galectin-1</i>
LRP10	<i>Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 10</i>
LRPPRC	<i>Leucine Rich Pentatricopeptide Repeat Containing</i>
MAGOHB;MA-GOH	<i>Protein Mago Nashi Homolog 2</i>
MAGT1	<i>Magnesium Transporter Protein 1</i>
MGST1	<i>Microsomal Glutathione S-Transferase 1</i>
MGST3	<i>Microsomal Glutathione S-Transferase 3</i>
MMP14	<i>Matrix Metalloproteinase-14</i>
MRPS34	<i>Mitochondrial Ribosomal Protein S34</i>
MTCH2	<i>Mitochondrial Carrier Homolog 2</i>
MUC5B	<i>Mucin-5B</i>
MVP	<i>Major Vault Protein</i>
NRP1	<i>Neuropilin 1</i>
OSBPL8	<i>Oxysterol-Binding Protein-Related Protein 8</i>
PABPC1;PABPC3	<i>Polyadenylate-Binding Protein 1;Polyadenylate-Binding Protein 3</i>
PABPC4	<i>Polyadenylate-Binding Protein 4</i>
PAF1	<i>PAF1 Homolog, Paf1/RNA Polymerase II Complex Component</i>
PDHX	<i>Pyruvate Dehydrogenase Complex Component X</i>
PHB	<i>Prohibitin</i>
PHB2	<i>Prohibitin-2</i>
PKM	<i>Pyruvate Kinase M1/2</i>
PLXNB1	<i>Plexin-B1</i>
PODXL2	<i>Podocalyxin-like Protein 2</i>
PRDX4	<i>Peroxiredoxin-4</i>
PTRF	<i>Polymerase I and Transcript Release Factor</i>
PURB	<i>Transcriptional Activator Protein Pur-beta</i>
RARS	<i>Arginyl-tRNA Synthetase 1</i>
RBM4	<i>RNA-Binding Protein 4</i>
RPA1	<i>Replication Protein A1</i>
RPN1	<i>Ribophorin I</i>
RPS12	<i>Ribosomal Protein S12</i>
RRP12	<i>Ribosomal RNA Processing 12 Homolog</i>
SDC1	<i>Syndecan 1</i>
SDC2	<i>Syndecan 2</i>
SDC4	<i>Syndecan 4</i>
SF3B2	<i>Splicing Factor 3B Subunit 2</i>
SF3B3	<i>Splicing Factor 3B Subunit 3</i>
SGPL1	<i>Sphingosine-1-Phosphate Lyase 1</i>

SLC25A3	<i>Solute Carrier Family 25 Member 3</i>
SLIRP	<i>SRA Stem-Loop Interacting RNA Binding Protein</i>
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
SRGN	<i>Serglycin</i>
SRP9;DKFZp564M2223	<i>Signal Recognition Particle 9 kDa Protein</i>
SRPX	<i>Sushi Repeat-Containing Protein X-linked</i>
SRSF7	<i>Serine/Arginine-rich Splicing Factor 7</i>
SSB	<i>Small RNA Binding Exonuclease Protection Factor La</i>
STAU2	<i>Staufen Double-Stranded RNA Binding Protein 2</i>
SULF2	<i>Extracellular Sulfatase Sulf-2</i>
TCP1	<i>T-complex Protein 1 Subunit alpha</i>
TFRC	<i>Transferrin Rezeptor</i>
TMCO1	<i>Transmembrane and Coiled-Coil Domain-Containing Protein 1</i>
TMEM154	<i>Transmembrane Protein 154</i>
TPP2	<i>Tripeptidyl-Peptidase 2</i>
TRA2A	<i>Transformer-2 Protein Homolog alpha</i>
TUBA1C;TUBA1B;TUBA8	<i>Tubulin alpha-1C Chain;Tubulin alpha-8 Chain</i>
TUBB4B;TUBB4A	<i>Tubulin beta-4B Chain;Tubulin beta-4A Chain</i>
UBTF	<i>Upstream Binding Transcription Factor</i>
UPF1	<i>UPF1 RNA Helicase and ATPase</i>
VAPA	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein A</i>
VDAC2	<i>Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 2</i>
VIM	<i>Vimentin</i>
WDR61	<i>WD Repeat-Containing Protein 61</i>
XRCC5	<i>X-ray Repair Cross-Complementing Protein 5</i>
XRCC6	<i>X-ray Repair Cross-Complementing Protein 6</i>
YBX1	<i>Y-box Binding Protein 1</i>
YTHDF2	<i>YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 2</i>
ZRANB2	<i>Zinc Finger Ran-Binding Domain-Containing Protein 2</i>

Die Gene sind in der Tabelle alphabetisch sortiert.

