

Aus dem
Institut für Gynäkopathologie
Zentrum für klinische Pathologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Löning

**Untersuchungen zur Rolle der Fos-Familie von Transkriptionsfaktoren für die
Invasivität der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Birte Andritzky
aus Reinbek

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 22.11.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. Th. Löning

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter:

Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter:

Prof. Dr. F. Jänicke

für meinen Vater,
der bestimmt stolz wäre

I. Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	9
2. Einleitung.....	11
2.1. Das Mammakarzinom	11
2.2. Der AP-1-Komplex	13
2.2.1. Die Fos-Proteine	14
2.2.2. Die Jun-Proteine	17
2.3. Invasivität von Tumoren	18
2.3.1. Matrixmetalloproteasen (MMP's).....	19
2.3.2. Das uPA / PAI-System	20
3. Material und Methoden.....	22
3.1. Zellkultur.....	22
3.1.1. Zelllinie MCF7	22
3.1.2. Splitten der Zellen	22
3.1.3.Überführen in größere Zellkulturflaschen	23
3.1.4. Ausplattieren der Zellen	23
3.2. Transiente Transfektion mit Expressionsvektoren.....	24
3.2.1. Transfektionsvorgang.....	24
3.2.2. Gewinnung der Proteinextrakte nach Transfektion	26
3.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	26
3.3. Western-Blot-Analyse.....	27
3.3.1. Aufbereitung der Proteinproben	27
3.3.2. Auftrennung der Proteinproben in der SDS-Polyacrylamidgel- Elektrophorese	28
3.3.3. Blotten	29
3.3.4. Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper	30
3.3.5. Detektion	31
3.4. Invasions-Assays nach transienter Transfektion mit Expressionsvektoren	32
3.4.1. Transfektion	33
3.4.2. Rehydratisieren der Matrigel-Inserts	33
3.4.3. Erstellen der Zellsuspensionen	34
3.4.4. Übertragen der Zellen auf die Invasionskammern.....	35
3.4.5. Beenden des Invasions-Assays	35

3.5.	Immunzytochemische Doppeldetektion mit Fluoreszenz-AK.....	36
3.5.1.	Übertragen der Zellen auf gekammerte Objektträger.....	37
3.5.2.	Überschichten der Zellen mit Primär- und Sekundärantikörpern.....	37
3.6.	Reporterassay.....	40
3.6.1.	Cotransfektion mit Reporterplasmid und AP-1-Expressionsvektor.....	41
3.6.2.	TPA-Stimulation nach Cotransfektion mit Reporterplasmid und AP-1- Transfektionsvektor.....	42
3.6.3.	Ernte der Zellen mit Lysis-Puffer.....	42
3.6.4.	Luziferase-Assay.....	43
3.7.	Weitere Materialien in alphabetischer Reihenfolge.....	43
3.8.	Statistische Auswertung.....	45
4.	Ergebnisse.....	46
4.1.	Transiente Transfektion.....	46
4.1.1.	Western-Blot-Analyse.....	46
4.1.2.	Immunzytochemie.....	48
4.2.	Invasions-Assay.....	49
4.3.	Western-Blot-Analysen.....	52
4.4.	Immunzytochemische Doppeldetektion mit Fluoreszenz-AK.....	53
4.5.	Reporter-Assay mit Kotransfektion.....	55
4.6.	Einfluss von TPA.....	57
4.6.1.	Einfluss von TPA auf die Zellmorphologie.....	57
4.6.3.	Reporter-Assay mit TPA-stimulierten Zellen.....	58
5.	Diskussion.....	60
5.1.	Invasions-Assay.....	61
5.2.	Immunzytochemie mit Doppeldetektion.....	63
5.3.	Reporter-Assay mit Kotransfektion.....	65
5.4.	Einfluss des Phorbolesters TPA.....	66
6.	Zusammenfassung.....	68
7.	Literaturverzeichnis.....	70
8.	Danksagung.....	77
9.	Lebenslauf.....	78
10.	Erklärung.....	79

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Western-Blot-Analyse der Fos-Proteine in mock-transfizierten und fos-transfizierten MCF7 Zellen	47
Abbildung 2: Expression von Aktin	47
Abbildung 3: Immunzytochemischer Nachweis der Transfektion von MCF7 Zellen .	48
Abbildung 4: Mock-transfizierte MCF7-Zellen nach Überschichtung mit dem Fos-B-Antikörper (Negativkontrolle)	49
Abbildung 5: Einfluss der transienten Transfektion mit den Expressionsvektoren für c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2 auf das invasive Potential (dunkle Säulen: Matrigel-Inserts) sowie die Motilität (helle Säulen: Kontroll-Inserts) von MCF7-Zellen.....	52
Abbildung 6: Inkubation mit Antikörper für immunzytochemische Doppeldetektion..	54
Abbildung 7: Hochregulation der zytoplasmatischen PAI-1-Expression in transfizierten MCF7-Zellen mit nukleärer und zytoplasmatischer Fra-1-Überexpression	54
Abbildung 8: Hochregulation der zytoplasmatischen PAI-1-Expression in transfizierten MCF7-Zellen mit nukleärer Fra-2-Überexpression.....	55
Abbildung 9: Einfluss der Fos-Proteine auf die Aktivität des MMP-9-Promotors	56
Abbildung 10: Einfluss von TPA auf die Zellmorphologie von MCF7-Zellen (HE-Färbung).....	57
Abbildung 11: Einfluss der TPA-Stimulation auf die MMP-9-Promotoraktivität.....	59

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenngels.....	28
Tabelle 2: Zusammensetzung des Sammelgels.....	29
Tabelle 3: Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper	31
Tabelle 4: Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper	40
Tabelle 5: Matrigel-Inserts: Invasive Zellen im Invasions-Assay (n = 8 Experimente) nach transienter Transfektion mit Fos-Expressionsvektoren (mock- Transfektion=100%).	50
Tabelle 6: Kontroll-Inserts: Zellen mit gesteigerter Motilität im Invasions-Assay (n = 8 Experimente) nach transienter Transfektion mit Fos-Expressionsvektoren (mock- Transfektion=100%)	51
Tabelle 7: MMP-9 Promotoraktivität nach Transfektion mit Fos-Vektoren (Aktivität nach mock-Transfektion=100%).....	56

IV. Abkürzungsverzeichnis

AP-1	activating protein-1
AS	Aminosäure
BRCA-1 /-2	breast cancer gene 1 / 2
BSA	bovines Serumalbumin
DCC	dextran-coated charcoal
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Mod Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Fetales Kälberserum
Fra	Fos-related antigen
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
MMP	Matrix-Metalloprotease
NOS	Not otherwise specified
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
RLU	Relative light units
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TBST	TBS mit Tween
tPA	tissue Plasminogen Aktivator (Alteplase)
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acatat
TRE	TPA-responsive Elementen
uPA	Urokinase Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinase Plasminogenaktivator-Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Proteine der Fos-Familie (c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2) gehören zu einer Gruppe von Regulatorproteinen, welche als AP-1-Komplex zusammengefasst werden und bei der Reaktion von Zellen auf extrazelluläre Reize eine wichtige Rolle spielen. Experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass diese AP-1-Transkriptionsfaktoren unter anderem an der Regulation von Faktoren beteiligt sind, die für die Invasion von Tumorzellen in das umliegende gesunde Gewebe verantwortlich sind.

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses der Transkriptionsfaktoren der Fos-Familie auf die Invasivität der rezeptorpositiven Mammakarzinom-Zelllinie MCF7.

Untersuchungen an Tumormaterial von Mammakarzinom-Patientinnen haben gezeigt, dass die Menge der verschiedenen Fos-Proteine in den einzelnen Tumoren stark variiert, und dass beispielsweise hohe Fra-1- und niedrige Fos-B-Expression mit höherer Malignität der Tumoren korrelierten.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten soll nun die Bedeutung der Fos-Proteine für die Invasivität von Mammakarzinomzellen auf zellulärer Ebene untersucht werden:

1. Untersuchung der Änderung des invasiven Verhaltens der Zellen im In-vitro-Invasionsassay nach Transfektion mit Expressionsvektoren für c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2.
2. Western-Blot-Untersuchung der Expression verschiedener Invasionsgene (MMP-1, MMP-9, PAI-1, uPAR) nach Transfektion mit Expressionsvektoren für c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2.
3. Immunzytochemische Untersuchung der Expression der Fos-Proteine und der Invasionsproteine MMP-1, MMP-9, PAI-1 und uPAR mittels Doppeldetektion mit fluoreszierenden Antikörpern und Laserscanning-Mikroskopie. Hierbei Untersuchung

des Einflusses der durch Transfektion gesteigerten Fos-Proteinmenge auf die Expression der Zielgene auf zellulärer Ebene.

4. Untersuchung des Effektes der Fos-Proteine auf die Regulation des MMP-9-Promotors durch Reporter-gen-Assays. Hierbei Kotransfektion der Zellen mit Expressionsvektoren für c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1, Fra-2 und MMP-9-Promotor-Luziferase-Vektoren.

5. Untersuchungen zum Einfluss des Phorbolesters TPA auf die Morphologie der Zellen. Außerdem Untersuchung des Effektes der Fos-Proteine auf die Regulation des MMP-9-Promotors in Anwesenheit von TPA in Kotransfektionsexperimenten.

2. Einleitung

2.1. Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in der westlichen Welt noch immer der häufigste maligne Tumor der Frau. Allein in Deutschland erkranken jährlich über 47.500 Frauen an Brustkrebs, etwa 40% davon im Alter von unter 60 Jahren. In der Gruppe der 35-45-jährigen stellt Brustkrebs sogar die häufigste Todesursache dar.

