

5 Zusammenfassung

Für die Tumorentstehung- und entwicklung spielen Kontrollmechanismen zur Regulation von oxidativen Stress eine entscheidende Rolle. Transformierte Zellen generieren mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und tragen damit nicht nur zur genomischen Instabilität bei, sondern nutzen hohe ROS Konzentrationen auch zur Steigerung der eigenen Proliferationsrate.

Ziel der Arbeit sollte es sein, antioxidative Systeme in Krebszellen besser zu verstehen. Dazu wurde In einem ersten Schritt der Arbeit zunächst ein mittels Affymetrix Gene Array generierter Datensatz von Patienten mit nodal-negativem Mammakarzinom untersucht. Die Gesamtzahl von n=788 Patienten setzte sich aus den drei Kohorten Mainz, Rotterdam und Transbig zusammen. Ziel der Studie war es, solche Gene zu identifizieren, die in Abhängigkeit des HER2-Rezeptors, welcher als klinisch relevanter prognostischer Marker gilt und in 25-30% aller Brustkrebspatienten überexprimiert wird, ein verändertes Expressionsmuster aufzeigen und prognostischen Einfluss im Mammakarzinom besitzen. Zusätzlich sollten solche Gene untersucht werden, die den Redox Status der Zelle kontrollieren. Im zweiten Schritt sollte die Relevanz der identifizierten Gene unter Verwendung der HER2-Rezeptor überexprimierenden MCF-7/NeuT Brustkrebszelllinie untersucht werden.

Die Analyse des Datensatzes von Patienten mit nodal-negativem Mammakarzinom hat aufgezeigt, dass allein drei Mitglieder des Thioredoxinsystems, Thioredoxin Reduktase (TrxR), Thioredoxin (Trx) und Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP), Schlüsselenzyme zur Kontrolle von oxidativen Stress, ein verändertes Expressionsmuster aufweisen und zudem mit Prognose assoziiert sind. In den drei einzelnen sowie in der Gesamtkohorte war TrxR mit schlechter Prognose assoziiert. Im Gegensatz dazu war TXNIP in der Gesamtkohorte mit verbesserter Prognose assoziiert, ähnliche Ergebnisse zeigten auch die einzelnen Kohorten Mainz, Rotterdam und Transbig. HER2-Rezeptor positive Patienten zeigten sowohl in den einzelnen als auch in der Gesamtkohorte eine deutlich gesteigerte Genexpression von TrxR auf. Der HER2-Rezeptor wurde als ein Faktor identifiziert, der das Redox-Gleichgewicht unvorteilhaft beeinflusst. Die induzierbare Expression des HER2-Rezeptors zeigte in MCF-7/NeuT Zellen nicht nur eine stark gesteigerte Expression von TrxR, sondern

auch eine unmittelbar verminderte Expression von TXNIP. Der Eintritt der Zellen in die vorzeitige Seneszenz und die nachfolgende Hochregulation von TXNIP war außerdem durch eine Akkumulation von ROS begleitet. Untersuchungen des Redox Gleichgewichts in MCF-7/NeuT Zellen durch entsprechende Immunoblot-Verfahren zeigten neben hohen ROS Konzentrationen auch eine gesteigerte Aktivität von Trx und die Entkopplung von seinem Substrat, dem Peroxiredoxinsystem, auf, um die Zelle vor weiteren Schädigungen zu schützen. Dies repräsentiert ein bemerkenswertes Ergebnis und stellt einen Mechanismus der Adaption hinsichtlich eines gesteigerten Levels an oxidativem Stress dar. Eine gesteigerte Aktivität antioxidativ wirkender Mechanismen und die Akkumulation von ROS sind signifikante Charakteristika für Tumore und bieten einen Überlebensvorteil.

Ein direkter Einfluss des HER2-Rezeptors auf die Expression des Thioredoxinsystems wurde bislang nicht beschrieben. Darum wurde versucht, den zugrunde liegenden Mechanismus zu verstehen. Inhibition der RAS/MEK/ERK, p38/MAPK, PI3K/AKT und SAPK/JNK Signalwege mittels „*small molecule*“ Inhibitoren und Knockdown Versuche sollten Aufschluss über die Regulation der gesteigerten TrxR Expression geben. Diese Untersuchungen führten allerdings zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Die Relevanz der gesteigerten Menge an reduzierten Trx und einen möglichen Zusammenhang mit Autophagie wurde durch „*small molecule*“ Inhibitoren und Knockdown Versuchen untersucht. Hinweise zur Regulation redox-sensitiver Proteine in der Autophagie durch Trx sind bereits in der Literatur beschrieben. Um Veränderungen in der Autophagie zu verifizieren, wurde das Markerprotein für Autophagie, LC3-II, mittels Immunoblot untersucht. Eine Beteiligung von Trx an die durch HER2-induzierte oder basale Autophagie konnte nicht eindeutig aufgezeigt werden. Allerdings konnte eine Abnahme der Zellvitalität in Trx defizienten Zellen detektiert werden und unterstreicht die enorme Bedeutung antioxidativ wirkender Mechanismen zur Regulation von oxidativen Stress in Tumorzellen.

Schlussendlich zeigten die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit, dass dem Thioredoxinsystem auch im Mammakarzinom eine bedeutende Rolle zukommt und daher einen möglichen Angriffspunkt für neuartige Therapeutika zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten für Brustkrebspatienten liefert.