6.5 Auflistung potenzieller Zielproteine von rVAR2^{wt} auf jeweils einer Mammakarzinom-Zelllinie

Tabelle 16: Übersicht der potenziellen Zielproteine von rVAR2^{wt} auf jeweils einer Mammakarzinom-Zelllinie mit Lokalisation auf der Zelloberfläche

MDA-MB-231 Zellen	MDA-MB-436 Zellen	MCF-7 Zellen
<i>Amyloid beta Precursor Protein</i>	<i>ATP Synthase F1 Subunit alpha</i>	Plexin B1
<i>AXL Receptor Tyrosine Kinase</i>	<i>Ataxin 2 Like</i>	Sulfatase 2

MDA-MB-231 Zellen	MDA-MB-436 Zellen	MCF-7 Zellen
Caveolin 2	<i>EWS RNA Binding Protein 1</i>	<i>Y-box Binding Protein 1</i>
CD74	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	
<i>Collagen Type XIII alpha 1 Chain</i>	Glypican 1	
<i>Integral Membrane Protein 2B</i>	Glypican 6	
<i>LDL Receptor Related Protein 10</i>	<i>Heat Shock Protein 90 alpha Family Class B Member 1</i>	
<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, B</i>	Prohibitin 1	
Matrix Metalloproteinase 14	Prohibitin 2	
<i>Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 10</i>	<i>Receptor for Activated C Kinase 1</i>	
<i>Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 13</i>	<i>VAMP Associated Protein A</i>	
Transferrin Rezeptor	Vimentin	

In Fettdruck hervorgehoben wurden Proteine, welche glykosyliert sind. Die Proteine sind in der Tabelle alphabetisch sortiert. rVAR2^{wt} = rekombinantes Wildtyp *Variant Surface Antigen 2*.

6.6 Vollständige Darstellung aller aufgelisteten Western Blot-Bilder

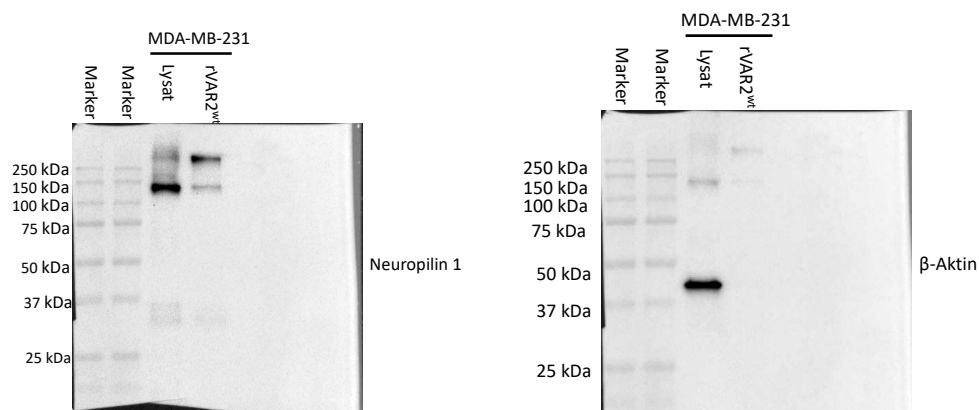


Abb. 8: Exemplarische Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 Zellen
 Links: Expression von Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 Zellen und Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 Zellen.

Rechts: Expression von β-Aktin auf MDA-MB-231 Zellen und Bindung von von rVAR2^{wt} an β-Aktin auf MDA-MB-231 Zellen. kDa = Kilodalton, N = 9.

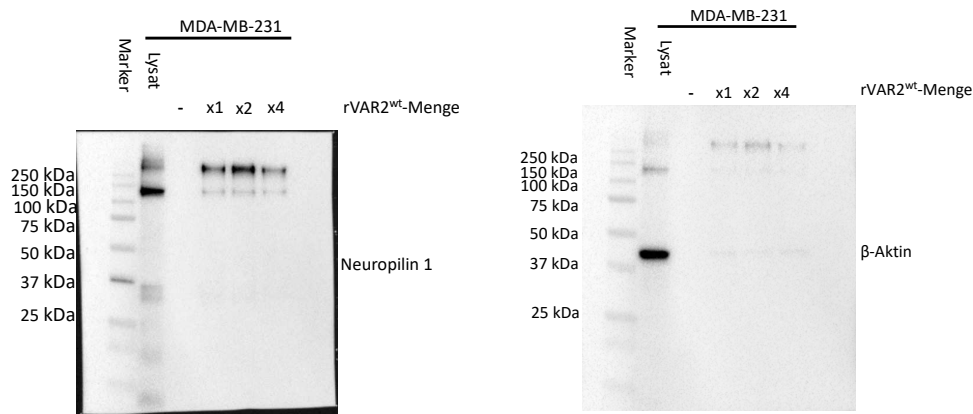


Abb. 9: Exemplarische Darstellung des Vergleiches der Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 Zellen bei Verwendung verschiedener rVAR2-Mengen