In der Ätiologie des Mammakarzinoms spielen neben familiärer oder genetischer Disposition (z.B. Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA-1 und -2) auch eine Reihe anderer Faktoren eine Rolle, wie beispielsweise frühe Menarche und spätes Klimakterium, Kinderlosigkeit und Hormonersatztherapie in Meno- und Postmenopause. In verschiedensten Studien wurden auch Zusammenhänge zu Bewegungsmangel, fettreicher und ballaststoffarmer Ernährung, Rauchen und starkem Alkoholkonsum sowie Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen aufgedeckt (Schmidt-Matthiesen et al. 2002; Krebs in Deutschland 2004).

In Entwicklungsländern und in Ländern mit niedrigerem oder nicht-westlichem Lebensstandard, wie z.B. in weiten Teilen Afrikas und Südostasiens, beträgt das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, teilweise nur ein Drittel oder die Hälfte dessen der westlichen Länder. Erstaunlicherweise gehört auch Japan trotz westlicher Lebensweise zu den Nationen mit niedrigen Inzidenzraten (Tavassoli u. Devilee 2003).

Hinter dem Begriff des Mammakarzinoms verbirgt sich eine in Bezug auf Histologie, Lokalisation, Ausbreitung und Prognose äußerst heterogene Gruppe epithelialer Tumore.

Das invasive duktales Karzinom oder auch duktales NOS-Karzinom (NOS = not otherwise specified) ist mit bis zu 75% der häufigste Tumortyp und umfasst verschiedene Subtypen von uneinheitlichem makroskopischem und histologischem Aspekt. 70-80% der duktales NOS-Karzinome haben einen positiven Östrogen-

Rezeptorstatus, 15-30% weisen eine HER2/neu-Amplifikation auf. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt mit 35-50% unter der von Brustkrebs allgemein (ca. 55%).

Das invasive lobuläre Karzinom macht 5-15% der Mammakarzinome aus, wobei die Inzidenz in den letzten 20 Jahren stetig zugenommen hat. Das invasive lobuläre Karzinom zeigt meist typische Wachstumsmuster und die oft einzeln liegenden Tumorzellen sind in 70-95% Östrogen- und in 60-70% Progesteron-Rezeptor-positiv. Neben dem invasiven duktalem und dem invasiven lobulären Karzinom existiert noch ein Vielzahl anderer Unterformen wie z.B. tubuläre, cribriforme, medulläre oder mucinöse Karzinome, welche zwar prognostisch günstiger sind, zusammen genommen aber weniger als 10% aller Mammakarzinome ausmachen. (Tavassoli u. Devilee 2003; Böcker et al. 1997; Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Neben diesen invasiven Tumoren existieren auch nicht-invasive oder prä-invasive Formen des Mammakarzinoms, welche die Basalmembran noch nicht durchbrochen haben. Hierzu zählen das Duktale Carcinoma in situ (DCIS), was ca. 70% der prä-invasiven Läsionen ausmacht, sowie mit etwa 30% das Lobuläre Carcinoma in situ (LCIS). Diese in-situ Karzinome machen 15-20% aller nicht-benigen Veränderungen der Mamma aus und sind in einer Vielzahl von Fällen mit invasiven Tumoren vergesellschaftet.

Die Metastasierung des Mammakarzinoms erfolgt oft schon frühzeitig in regionäre Lymphknoten, aber auch eine frühe hämatogene Aussaat ist möglich. Die Fernmetastasierung erfolgt hauptsächlich in Knochen (77%), Lunge und Pleura (55%), Leber (35%) und ZNS. Die Einteilung erfolgt nach dem TNM-System in die Stadien 0 bis IV.

Als prognostisch günstig gilt neben kleiner Tumorgöße, hoher Differenzierung, negativem Nodalstatus und positivem Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus ein Erkrankungsalter von über 35 Jahren. Zu den ungünstigen Prognosefaktoren werden unter anderem die Überaktivität von uPA, PAI-1 und EGF-Rezeptoren sowie die starke Überexpression von HER2/neu gezählt (Tavassoli u. Devilee 2003; Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

2.2. Der AP-1-Komplex

Unter dem Begriff AP-1(activating protein-1)-Komplex werden sieben nukleäre Transkriptionsfaktoren zusammengefasst, die eine zentrale Rolle bei fundamentalen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Zellproliferation, onkogener Transformation und Apoptose spielen. Unter dem Einfluss externer Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Tumorpromotoren, Karzinogenen oder gesteigerter Expression bestimmter Onkogene (Serum, TPA, EGF) tragen sie zu einer veränderten Genexpression bei (Kustikova et al. 1998; Angel u. Karin 1991).

Die AP-1-Faktoren bilden Dimere, welche sich aus Vertretern zweier verschiedener Proteinfamilien zusammensetzen: den Jun-Proteinen (c-Jun, JunB, JunD) und den Mitgliedern der Fos-Familie (c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2).

Über sogenannte „leucine zipper“ kommt es zur Ausbildung von Homo- und Heterodimeren (Jun-Jun / Jun-Fos), welche wiederum über „basic regions“ die DNA vieler Zielgene an TPA-responsiven Elementen (TRE's) binden (TPA = 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat). Durch die Bindung an diese in den Promotor/Enhancer-Regionen von Genen gelegenen AP-1-Bindungsstellen erfolgt die Aktivierung oder Repression der Transkription (Angel u. Karin 1991; Ransone 1989; Tulchinsky 2000).

Jun-Fos-Heterodimere besitzen eine höhere Stabilität und DNA-Bindungsaktivität als Jun-Jun-Homodimere. Die Bindung der Komplexe an die TRE's wird außerdem stark durch die flankierenden Basensequenzen beeinflusst (Ryseck u. Bravo 1991). Fos-Proteine allein können keine Steigerung der Transkriptionsrate induzieren, da sie untereinander keine Dimere ausbilden, und somit keine DNA-Bindungsaktivität besitzen. Eine Regulierung der AP-1-Aktivität erfolgt sowohl durch veränderte jun- und fos-Gentranskription als auch durch posttranslationale Modifizierung wie z.B. Phosphorylierung. Außerdem kommt es durch Aktivierung des Glukokortikoid- und des Retinsäurerezeptors zur Inhibition sowohl der basalen als auch der induzierbaren AP-1-Aktivität und somit zu einer verminderten Expression AP-1-abhängiger Gene (Angel u. Karin 1991).

Es wird heute davon ausgegangen, dass die verschiedenen AP-1-Faktoren teilweise unterschiedliche Zielgene regulieren und daher spezifische biologische Funktionen ausführen (Karin et al. 1997; Tulchinsky 2000).

2.2.1. Die Fos-Proteine

Die Mitglieder der Fos-Familie lassen sich nach ihrer Fähigkeit, Mäuse- und Rattenfibroblasten zu transformieren, in zwei Gruppen unterteilen: die transformierenden (c-Fos, Fos-B) und die nicht-transformierenden (Fra-1, Fra-2, Fos-B2) Fos-Proteine.

C-Fos und Fos-B besitzen in ihren N- und C-terminalen Bereichen mehrere transaktivierende Domänen, welche für die Transformation von Zellen von Bedeutung sind.

Durch alternatives Splicen entsteht aus Fos-B (338 AS) ein verkürztes Protein, Fos-B2 (237 AS), dem das C-terminale Ende und damit die transformierende Wirkung fehlt (Tulchinsky 2000; Mumberg et al. 1991; Wisdom et al. 1992).

Die nicht-transformierenden Fos-Proteine Fra-1 und Fra-2 besitzen nicht die entsprechenden C-terminalen transaktivierenden Domänen und sind daher nicht zu einer effizienten Transkriptionsaktivierung und Transformation befähigt. In Zellexperimenten konnte sogar eine Inhibierung der c-Fos-vermittelten Aktivierung durch Fra-1 und Fra-2 festgestellt werden. Des weiteren unterliegen fra-1 und fra-2 einer über TRE's gesteuerten Autoregulation, welche sich in ihren eigenen Promotor/Enhancer-Regionen befinden (Suzuki et al. 1991; Tulchinsky 2000).

C-Fos stellt das zelluläre Homolog von v-Fos dar, einem retroviralen Onkogen, das ursprünglich in zwei Viren entdeckt wurde, die bei Mäusen Osteosarkome auslösen (FBR-MuSV und FBJ-MuSV). Es ist ein nukleäres Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa und unterliegt einer ausgedehnten posttranslationalen Modifizierung (Tulchinsky 2000; Ransone 1989). In Versuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass c-Fos eine tragende Rolle bei der Knochen- und Zahnentwicklung und einen Einfluss auf Hämatopoese, Keimzellentwicklung und das ZNS hat. Knockout-Mäuse fielen durch eine geringere Körpergröße, ausgeprägte Osteopetrose und Hämatopoiesestörungen auf (Grigoriadis et al. 1994; Wang et al. 1992).

Des weiteren ist c-Fos unabdingbar für die Aktivierung bestimmter Enhancer, wie z.B. die der Matrix-Metalloproteasen MMP-1 und MMP-3, welche am Abbau extrazellulärer Matrix beteiligt sind (Tulchinsky 2000; Hu et al. 1994). In CSML0-Zellen führte eine Transfektion mit c-fos und fra-1, nicht aber mit fra-2 zu einer

Aktivierung des Urokinase-Systems, zu morphologischen Veränderungen und gesteigerter Mobilität der Zellen. C-Fos bewirkte dabei vor allem eine Genaktivierung des uPA-Rezeptors (uPAR) (Andersen et al. 2002; Tkach et al. 2003).

In Fibroblasten mit c-Fos-Überexpression kam es zur Hochregulation von Genen, die an Prozessen wie Invasion und Metastasierung beteiligt sind (Hennigan et al. 1994). Eine Studie an Mammakarzinomen zeigte, dass c-Fos mit einer schlechteren Prognose durch invasives Wachstum und aggressive Phänotypen assoziiert war (Bland et al. 1995). In einer Western-Blot-Analyse an Mammakarzinommaterial konnte jedoch außer für Fos-B und Fra-1 für keines der AP-1-Proteine eine Korrelation mit klinischen oder pathologischen Parametern gefunden werden (Bamberger et al. 1999).

Das starke Strukturähnlichkeiten mit c-Fos aufweisende Fos-B ist ein 338 AS großes Protein (ca. 50 kDa), von dem gezeigt werden konnte, dass es in Mäuse- und Rattenfibroblasten eine Transformation induzieren kann. Am c-fos-Promotor übt es außerdem eine unterdrückende Wirkung aus (Mumberg et al. 1991). In einer immunhistochemischen Studie an Mäuseembryonen konnte Fos-B vor allem im wachsenden Knochen, in Haarfollikeln, Leber und epidermalemem Gewebe gefunden werden. Zellen ohne Fos-B zeigten keine Zellzyklusveränderungen oder kompensatorische Hochregulation anderer Fos-Gene. Auch Fos-B ^{-/-} Mäuse waren fruchtbar und zeigten keine phänotypischen oder histologischen Veränderungen (Gruda et al. 1996). Auffällig bei Mäusen mit einer inaktivierenden Mutation des fos-B-Gens war ein gestörtes Brutpflege- und Säugeverhalten durch fehlende Fos-B-Expression im Hypothalamus bei ansonsten uneingeschränkten kognitiven und sensorischen Fähigkeiten (Brown et al. 1996). In der Epidermis ist Fos-B hauptsächlich in den basalen und suprabasalen Zellschichten nachweisbar, wohingegen c-Fos eher in den höher gelegenen Zellschichten des Stratum Spinosum exprimiert wird (Angel et al. 2001; Welter et al. 1995).

In Western-Blot-Analysen an verschiedensten Tumoren der Mamma und unterschiedlichen Brustkrebszelllinien konnte für Fos-B eine signifikante positive Korrelation mit positivem Steroidhormonrezeptorstatus und hoher Zelldifferenzierung, sowie eine starke positive Korrelation mit hoher Expression des Tumorsuppressorgens Rb gefunden werden. Starke p16-Überexpression war hingegen mit schwacher Fos-B-Expression vergesellschaftet (Milde-Langosch et al. 2000; Bamberger et al. 1999).

In normalem Brustdrüsengewebe findet sich in den Gängen und Lobuli eine hohe Fos-B-Aktivität. Eine Abnahme dieser Fos-B-Proteinexpression stand im Zusammenhang mit der während der Tumorentstehung stattfindenden Entdifferenzierung und korrelierte außer mit einem hohen Grading und HER2/neu-Expression auch mit p16-Überexpression und negativem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (Milde-Langosch et al. 2003).

Das in serumstimulierten Fibroblasten gefundene 237 AS (ca. 35 kDa) große Fos-B2, welches durch alternatives Splicen aus dem Fos-B-Gen hervorgeht, konnte keine Transformation in Nagetierfibroblasten induzieren, da ihm die entscheidende C-terminale transaktivierende Domäne fehlt (Mumberg et al. 1991; Wisdom et al. 1992). Da es in Mammatumoren normalerweise nicht vorkommt, ist es in diesem Zusammenhang von untergeordnetem Interesse.

Fra-1 (fos-related antigen 1) besitzt je nach Phosphorylierungsgrad ein Molekulargewicht von ca. 36-46 kDa und gehört zu den nicht-transformierenden Fos-Proteinen, da es wie Fos-B2 keine C-terminale transaktivierende Domäne besitzt. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass gerade auch diesen nicht-transformierenden Proteinen eine große Bedeutung für den Erhalt und das Fortschreiten von neoplastischen Transformationen in Zellen zukommt (Tulchinsky 2000). Neoplastische Veränderung von Schilddrüsenzellen bei Ratten führte zu einem dramatischen Anstieg der AP-1-Aktivität, und zwar hauptsächlich durch einen Anstieg von Jun-B und Fra-1. Stabile Transfektion der Zellen mit einem fra-1 antisense-RNA-Vektor brachte einen phänotypisch deutlich weniger malignen Zelltyp hervor (Vallone et al. 1997). In einer immunhistochemischen Studie an Gewebematerial von Schilddrüsenhyper- und neoplasien wurde ein Zusammenhang zwischen Fra-1-Expression und dem Grad der Malignität festgestellt, wobei sich alle Karzinomtypen stark anfärbten, Adenome etwas weniger und nur teilweise, und normales Gewebe überhaupt keine Fra-1-Aktivität aufwies (Chiappetta et al. 2000).

In mehreren Studien an Adenokarzinomzellen der Maus konnte gezeigt werden, dass durch Transfektion mit fra-1 Mobilität und Invasivität der Zellen anstiegen und es gleichzeitig zu morphologischen Veränderungen mit eher mesenchymalen Charakteristika kam, wie z.B. elongierter Zellform und vermehrten Zellausläufern. Außerdem konnte ein Anstieg der Transkription von Genen, die mit

Tumorprogression und Invasion assoziiert sind, verzeichnet werden, wie z.B. uPAR, PAI-1, v.a. aber uPA (Kustikova et al. 1998, Andersen et al. 2002; Tkach et al. 2003). An Brustkrebsgewebe wurde durch Western-Blot-Verfahren eine positive Korrelation von fra-1 mit hoher Expression von Cyclin E (induziert Übergang G1 - S-Phase) und p16, mit negativem Östrogenrezeptorstatus und einem höheren Grading gefunden (Milde-Langosch et al. 2000; Bamberger et al. 1999).

Fra-2 (ca. 40-46 kDa) zeigt neben c-Jun und Jun-D eine hohe basale Expressionsrate in proliferierenden Fibroblasten bei nur schwacher Induzierbarkeit durch Serumbestandteile (Lallemand et al. 1997). Obwohl auch dem Fra-2-Protein die für die Transformation notwendige C-terminale Domäne fehlt, und es sogar die transaktivierende Wirkung von c-Jun unterdrücken kann, konnte eine hohe Fra-2-Aktivität in transformierten Zellen gefunden werden (Suzuki et al. 1991 u.1994). Es war jedoch in Untersuchungen an Adenokarzinomzellen weder in der Lage, die Mobilität der Zellen zu erhöhen oder deren äußeres Erscheinungsbild zu verändern, noch zu einer Aktivierung des Urokinase-Systems zu führen. In CSML0-Zellen konnten drei Gene identifiziert werden, deren Expression durch Transfektion mit fra-2 hochreguliert wurden: Thrombospondin-1, Osteopontin und CD44. (Andersen et al. 2002; Tkach et al. 2003).

In Gewebeproben aus Karzinomen der menschlichen Brust konnte eine signifikante Assoziation mit Cyclin E und Cyclin D1 gefunden werden. Es bestand jedoch kein Zusammenhang zu klinischen oder pathologischen Parametern (Milde-Langosch et al. 2000; Bamberger et al. 1999).

2.2.2. Die Jun-Proteine

Zur Gruppe der Jun-Proteine werden c-Jun, junB und junD gezählt.

Der wichtigste Vertreter der Jun-Proteine ist c-Jun, welches das zelluläre Homolog des in Avian Sarcoma Virus 17 gefundenen v-Jun darstellt. C-Jun enthält in seinem N-terminalen Bereich drei kurze Regionen, die für die äußerst potente Transkriptionsaktivierung verantwortlich gemacht werden. Da in der Promotorregion von c-jun AP-1-Bindungsstellen identifiziert werden konnten, wird angenommen, dass c-Jun einer Autoregulation unterliegt, und es durch Bindung von c-Jun-

Homodimeren zu einer vermehrten c-jun-Transkription mit konsekutiver Überexpression kommt (Angel u. Karin 1991). In Studien an MCF7-Zellen führte eine c-Jun-Überexpression zu einem veränderten Phänotyp, gesteigerter Mobilität, Invasivität und vermehrter MMP-9-Expression. Außerdem kam es zu Änderungen in der Zusammensetzung der AP-1-Proteinexpression mit deutlicher Zunahme von Fra-1 und Abnahme von junB (Rinehart-Kim et al. 2000; Smith et al. 1999).

JunB und JunD besitzen beide ein deutlich schwächeres Potential zur Zelltransformation. JunB wirkt sogar im Sinne eines negativen Regulators der c-Jun-vermittelten Transkriptionsaktivierung entgegen (Angel u. Karin 1991).

2.3. Invasivität von Tumoren

Der Abbau extrazellulärer Matrix kommt physiologischer Weise z.B. im Rahmen von Wundheilung, Angiogenese und von Knochenwachstums- und Umbauprozessen vor. Unter pathologischen Bedingungen ist er unter anderem an der Entstehung und dem Fortschreiten von Arthritiden und Tumoren beteiligt (Garbett et al. 1999; Kahari et al. 1999).

Die Degradation und der Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und der Basalmembran sind hierbei essentielle Vorgänge für das Wachstum, die Invasivität und die Metastasierungsfähigkeit von Tumoren und der damit assoziierten Gefäßneubildung (Kahari et al. 1999). Die während dieser Abbauprozesse stattfindende Proteolyse ist ein streng reguliertes Zusammenspiel aus Synthese, Sekretion und Aktivität der daran beteiligten Proteasen und des Vorhandenseins der entsprechenden Inhibitoren (Garbett et al. 1999; Testa et al. 1990).

Es gibt vier verschiedene Untergruppen von Proteasen, die nach dem Aufbau ihres aktiven Zentrums unterschieden werden: Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen (Löffler 1999). Zu den hauptsächlich an Tumorinvasion beteiligten proteolytischen Enzymen gehören die so genannten Matrixmetalloproteasen (MMP's) und die zur Gruppe der Serinproteasen gehörigen Plasminogen-Aktivatoren (Garbett et al. 1999).