Links: Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 bei Verwendung verschiedener rVAR2^{wt}-Mengen auf MDA-MB-231 Zellen.

Rechts: Expression von β -Aktin auf MDA-MB-231 Zellen und Bindung von rVAR2^{wt} in unterschiedlichen Mengen an β -Aktin auf MDA-MB-231 Zellen.

„-“ = rVAR2-freie-Beads, „x1“ = rVAR2-Pulldown mit einfacher Menge: 18,74 μ g rVAR2^{wt} und 1,7 μ g *SpyCatcher*. „x2“ = rVAR2-Pulldown mit zweifacher Menge: 37,48 μ g rVAR2^{wt} und 3,4 μ g *SpyCatcher*. „x4“ = rVAR2-Pulldown mit vierfacher Menge: 74,96 μ g rVAR2^{wt} und 6,8 μ g *SpyCatcher*. kDa = Kilodalton, N = 3.

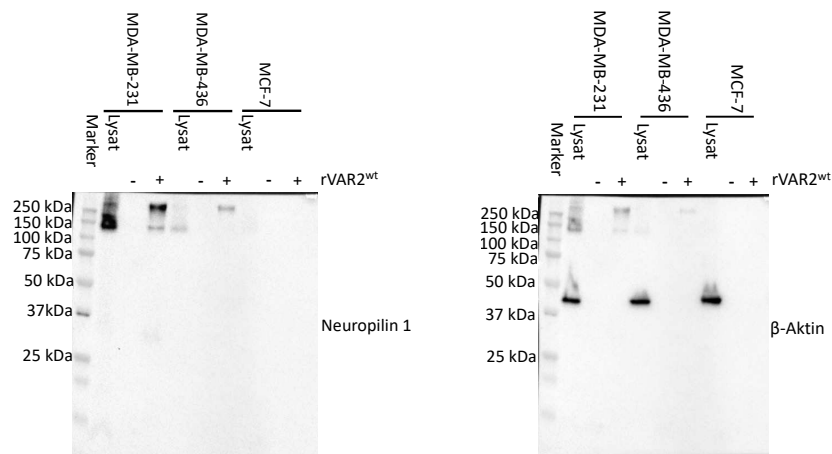


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der Bindung rVAR2-freier-Beads an Neuropilin 1 auf verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien im Vergleich zur Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf verschiedenen Brustkrebszelllinien (links)

kDa = Kilodalton, N = 3.

Abb. 12: Exemplarische Darstellung von β -Aktin im Zelllysat der Mammakarzinom-Zelllinien sowie Bindung von rVAR2^{wt} an β -Aktin (rechts)

kDa = Kilodalton, N = 3.

Abb. 16: Exemplarische Darstellung der Expression von Neuropilin 1 sowie des Vergleiches der Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 sowie auf der luminalen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7

Dargestellt ist das Vorkommen von Neuropilin 1 (links) und β -Aktin (rechts) im Lysat sowie in den Ansätzen nach *Pulldown* mit rVAR2^{wt} bei triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen. kDa = Kilodalton, N = 3.

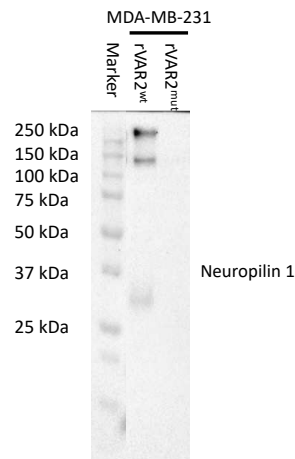


Abb. 13: Exemplarische Darstellung des Vergleiches der Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 Zellen
kDa = Kilodalton, N = 3.

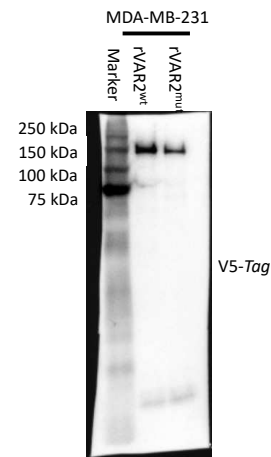


Abb. 14: Exemplarische Darstellung des Nachweises von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} im Western Blot mittels Anti-V5-Antikörper
kDa = Kilodalton, N = 3.