2.3.1. Matrixmetalloproteasen (MMP's)

Die Matrixmetalloproteasen sind zink- oder calciumabhängige Endopeptidasen, die in vivo nicht ständig exprimiert werden, sondern vor allem durch exogene Signale wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Zell-Zell-Interaktionen induziert werden. Ihre Aktivität wird zum einen auf der Ebene der Transkription, zum anderen durch Aktivierung und Inaktivierung der vorliegenden Proteine reguliert.

Die Gene der MMP's enthalten in ihren Promotorbereichen AP-1-Bindungsstellen, an denen die durch die extrazellulären Signale aktivierten AP-1-Komplexe binden und eine Transkriptionsaktivierung auslösen können. Nach Translation der Proteine werden sie meist als inaktive Vorstufen sezerniert und erst im Extrazellulärraum durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Inaktivierung der MMP's kann zum einen unspezifisch (durch α -2-Makroglobulin, α -1-Antiprotease), zum anderen spezifisch über sogenannte TIMP's (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) geschehen (Kahari et al. 1999). Man unterscheidet mehrere Untergruppen der MMP's: Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Stromelysin-like-MMP's, Membrantyp-MMP's und andere. Die in Bezug auf Brustkrebs am häufigsten untersuchten Matrixmetalloproteasen sind MMP-1 und MMP-9.

Die Collagenasen, zu denen MMP-1 zählt, degradieren spezifisch fibrilläres Kollagen der Typen I, II, III und V und werden von den unterschiedlichsten Zellen exprimiert. Bei Kolon- und Ösophaguskarzinomen korrelierte MMP-1 mit einer schlechten Prognose (Murray et al. 1996 u. 1998). Beim invasiven Karzinom der Cervix Uteri konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von MMP-1 und MMP-2 und zunehmender Invasivität gezeigt werden. Auch in Brustkrebsgewebe ist gegenüber normalem Gewebe ein deutlicher Anstieg der MMP-1 Expression zu vermerken, und zwar in den Epithel- und Bindegewebszellen der Invasionsfront (Brummer et al. 1999 u. 2002).

Das 92 kDa große MMP-9 wird der Gruppe der Gelatinasen zugeordnet und ist neben dem vollständigen Abbau der durch Collagenasen denaturierten Kollagene auch zum Abbau von Kollagen Typ IV, dem Hauptbestandteil von Basalmembranen, befähigt (Kahari et al. 1999). MMP-9 wird hauptsächlich in epithelialen Zellen gebildet. Im Tiermodell stieg die MMP-9 Expression mit zunehmender Invasion im Rahmen der Tumorprogression an (Kupferman et al. 2000). In MCF7-

Brustkrebszellen ging erhöhte MMP-9 Aktivität mit einem aggressiveren Phänotyp und gesteigerter in-vitro-Invasivität einher (Smith et al. 1999). Klinische Untersuchungen an Brustkrebsgewebe konnten keines der MMP's als unabhängigen oder sicheren prognostischen Faktor identifizieren, es zeigte sich jedoch ein Zusammenhang zwischen hoher MMP-9 Expression und vermehrter Angiogenese (Toi et al. 1998). Array-Untersuchungen an Mammakarzinomen führten zu dem Ergebnis, dass die Hochregulation von MMP-9 in Tumoren mit einem schlechteren Verlauf assoziiert waren (Van't Veer et al. 2002)

2.3.2. Das uPA / PAI-System

Plasmin besitzt neben seiner fibrinolytischen Wirkung auch die Fähigkeit, verschiedenste Proteinbestandteile der extrazellulären Matrix zu degradieren. Es existieren zwei Plasminogen-Aktivatoren, uPA und tPA, welche das inaktive Plasminogen in das proteolytisch aktive Plasmin überführen. Diese beiden Serinproteasen werden wiederum durch die so genannten Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 reguliert.

Für uPA, welches im Gegensatz zu tPA mehr an der Spaltung der extrazellulären Matrix als an der Thrombolyse beteiligt zu sein scheint, existiert ein spezifischer Rezeptor, der uPA-Rezeptor (uPAR).

Das uPA / PAI-System, dessen Faktoren durch Onkogenaktivierung hoch reguliert werden, hat somit eine große Bedeutung für die Metastasierungsfähigkeit von Tumoren. Dabei scheint nicht allein eine hohe Aktivität der einzelnen Faktoren, sondern auch eine Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen, Endozytose-Rezeptoren und Wachstumsfaktoren ausschlaggebend zu sein.

In Untersuchungen an verschiedensten Malignomen war eine hohe Aktivität von uPA, uPAR und PAI-1 mit einer schlechteren, hohe Expressionsraten von PAI-2 hingegen mit einer besseren Prognose assoziiert. uPAR gebundenes uPA führte in Ovarialkarzinomzellen zur Induktion der c-Fos Genexpression (Andreasen et al. 1997).

In Mammakarzinomen sind starke Expression von uPA und PAI-1 mit einer höheren Rezidivgefahr und kürzeren Überlebenszeiten vergesellschaftet. Zumindest uPA kann als unabhängiger Prognosefaktor, ähnlich dem eines positiven Nodalstatus

angesehen werden (Jänicke et al. 1993). Größere Studien an Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus geben Anhalt zu der Erwägung, adjuvante Chemotherapien nur bei Frauen mit starker uPA- und PAI-1-Expression durchzuführen (Harbeck et al. 2004).

3. Material und Methoden

Alle nicht bereits im Text erwähnten Materialien und Konzentrationen sind unter 3.7. in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zelllinie MCF7

Bei diesen Zellen handelt es sich um Östrogen- und Progesteronrezeptor-positive Karzinomzellen der Mamma.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ unter Verwendung folgenden Mediums (Medium complete):

220 ml	DMEM, Gibco
220 ml	F-12 HAM, Sigma
50 ml	FCS, Gibco BRL
5 ml	L-Glutamin 200 MM, Gibco BRL
<u>5 ml</u>	Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml), Gibco BRL
500 ml	

Materialien: Zellkulturflaschen (25 cm³), Nunc

3.1.2. Splitten der Zellen

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen von drei bis vier Tagen gesplittet, wobei jeweils eine Zelldichte von 80-95% bestand.

Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsinlösung 2 min lang bei

37°C inkubiert, um die adhären wachsenden Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Die so gelösten Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und in entsprechenden Mengen auf neue Kulturflaschen mit jeweils 5 ml frischem Medium verteilt.

Materialien: PBS, Gibco

Trypsin-EDTA, Gibco

Zellkulturflaschen (25 cm³), Nunc

Sterile Pipetten (2 ml/ 5 ml / 10 ml/ 25ml), Falcon

3.1.3.Überführen in größere Zellkulturflaschen

Um genügend Zellen für die einzelnen Versuche zu gewinnen, wurde ein Teil der Zellen drei bis vier Tage vor Versuchsbeginn in 75 cm³ große Zellkulturflaschen überführt. Es wurde hierbei mit einem Kulturvolumen von 10 ml Medium gearbeitet, das zudem zwei Tage vor dem Versuch gewechselt wurde. Das Waschen und Trypsinieren der Zellen erfolgte ebenso jeweils mit den doppelten Mengen (10 ml PBS, 2 ml Trypsin).

Materialien: Zellkulturflaschen (75 cm³), Nunc

PBS, Gibco

Trypsin-EDTA, Gibco

3.1.4. Ausplattieren der Zellen

Für alle Versuche, bei denen zunächst eine Transfektion der Zellen mit einem Plasmid durchgeführt wurde, erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf Zellkulturplatten (6-Well- bzw. 12-Well-Plates).

Hierfür wurden die in den mittleren Zellkulturflaschen herangezüchteten Zellen bei 80-90% Konfluenz mit PBS gewaschen, trypsiniert und in etwa der Hälfte der sonst zur Inaktivierung des Trypsins benötigten Menge Medium aufgenommen. Die auf diese Weise stark konzentrierte Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Rosenthal-

Zählkammer ausgezählt, und anschließend daraus eine bestimmte Menge entnommen und mit frischem Medium verdünnt, so dass ein bestimmtes Volumen mit der gewünschten Zellzahl entstand.

Je Well (Vertiefung) wurden anschließend 2 ml der Suspension mit ca. 500.000 Zellen (6-Well-Plate) bzw. 1 ml mit ca. 200.000 Zellen (12-Well-Plate) einpipettiert und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Materialien: PBS, Gibco

Trypsin-EDTA, Gibco

6-Well-Plates bzw. 12-Well-Plates, costar

3.2. *Transiente Transfektion mit Expressionsvektoren*

Beim Vorgang der Transfektion wird mit Hilfe geeigneter Vektoren (Plasmide) DNA in eukaryote Zellen transferiert, um die der DNA-Information entsprechenden Proteine in den Zellen zu exprimieren.

Die hier verwendeten Vektoren enthielten jeweils die vollständigen kodierenden Regionen für c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2, welche nach Restriktionsverdau mit HindIII und BamH1 in pcDNA3.1(+)-Expressionsvektoren (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert worden waren.

Als Negativkontrolle wurden bei allen Versuchen Zellen mit dem Leerplasmid (mock) pcDNA3.1(+) transfiziert.

Durch die transiente Transfektion mit den oben genannten Plasmiden kommt es zu einer Überexpression der entsprechenden Fos-Proteine in den Zellen.

3.2.1. Transfektionsvorgang

Für die Prekomplexierung und den anschließenden Einbau der Plasmide in die Zellen wurden PLUS™ Reagent und LIPOFECTAMINE™ Reagent (Invitrogen) verwendet.

Für höheres Zellwachstum und bessere Transfektionsergebnisse wurde während der ersten 3 Stunden der Transfektion Basalmedium ohne FCS und Antibiotika eingesetzt.

(Basalmedium: DMEM und F-12 HAM im Verhältnis 1:1)

Vor der Transfektion wurden die Zellen wie in 3.1.4. beschrieben auf Zellkulturplatten ausplattiert und 24 Stunden inkubiert.

Die Plasmidansätze wurden vor dem Auftragen auf die Zellen in sterilen Eppendorfgefäßen vorbereitet.

Für ein 6-Well-Plate lagen dafür pro Vertiefung folgende Mengen zugrunde:

Plasmid-Ansatz:	100 µl	Basalmedium
	1 µl	DNA (entspricht 1 µg)
	6 µl	PLUS™ Reagent
Lipofectamine-Ansatz:	100 µl	Basalmedium
	4 µl	LIPOFECTAMINE™ Reagent

Der Plasmidansatz wurde auf dem Whirlmix gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Lipofectamine-Ansatz hinzu pipettiert, erneut auf dem Vortexer gemischt und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und jedes Well mit 2 ml PBS und 1 ml Basalmedium gewaschen. Pro Well wurden anschließend 0,8 ml Basalmedium vorgelegt und nach Ablauf der 15 min die DNA-Komplexe zu den Zellen dazugegeben.

Nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium mit je 1 ml serumhaltigem Medium pro Well auf das normale Arbeitsvolumen gebracht.

(Medium: Basalmedium mit 20% FCS)

Die Dauer der Transfektion betrug jeweils 24 Stunden.

Materialien: LIPOFECTAMINE™ Reagent, Invitrogen
PLUS™ Reagent, Invitrogen
Eppendorfgefäße
Plasmide

6-Well-Plates, costar
sterile Pipettenspitzen, Biozym

3.2.2. Gewinnung der Proteinextrakte nach Transfektion

Um die durch die Transfektion in den Zellen produzierten Proteine einer Western-Blot-Analyse zugänglich zu machen, wurden die Zellen 24 Stunden nach dem Start der Transfektion von ihrem Untergrund gelöst, lysiert und eingefroren. Dazu wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt und diese mit 2 ml PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden zur Zellyse pro Well 0,5 ml PCSB 1 (4°C) einpipettiert, und die Plates sofort auf Eis gestellt, um die Proteine vor Abbau durch Proteasen zu schützen. Mit Hilfe eines Zellscrapers wurden die Zellen vollständig vom Boden der Zellkulturplatten gelöst, und die Proteinextrakte nach kräftigem Resuspendieren in sterile Safe-Lock-Tubes überführt und bei -80°C eingefroren.

Materialien: PBS

PCSB 1: 50 mM Tris (pH 6,8), 1% SDS, 10% Saccharose

Zellscraper

Safe-Lock-Tubes

Sterile Pipettenspitzen, Biozym

3.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der nach Transfektion gewonnenen Proteinextrakte erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit von Pierce.

Hierbei wurden zunächst aus der BSA-Stammlösung Eichlösungen bestimmter Konzentrationen angesetzt. Anschließend wurden von jeder Proteinprobe und von jeder Eichlösung je zwei Eppendorfgefäße mit jeweils 50µl Inhalt auf Eis vorbereitet und mit je 1000µl Arbeitslösung (Reagent A und B im Verhältnis 50:1) aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation im Wasserbad bei 37° C erfolgte die Messung im Photometer bei 562 nm. Aus den Extinktionswerten der Eichlösungen wurde eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe die Konzentrationen der Proteinextrakte ermittelt werden konnten.

Materialien: BCA Protein Assay Kit, Pierce
Küvette
Photometer

3.3. Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse dient dem Nachweis und der Quantifizierung der gewonnenen Proteine. Dabei werden die Proteingemische zunächst einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen, um sie in ihre Einzelbestandteile aufzutrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Proteinbestandteile im elektrischen Feld ist dabei einerseits abhängig von deren Größe bzw. Molekulargewicht und andererseits von der Gelkonzentration und damit der Porengröße.

Der elektrophoretischen Auftrennung folgt das eigentliche „Blotten“, das Übertragen der Antigene auf eine haltbare Membran.

Diese Blotting-Membranen können mit den für die Antigene (Proteine) spezifischen Antikörpern überschichtet werden, und die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe anschließend mit Hilfe eines Sekundärantikörpers sichtbar gemacht werden.

3.3.1. Aufbereitung der Proteinproben

Beim Ansatz der Proben wurden jeweils 20 µg (bei Verwendung eines Geles mit 20 Taschen) bzw. 40 µg (bei 12 Taschen) des aufgetauten Proteinextraktes mit PCSB 1 auf ein bestimmtes Volumen gebracht und anschließend mit PCSB 2 im Verhältnis 1:1 gemischt. Auf dieselbe Weise erfolgte die Aufbereitung des Markers (Rainbow™ coloured protein molecular weight markers, Amersham Pharmacia Biotech).

Die Proben wurden auf dem Vortexer gemischt, fünf Minuten bei 99°C im Thermoblock inkubiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert.

Für das Einpipettieren der Proben in die Sammelgeltaschen wurden extra lange Pipettenspitzen verwendet.

Materialien: PCSB 1: 50mM Tris (pH 6,8), 1% SDS, 10% Saccharose
PCSB 2: 10% Saccharose, 50mM Tris (pH 6,8), 3%SDS,
0,01% Bromphenolblau, 10% 2-Mercaptoethanol
Mikropipettenspitzen, Biozym

3.3.2. Auftrennung der Proteinproben in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Elektrophorese dient der Auftrennung der Proteingemische und basiert auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Proteine im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei einerseits abhängig von Ladung und Masse der SDS-Protein-Komplexe, andererseits von der Größe der Gelporen, so dass kleinere Proteine rascher in Richtung der unten gelegenen Anode wandern, die größeren hingegen oben in der Nähe der Auftragungstaschen hängen bleiben.

Je nach Proteingröße variierte dabei die Zusammensetzung des Trenngels:

	8 % (80-100 kDa)	10 % (40-90 kDa)
40% AA/BAA	6 ml	7,5 ml
3 x Gelpuffer	10 ml	10 ml
87% Glycerin	4 g	4 g
Aqua dest.	10 ml	8,5 ml

Tabelle 1: Zusammensetzung des Trenngels

Um die Polymerisation des Trenngels herbeizuführen, wurden den oben genannten Bestandteilen (Endvolumen 30 ml) 150 µl Ammoniumpersulfat (APS 10%) und 15 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) hinzugefügt.

Die Zusammensetzung des Sammelgels (Endvolumen: 12,5 ml) war unabhängig von der Größe der Proteine. Mit Hilfe eines Kammes wurden hier die 12 bzw. 20

Geltaschen gegossen, in die später die Proben pipettiert wurden. Auch hier wurden zur Polymerisation 150 µl APS und 15 µl TEMED zugefügt.

40% AA/BAA	1,5 ml
3 x Gelpuffer	3,1 ml
Aqua dest.	7,9 ml

Tabelle 2: Zusammensetzung des Sammelgels

Der Polymerisationsvorgang von Trenn- und Sammelgel dauerte jeweils 30 min.

Die Elektrophoresekammern wurden mit den entsprechenden Puffern gefüllt, und nach Einpipettieren der Proben in die Sammelgeltaschen für 16-20 Stunden eine Spannung von 50-70 V bei Raumtemperatur angelegt. Zeit und Spannung waren hierbei für die unterschiedlichen nachzuweisenden Proteine individuell verschieden.

Materialien: Acrylamide/ bis-Acrylamide, 40% Stammlösung, Verhältnis 37:1

Gelpuffer: 3M Tris (pH 8,45), 0,3% SDS

Glycerin etwa 87%

Aqua dest.

Tetramethylethyldiamine (TEMED)

10% Ammoniumpersulfat

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris (pH 8,45), 0,1M Tricine, 0,1% SDS

Anodenpuffer: 0,2 M Tris (pH 8,9), 0,005% Thimerosal

3.3.3. Blotten

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch das eigentliche „Blotten“ auf eine haltbare Membran übertragen.

Zu diesem Zweck wurde die Membran zunächst auf Größe des zuvor zurechtgeschnittenen Gels gebracht und anschließend zur Hydrophilisierung in Methanol, dann in Aqua dest. und Transferpuffer geschwenkt.

Ebenso wurden je zwei mal drei Lagen Gel-Blotting-Papier zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt.

Die Membran wurde anschließend auf das Gel aufgelegt und Gel und Membran zwischen je drei Lagen puffernassem Blottingpapier so in die mit Transferpuffer gefüllte Blottingkammer eingespannt, dass das Gel zur Kathode (-) und die Membran zur Anode (+) zeigte.

Das Blotten dauerte 4-5 h bei einer Stromstärke von 400 mA und Raumtemperatur.

Materialien: Transferpuffer: 0,1 M Tris, 0,193 Glycin, 0,005% Thimerosal
Immobilon-P Membran (Millipore)
Methanol
Gel-Blotting-Papier

Nach dem Blotten wurde die Membran erneut in Methanol geschwenkt und ca. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Im Anschluss wurde die Membran entweder zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren oder zur Vorbereitung für die Detektion über Nacht bei 4°C mit Blockierungspuffer überschichtet, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Materialien: Blockierungspuffer: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl,
1% Blockingreagenz, pH=7,5 (Boehringer)

3.3.4. Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper und Sekundärantikörper wurden entsprechend der unten angegebenen Verdünnungen mit einem Gemisch von TBST und Blockierungspuffer im Verhältnis 9:1 (Gesamtvolumen 20 ml) versetzt.

Die Membranen wurden zunächst 60 min mit dem für das nachzuweisende Protein spezifischen Primärantikörper bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und im Anschluss daran 3x10 min mit TBST gewaschen.

Es folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher spezifisch für den zuvor verwendeten Primärantikörper war. Auch hier betrug die Inkubationszeit 60 min. Anschließend wurde 4x10 min mit TBST gewaschen.