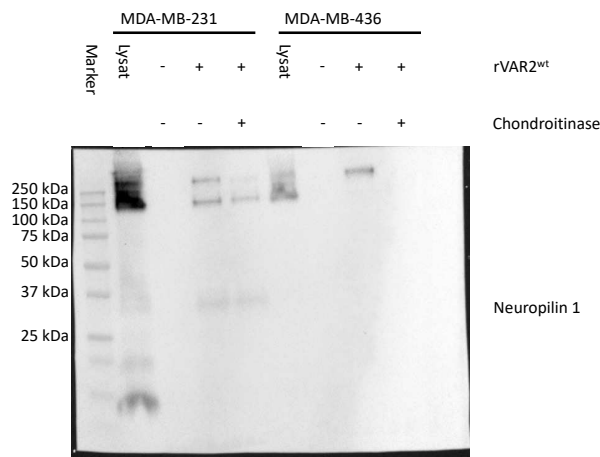


Abb. 15: Exemplarische Darstellung des Vergleiches der Bindung von rVAR2^{wt} an Neuropilin 1 auf MDA-MB-231 und MDA-MB-436 Zellen mit Chondroitinase und ohne Chondroitinase-Behandlung
kDa = Kilodalton, N = 3.

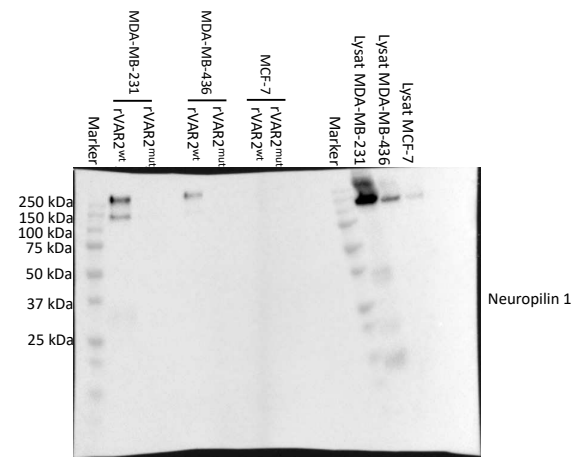


Abb. 25: Exemplarische Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an Neuropilin 1 auf triple-negativen und luminalen Brustkrebszelllinien
kDa = Kilodalton, N = 3.

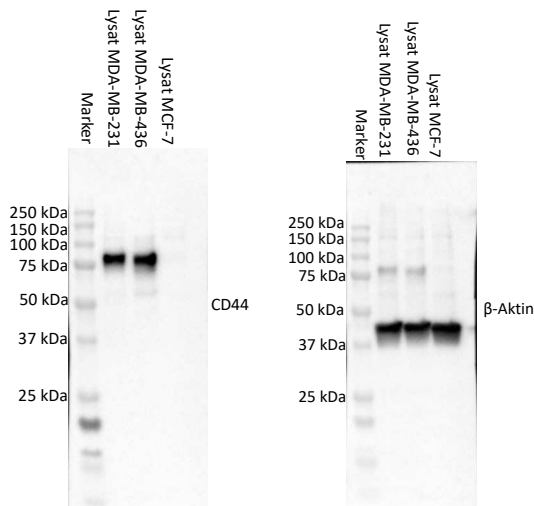


Abb. 27: Exemplarische Darstellung der CD44-Expression von triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen
CD44-Expression (links) sowie β-Aktin-Expression (rechts) von triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen. kDa = Kilodalton, N = 4.

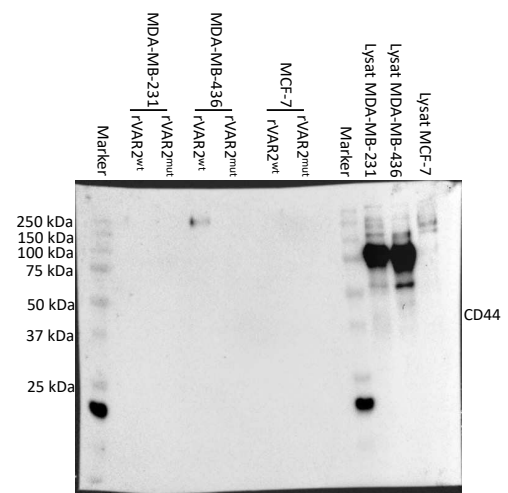


Abb. 29: Exemplarische Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an CD44 auf triple-negativen und luminalen Brustkrebszellen
kDa = Kilodalton, N = 3.