Materialien: Blockierungspuffer: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl,

1% Blockingreagenz

TBST: 0,02 M Tris, 0,137 M NaCl, 0,05% Tween 20 (pH=7,6)

Primärantikörper

Sekundärantikörper

	Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
c-fos	c-Fos(4), Santa Cruz, cat.# sc-52, (rabbit)	1 : 1000	anti-rabbit-IgG-HRP, Santa Cruz, cat.# sc-2004	1 : 5000
fos-B	Fos-B(102), Santa Cruz, cat.# sc-048, (rabbit)	1 : 200	anti-rabbit-IgG-HRP, Santa Cruz, cat.# sc-2004	1 : 5000
fra-1	Fra-1(R-20), Santa Cruz, cat.# sc-605, (rabbit)	1 : 400	anti-rabbit-IgG-HRP, Santa Cruz, cat.# sc-2004	1 : 5000
fra-2	Fra-2(Q-20), Santa Cruz, cat.# sc-604 (rabbit)	1 : 800	anti-rabbit-IgG-HRP, Santa Cruz, cat.# sc-2004	1 : 5000
MMP-1	MMP-1(Ab-1), Calbiochem, cat.# IM67, (mouse)	1 : 1000	goat anti-mouse-IgG-HRP, Santa Cruz, cat.# sc-2005	1 : 2000
MMP-9	MMP-9(Ab-3), Calbiochem, cat.# IM37L, (mouse)	1 : 1000	goat anti-mouse-IgG-HRP, Santa Cruz, cat.# sc-2005	1 : 2000
PAI-1	PAI-1(Ab-1), Oncogene, cat.# IM29L, (mouse)	1 : 100	goat anti-mouse-IgG-HRP, Santa Cruz, cat.# sc-2005	1 : 2000
uPAR	uPAR(N-19), Santa Cruz, cat.# sc-9793, (goat)	1 : 250	donkey anti-goat-IgG-HRP, Santa Cruz, cat.# sc-2020	1 : 2000

Tabelle 3: Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper

3.3.5. Detektion

Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer Luminol-Detektionslösung (Super-Signal-Kit, Pierce). Das in der Lösung enthaltene Luminol wird hierbei durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Das durch die Oxidation

entstandene Reaktionsprodukt befindet sich in einem angeregten, jedoch energetisch ungünstigeren Zustand und strebt deshalb in den Ausgangszustand zurück. Beim Rückfall in diese günstigere Ausgangskonstellation wird Energie in Form von Lichtquanten freigesetzt, wodurch es zu einer je nach Proteinmenge mehr oder weniger starken Schwärzung des bei der Detektion verwendeten Röntgenfilmes kommt.

Für die Detektion wurden zunächst 20 ml Chemilumineszenz-Lösung pro Membran angesetzt (Super-Signal-Kit, Pierce, im Verhältnis 1:1 gemischt) und diese damit 5 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend in einer Klarsichthülle in eine Röntgenkassette gelegt und zur Belichtung mit in die Dunkelkammer genommen. Die Belichtungszeiten des in die Kassette eingelegten Röntgenfilmes variierten je nach dem nachzuweisenden Protein zwischen 5 Sekunden und 20 Minuten.

Materialien: Wset Pico Supersignal-Kit, Pierce
Klarsichthülle
Röntgenfilm „Hyperfilm ECL“, Amersham
Röntgenkassette

3.4. Invasions-Assays nach transienter Transfektion mit Expressionsvektoren

Mit Hilfe des Invasions-Assays lassen sich Rückschlüsse auf das invasive Wachstum von Zellen, insbesondere von Tumorzellen ziehen.

Dabei wurden die Zellen in so genannte „Matrigel-Inserts“ (BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber) überführt, welche aus einer porenreichen Membran (PET-membrane, pore size: 8.0 micron) und einer darüberliegenden nachempfundenen Basalmembran (Matrigel Matrix) bestehen. Da die Poren der PET-Membran auf diese Weise von der Matrigel Matrix verschlossen sind, können nur invasiv wachsende Zellen, welche auch die künstliche Basalmembran durchdringen können,

durch die Poren der PET-Membran gelangen, und lassen sich so von nicht-invasiven bzw. weniger invasiven Zellen unterscheiden.

Parallel dazu wurden hierbei gleiche Mengen an Zellen in so genannte „Control-Inserts“ überführt, welche keine Matrigel-Matrix enthalten, die Poren also nicht verdeckt sind. Auf diese Weise lässt sich zum einen der Einfluss oder die chemotaktische Wirkung der Basalmembran bzw. der extrazellulären Matrix auf das Invasionsverhalten der Zellen beurteilen. Zum anderen können hiermit Aussagen zur unterschiedlichen Motilität der Zellen getroffen werden.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde das unterschiedliche invasive Wachstum der MCF7-Zelllinie nach transienter Transfektion mit Expressionsvektoren für die Fos-Proteine (c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2) und dem Kontrollplasmid (mock) untersucht.

3.4.1. Transfektion

Die Zellen wurden 48 h vor Beginn des Invasions-Assays wie in 3.1.4. beschrieben auf 6-Well-Plates ausplattiert und 24 h später wie in 3.2.1. bereits erläutert mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Pro Plasmid (pc-fos, pfos-B, pfos-B2, pfra-1, pfra-2, p3.1(+)) wurde dabei mit jeweils zwei Wells gearbeitet.

Als Nachweis dafür, dass die zur Transfektion verwendeten Plasmide tatsächlich von den Zellen aufgenommen und die entsprechenden Proteine exprimiert wurden, wurde aus den selben Plasmidansätzen ein zusätzliches Well pro Plasmid transfiziert. Hieraus konnten 24 h später wie in 3.2.1. beschrieben Proteinextrakte gewonnen werden, welche nach Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 3.2.2.) einer Western-Blot-Analyse unterzogen wurden.

3.4.2. Rehydratisieren der Matrigel-Inserts

Zunächst mussten die Invasions-Kammern (BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber) für den Versuch vorbereitet werden.

Hierfür wurden sie ca. 30 min vor Versuchsbeginn von Lagerungstemperatur (-20°C) auf Raumtemperatur gebracht.

Für die Rehydratation der Matrigel-Membran wurden je 500 µl Basalmedium (37°C) in die Vertiefungen unter den Inserts und nach dem Einsetzen mit Hilfe einer sterilen Pinzette auch 500 µl in die Inserts selbst gefüllt.

Die Matrigel-Inserts wurden so für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ rehydratisiert.

Materialien: BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber, BD Biosciences
Basalmedium (DMEM und F-12 HAM im Verhältnis 1:1)
Sterile Pinzette

3.4.3. Erstellen der Zellsuspensionen

In der Zwischenzeit erfolgte das Zählen der Zellen und das Ansetzen von Zellsuspensionen mit der gewünschten Zellkonzentration.

Hierfür wurde das Medium von den transfizierten Zellen entfernt und jedes Well zunächst mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 400µl Trypsin-EDTA 2 min bei 37°C inkubiert. Die auf diese Weise gelösten Zellen wurden in jeweils 2,5 ml Medium complete pro Well aufgenommen und in sterile Falcon-Röhrchen überführt. Hierbei wurden jeweils beide mit dem selben Plasmid transfizierten Wells in ein Falcon gefüllt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Rosenthal-Zählkammer gezählt und die Ansätze mit den gewünschten Zellkonzentrationen (100000 Zellen pro well) erstellt.

Materialien: PBS
Trypsin
Medium complete
50 ml Falcon-Röhrchen
Rosenthal-Zählkammer

3.4.4. Übertragen der Zellen auf die Invasionskammern

Das Übertragen der Zellen auf die Matrigel- bzw. Kontroll-Inserts fand 24 h nach Transfektion statt.

Die Kontroll-Inserts wurden ca. 15 min vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht (Lagerung im Kühlschrank bei 4°C).

Nach 2 h Rehydratation erfolgte das vorsichtige Absaugen des Mediums aus den Matrigel-Inserts und den darunter liegenden Vertiefungen. Die Inserte wurden dazu mit einer sterilen Pinzette umgesetzt.

In jede Vertiefung der 24-Well-Platte wurden anschließend 750 µl Medium complete vorgelegt und die Matrigel- und Kontroll-Inserts vorsichtig eingesetzt. Eventuell unter den Inserten vorhandene Luftblasen wurden durch leichtes Bewegen der Inserte mit der Pinzette entfernt.

Die vorbereiteten Zellsuspensionen wurden auf dem Whirlmix gemischt und sofort 500 µl in die entsprechenden Inserte pipettiert. Pro Plasmid wurden je zwei Matrigel- und zwei Kontroll-Inserte befüllt.

Anschließend erfolgte die Inkubation für 24–48 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Materialien: BIOCOAT® Control Cell Culture Inserts
Medium complete
Sterile Pinzette

3.4.5. Beenden des Invasions-Assays

Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit (48 h) mussten zunächst alle nicht-invasiven Zellen von der Oberseite der Membran entfernt werden, ohne dabei die an der Unterseite der Membran haftenden invasiven Zellen abzuwischen. Hierfür wurde ein Wattestäbchen ins Innere des Inserts eingeführt und mit leichtem Druck über die Membran gewischt. Die Prozedur wurde ein zweites Mal mit einem zuvor in Medium complete getränkten Wattestäbchen wiederholt. Bis zum Färbvorgang wurden die Inserte in eine 24-Well-Platte mit je 500 µl Medium complete pro Well gestellt, um das Austrocknen der Zellen an der Membranunterseite zu vermeiden.

Das Anfärben der Zellen erfolgte mit Hilfe des Diff-Quick staining kits. Es wurden zuerst alle Matrigel-Inserts, dann alle Kontrollen gefärbt.

Die Inserts wurden in 24-well-Plates nacheinander in jeweils 500 µl Fixierer, roten Farbstoff und blauen Farbstoff getaucht (je 2:30 min). Anschließend erfolgte das Spülen in zweimal 2,5 ml Aqua dest. für jeweils 2:30 min (12-Well-Plates).

Nach dem Färbevorgang wurden die Inserts 20-30 min bei Raumtemperatur getrocknet und für jede Membran ein Objektträger beschriftet.

Nach dem Trocknen konnten die Membranen mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette von den Inserts entfernt werden und unter Verwendung von Eukitt und Deckgläschen mit der Unterseite nach unten auf den Objektträgern eingedeckelt werden.

Das Auszählen der invasiven Zellen erfolgte unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Zählaufsatzes. Nach einem zuvor festgelegten System wurden hiermit immer sieben Quadrate aus unterschiedlichen Bereichen der Membran ausgezählt. Hierdurch konnte auch die unterschiedliche Verteilung der Zellen auf der Membran berücksichtigt werden.

Materialien: Wattestäbchen
Medium complete
12-/24-well-plates
Diff-Quick staining kit, Dade Behring
Aqua dest.
Skalpell
Objektträger
Deckgläschen
Eukitt

3.5. Immunzytochemische Doppeldetektion mit Fluoreszenz-AK

Die Immunzytochemie dient dem qualitativen bzw. semiquantitativen Nachweis von intrazellulär gebildeten Proteinen, welche sowohl intrazytoplasmatisch als auch

intranukleär vorliegen können. Zu diesem Zweck werden die zuvor auf Objektträgern fixierten Zellen mit den entsprechenden Antikörpern überschichtet und die Antikörper-Protein-Bindungen anschließend durch farbige oder fluoreszierende Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

3.5.1. Übertragen der Zellen auf gekammerte Objektträger

Die Zellen wurden in diesem Fall zunächst auf 6-Well-Plates ausplattiert und transfiziert (s. 3.2.1.).

24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in jedem Well mit 2 ml PBS gewaschen, mit je 400µl Trypsin (2 min bei 37°C) vom Untergrund gelöst und nach Aufnahme in je 2,5 ml Medium complete in sterile Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit Hilfe der Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt und Suspensionen mit der gewünschten Zellkonzentration erstellt. Die Zellen wurden anschließend auf die zweikammerigen Objektträger überführt, so dass auf jedem Objektträger jeweils eine Kammer mit transfizierten Zellen (c-fos, fos-B, fra-1, fra-2) und eine Kammer mit mock-transfizierten Zellen als Negativkontrolle vorhanden war (je 200.000 Zellen pro Kammer).

Nach weiteren 24 h Wachstum bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 10 min in Methanol/Aceton (2:1) und für weitere 10 min in Ethanol absolut fixiert und luftgetrocknet. Nach dem Entfernen der Kammeraufsätze wurden die Objektträger bei -80°C eingefroren.

Materialien: Culture Slides, Becton Dickinson
Methanol
Aceton
Ethanol absolut

3.5.2. Überschichten der Zellen mit Primär- und Sekundärantikörpern

Nach dem Auftauen (ca. 1 min) wurden die Objektträger zunächst in PBS gestellt, dann für die Überschichtung in eine feuchte, lichtdichte Kammer gelegt.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte jeweils vor und nach Überschichtung mit den Primärantikörpern eine Inkubation mit Normalseren (im Verhältnis 1:50 mit PBS verdünnt), die der Spezies des Sekundärantikörpers entsprachen.

Die einzelnen Objektträger wurden wie folgt mit Seren und Antikörpern (Verdünnungen s. Tabelle 4) bei Raumtemperatur inkubiert:

- 100 µl Normalserum goat, 20 min
- 100 µl **Primärantikörper: c-fos, fos-B, fra-1, fra-2 (Kaninchen)**, 60 min
- 3 x 5 min in PBS waschen
- 100 µl Normalserum goat, 20 min
- 100 µl **Sekundärantikörper: Cy3-gekoppelt (Ziege-Anti-Kaninchen)**, 30 min
- 3 x 5 min in PBS waschen
- 100 µl Normalserum donkey, 20 min
- 100 µl **Primärantikörper : MMP-1, MMP-9, PAI-1, uPAR (Maus bzw. Ziege)**, 60 min
- 3 x 5 min in PBS waschen
- 100 µl Normalserum donkey, 20 min
- 100 µl **Sekundärantikörper: FITC-gekoppelt (Esel-Anti-Maus bzw. Anti-Ziege)**, 30 min
- 3 x 3 min in PBS waschen
- Eindeckeln der Objektträger mit je 100 µl Vectashield Mounting Medium
- Lagerung bei 4°C unter Abschirmung von Licht bis zur Auswertung unter dem Mikroskop

Um unspezifische Bindungen durch Überschichtung mit dem Normalserum Ziege zu vermeiden, wurde im Fall von uPAR (Ziege) die Reihenfolge verändert. Hier erfolgte zunächst die Inkubation mit Normalserum donkey, uPAR und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper. Im Anschluß daran wurden die Zellen mit Normalserum goat, den Antikörpern für die Fos-Proteine und CY3-gekoppeltem Sekundärantikörper überschichtet.

Die Auswertung der immunzytochemischen Doppeldetektion mit fluoreszierenden Antikörpern erfolgte unter dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl-Zeiss, Jena, Germany) bei Wellenlängen von 488 nm (Argon-Laser) und 543 nm (Helium/Neon-Laser).

Um unspezifisches Leuchten unter dem Mikroskop auszuschließen, wurden als Negativkontrollen Objektträger mitgeführt, welche nicht mit Primärantikörpern bzw. nicht mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert waren. Die Mikroskopeinstellungen wurden so gewählt, dass die Negativkontrollen keine rote oder grüne Autofluoreszenz zeigten. Des weiteren wurde jeweils der Vergleich mit den mock-transfizierten Zellen herangezogen.

Materialien: Antikörper (s. Tabelle 4)

Normalserum goat / donkey, Jackson Immunoresearch

VECTASHIELD® Mounting Medium, Vector Laboratories

BSA 2%, Sigma

PBS

Lichtdichte Objektträgerkammer

	Primärantikörper	Verdünnung mit BSA 2%	Sekundärantikörper (fluoreszierend, gelöst in Aqua dest. und Glycerol)	Verdünnung mit BSA 2%
c-fos	c-Fos, Santa Cruz, Lot. H 250, (rabbit)	1 : 50	Cy3-gekoppelt, (goat-anti-rabbit), Jackson Immuno Research, (rot fluoreszierend)	1 : 200
fos-B	Fos-B, Santa Cruz, Lot. L 108, (rabbit)	1 : 50	Cy3-gekoppelt, (goat-anti-rabbit), Jackson Immuno Research, (rot fluoreszierend)	1 : 200
fra-1	Fra-1, Santa Cruz, Lot. H 220, (rabbit)	1 : 100	Cy3-gekoppelt, (goat-anti-rabbit), Jackson Immuno Research, (rot fluoreszierend)	1 : 200

fra-2	Fra-2, Santa Cruz, Lot. E 100, (rabbit)	1 : 50	Cy3-gekoppelt, (goat-anti-rabbit), Jackson Immuno Research, (rot fluoreszierend)	1 : 200
MMP-1	MMP-1(Ab-6), Calbiochem, Lot. D15462-1, (mouse)	1 : 50	FITC-gekoppelt, (donkey-anti-mouse), Jackson ImmunoResearch, (grün fluoreszierend)	1 : 200
MMP-9	MMP-9(Ab-3), Calbiochem, Lot. D15988-1, (mouse)	1 : 50	FITC-gekoppelt, (donkey-anti-mouse), Jackson ImmunoResearch, (grün fluoreszierend)	1 : 200
PAI-1	PAI-1(Ab-1), Oncogene, Lot. D14134-4, (mouse)	1 : 50	FITC-gekoppelt, (donkey-anti-mouse), Jackson ImmunoResearch, (grün fluoreszierend)	1 : 200
uPAR	uPAR(N-19), Santa Cruz, cat.# sc-9793, (goat)	1 : 100	FITC-gekoppelt, (donkey-anti-goat), Jackson ImmunoResearch, (grün fluoreszierend)	1 : 200

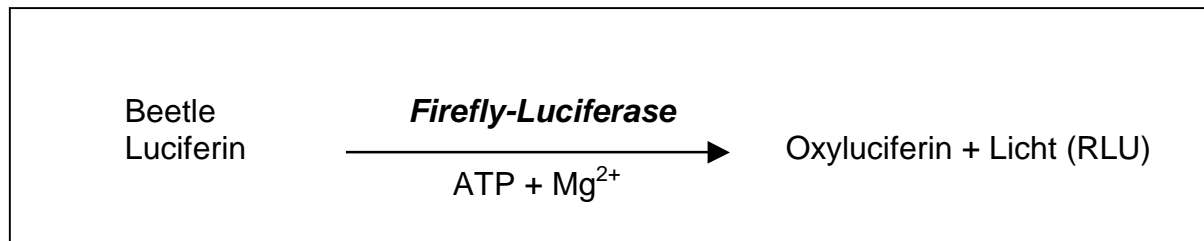
Tabelle 4: Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper

3.6. Reporterassay

Mit Hilfe des Luziferase-Reporterassays lässt sich der Effekt der verschiedenen Fos-Proteine auf die Regulation des MMP-9-Promotors untersuchen. Die Zellen werden hierbei mit Vektoren für Fos-Proteine und sogenannten Reporterplasmiden kotransfiziert. Die Reporterplasmide sind Konstrukte, welche die Promotorregion des menschlichen MMP-9-Gens enthalten, wobei als Genprodukt jedoch Luziferase anstelle von MMP-9 gebildet wird.

Die in den Zelllysaten vorhandene Firefly-Luziferase katalysiert in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} die Oxidation des im Assay-Reagent enthaltenen Beetle-Luciferin zu Oxyluciferin. Die bei dieser Reaktion in Form von Photonen frei werdende Energie kann photometrisch bestimmt werden. Die gemessene Lichtintensität entspricht hierbei der Menge der im Zelllysate enthaltenen Luciferase.

Es lassen sich somit indirekt Rückschlüsse darauf ziehen, ob durch die durch Transfektion vermehrt vorliegenden Fos-Proteine auch die Expression des Invasionsproteins MMP-9 beeinflusst wird.