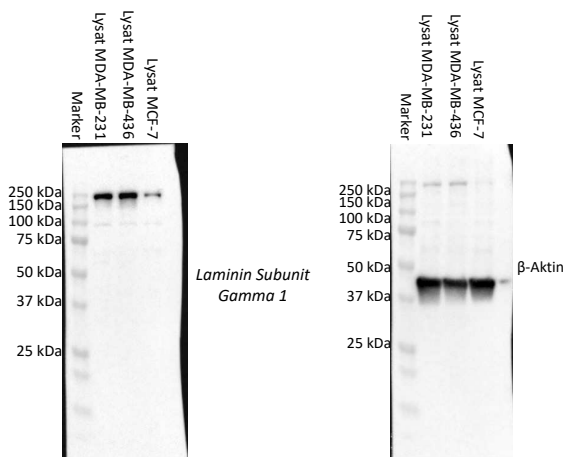


Abb. 31: Exemplarische Darstellung der Expression von Laminin Subunit Gamma 1 auf triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen
Expression von Laminin Subunit Gamma 1 (links) und β-Aktin (rechts) von triple-negativen und luminalen Mammakarzinom-Zellen, kDa = Kilodalton, N = 4.

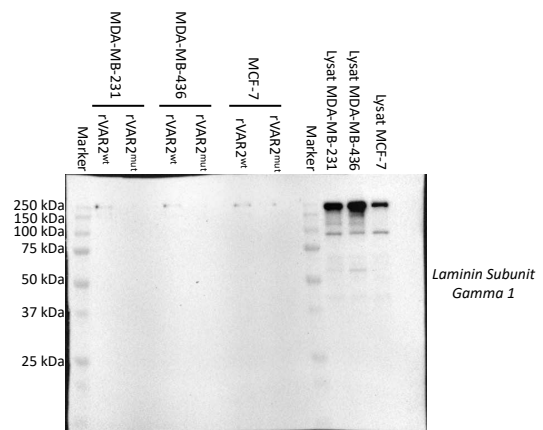


Abb. 33: Exemplarische Darstellung der Bindung von rVAR2^{wt} und rVAR2^{mut} an Laminin Subunit Gamma 1 auf triple-negativen und luminalen Brustkrebszellen
kDa = Kilodalton, N = 3.

Danksagung

Für die Betreuung und Hilfestellung meiner Promotion durch mehrere Personen möchte ich mich sehr herzlichst bedanken. Ohne dessen wäre meine Doktorarbeit in dieser Art und Weise nicht realisierbar gewesen.

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle herzlichst bei Prof. Dr. Neubauer für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in den Laboren des Instituts für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu schreiben. Durch dieses sehr interessante Projekt hatte ich somit die Gelegenheit mein Wissen sowie Verständnis über die Brustkrebsforschung stark zu erweitern. Danken möchte ich ebenso Prof. Dr. Stoecklein für die Co-Betreuung meiner Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Dr. André Franken aus der Arbeitsgruppe Translationale Gynäkoonkologie, welcher mich während meiner gesamten Zeit im Labor zu jeder Zeit unterstützt hat. Durch seine fachliche Erfahrung, Engagement, kompetente Hilfestellung und freundliche Art war er mir eine große Unterstützung.

Ein großer Dank gebührt ebenfalls Dr. Gereon Poschmann, Leiter der Arbeitsgruppe *Functional Proteomics and Protein Analysis* des Biologisch-Medizinisches Forschungszentrums der Heinrich-Heine-Universität, für seine fachliche Unterstützung sowie Durchführung der Massenspektrometrie-Analyse meiner Proben. Des Weiteren gilt mein Dank an Ali Salanti, Mette Agerbæk, Hanna Wietz, Caroline Krahn und Hamna Mahmood, ohne deren Vorarbeiten und Unterstützung meine Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Ich möchte mich auch herzlichst bei allen anderen Mitgliedern des Labors der Frauenklinik des UKD bedanken, für dessen Unterstützung ich sehr dankbar bin und welche mir meine Zeit im Labor sehr angenehm gestaltet haben.

Mein besonderer Dank gilt abschließend jenem, ohne dessen Hilfe ich meine Doktorarbeit nicht hätte realisieren können. Vielen Dank an meine Familie und meinen Freund, für die bedingungslose Unterstützung zu jeder Zeit.