3.6.1. Cotransfektion mit Reporterplasmid und AP-1-Expressionsvektor

Für den Reporterassay wurden die Zellen wie in 3.1.4. beschrieben auf 12-Well-Plates übertragen und nach 24 h Wachstum transfiziert. Es wurde mit je 3 Ansätzen pro Fos-Protein und folgenden Mengen pro Well gearbeitet :

Plasmid-Ansatz:	50 µl	Basalmedium
	1 µg	MMP-9c Reporterplasmid
	0,7 µg	AP-1-Expressionsvektor
	8 µl	PLUS™ Reagent
 Lipofectamine-Ansatz:	 50 µl	 Basalmedium
	2 µl	LIPOFECTAMINE™ Reagent

Wie bereits in 3.2.1. beschrieben, wurde auch hier der Plasmidansatz gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des Lipofectamin-Ansatzes erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min.

Vor dem Hinzufügen der DNA-Komplexe erfolgte das Waschen der Zellen mit 1 ml PBS und 1 ml Basalmedium pro Well. Es wurden jeweils 0,4 ml Transfektionsmedium vorgelegt.

Nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden 0,5 ml Basalmedium mit 20% FCS pro Well nachgefüllt.

Materialien: LIPOFECTAMINE™ Reagent
PLUS™ Reagent
Plasmide
Eppendorfgefäße
Sterile Pipettenspitzen, Biozym
12-Well-Plates

3.6.2. TPA-Stimulation nach Cotransfektion mit Reporterplasmid und AP-1-Transfektionsvektor

Alternativ zur alleinigen Cotransfektion wurde hiermit die Modulation der Expressionsrate nach Stimulation der Zellen mit TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) untersucht.

Hierzu wurden zwei wie zuvor beschriebene Ansätze erstellt, so dass pro AP-1-Transfektionsvektor insgesamt 6 Wells transfiziert wurden.

Bei beiden Ansätzen wurde 12 h nach Transfektion das Transfektionsmedium von den Zellen entfernt und durch 1 ml DCC-Medium ersetzt. Bei diesem Medium wurde das FCS mit DCC vorbehandelt, um Hormone herauszufiltern. Einer der beiden Ansätze (3 Wells) enthielt jeweils zusätzlich TPA im Medium.

Materialien: DCC-Medium (DMEM + F-12 HAM im Verhältnis 1:1, 10% DCC-FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin)
DCC-Medium +TPA (10^{-7} M)

3.6.3. Ernte der Zellen mit Lysis-Puffer

24 Stunden nach dem Start der Transfektion wurden die adhärennten Zellen nach dem Waschen mit PBS mit 100 µl Trypsin pro Vertiefung vom Untergrund gelöst (2 min bei 37°C), jedes Well mit 1 ml Medium complete aufgenommen und in jeweils ein separates Eppendorfgefäß überführt (3 Eppendorfgefäße pro Plasmid). Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert, nach Absaugen des

Überstandes mit je 1 ml PBS gewaschen, erneut 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert und das PBS wieder von den Zellen entfernt. Nach erneutem 2-minütigem Zentrifugieren bei 5000 U/min erfolgte das vorsichtige Absaugen des Restüberstandes mit Hilfe einer Mikropipettenspitze. Die auf diese Weise in den Eppendorfgefäßen verbleibenden Pellets wurden mit je 50 µl 1 x Lysispuffer aufgenommen und nach kräftigem Mischen auf dem Vortexer für mindestens 15 min bei -80°C eingefroren.

Materialien: Trypsin

PBS

Medium complete

5 x Cell Lysis Buffer (1:5 mit Aqua dest. verdünnt)

Eppendorfgefäße

Mikropipettenspitzen, Biozym

Absaugpumpe

Zentrifuge

3.6.4. Luziferase-Assay

Die Zellysate wurden für die Messung unter Abschirmung von Licht zunächst auf Raumtemperatur gebracht, anschließend 3 Sekunden auf dem Whirlmix gemischt und für 3 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden jeweils 20 µl mit 100 µl Assay-Reagent vermischt. Die Messung erfolgte in Form von Triplets (3 Ansätze pro AP-1-Tranfektionsvektor) für jeweils 3 Sekunden im Luminometer.

Materialien: Luciferase Assay System, Promega

3.7. Weitere Materialien in alphabetischer Reihenfolge

- BCA Protein Assay Kit, Prod.Nr. 23225, Pierce, Rockford, IL 61105, USA + Albumin Standard
- Biofuge 13, Heraus Sepatech GmbH

- BSA (Bovines Serumalbumin), Sigma, USA
- Certomat® TC 3, B. Braun, Biotech International, Germany
- Diff-Quick® staining kit, Dade Behring, Düdingen Schweiz
- Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM), with 0,11 G/L NA P/R, with Pyridoxine, 500 ml, Cat. No. 41966-029, GIBCO, Invitrogen Corporation
- Electrophoresis Power Supply, EPS 600, Pharmacia Biotech
- Electrophoresis Power Supply, EPS 601, amersham pharmacia biotech
- FCS, Gibco BRL, Paisley, UK
- Foam Sponges (1/8 Thick), Spacer, Clamp Assy Universal (16 cm), Blank Gaskets, Glass plates for Electrophoresis, Hoefer, San Francisco, CA, USA
- Gel-Blotting-Papier, GB 002, Ref.No. 10426693, Schleicher&Schnell, D-37582 Dassel
- Immobilon-P Transfer Membrane, Cat.No. IPVH00010, Pore Size: 0,45 µm, Milipore Corporation, Bedford, MA 01730, USA
- Kämme für Elektrophorese, Hoefer, 12 well / 20 well, 1,5 mm, Amersham Pharmacia Biotech, AB, San Francisco, CA, USA
- Küvetten, ½ Mikro, Einmalküvetten, MÜLLER ratiolab®, Dreieich
- L-Glutamine 200 MM, (100 x), Cat.No. 25030-024, GIBCO BRL, Paisley, Scotland
- LIPOFECTAMINE™ Reagent, Invitrogen, San Diego, CA, USA
- Nutrient Mixture F-12 HAM, with NaHCO₃, without L-Glutamine, 500 ml, N4888, SIGMA
- PBS DULBECCO'S, W/O calcium and magnesium, W/O sodium bicarbonato, 500 ml, Cat.No. 14190-094, GIBCO, Invitrogen Corporation
- Penicillin-Streptomycin (04547), 100 ml, 10.000 units/ml penicillin G sodium, 10.000 µg/ml streptomycin sulfate in 0,85 % saline, Cat.No. 15140-122, GIBCO BRL
- PLUS™ Reagent, Invitrogen, San Diego, CA, USA
- Rainbow™ coloured protein molecular weight markers, amersham pharmacia biotech
- Röntgenfilm "Hyperfilm ECL", Amersham, Buckinghamshire, UK
- Röntgenfilmkassette (18 x 24), BioTech Trade & Service GmbH, bts, St.Leon-Rot, Deutschland

- TRIO-Thermoblock, Prod.-Nr. 9011062, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
- Trypsin-EDTA (1 x), 4NA, 100 ml, Cat.No. 25300-054, GIBCO, Invitrogen Corporation
- UV / Visible Spectrophotometer, Ultrospec III, Pharmacia LKB
- Wasserbad, GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
- Whirlmix, Omnilab Reax 2000, Heidolph
- Zellkulturflaschen Nunclon Surface (25 cm³, 75 cm³), Nunc, Roskilde, Denmark
- Zellkulturplatten (6- /12-well-plates), Costar Incorp., Corning, NY, USA

3.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Einflusses der transienten Transfektion mit den Fos-Transkriptionsvektoren auf die Invasivität der MCF7-Brustkrebszellen im Invasions-Assay erfolgte mit Hilfe des T-Tests (SSPS 10.0). Die Anzahl der nach Transfektion mit den Fos-Vektoren invasiv wachsenden Zellen (aus vier Experimenten mit je zwei Ansätzen) wurde hierbei mit derjenigen nach mock-Transfektion verglichen (mock = 100%). Hierbei wurden alle p-Werte mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Transiente Transfektion

Da die transiente Transfektion der MCF7-Zellen mit den Expressionsvektoren für c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2 die Grundlage der nachfolgend beschriebenen Experimente darstellt, wurde zunächst die Methode der Transfektion und deren Erfolg mittels Western-Blot-Analysen und Immunzytochemie kontrolliert.

Die hier verwendeten Vektoren enthielten jeweils die vollständigen kodierenden Regionen für die Fos-Proteine c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2, welche nach Restriktionsverdau mit HindIII und BamHI in pcDNA3.1(+)-Expressionsvektoren (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert worden waren.

Als Negativkontrolle wurden bei allen Versuchen Zellen mit dem Leerplasmid (mock) pcDNA3.1(+) transfiziert.

4.1.1. Western-Blot-Analyse

Für die Western-Blot-Analysen wurden die Zellen 24h nach Transfektion lysiert und die Proteingemische einer SDS-Gel-Elektrophorese unterzogen. Nach Überschichtung mit den entsprechenden Antikörpern, Blotting und Detektion ließ sich für alle Fos-Proteine eine geänderte Expressionsrate erkennen.

Im Gegensatz zu den Negativkontrollen zeigten die mit Fos-Vektoren transfizierten MCF7-Zellen eine starke Überexpression der entsprechenden Proteine (s Abbildung 1).

Nach Transfektion mit dem fos-B-Plasmid ließen sich unterschiedliche Banden detektieren. Zum einen die dem ca. 50 kDa großen Fos-B-Protein entsprechende Bande, zum anderen zwei weitere Banden, die kleineren Splice-Varianten von Fos-B (z.B. Fos-B2) zugeordnet werden können.

Nach Transfektion mit dem fos-B2-Plasmid konnte nur noch die dem kleineren Genprodukt (Fos-B2) entsprechende Bande detektiert werden.

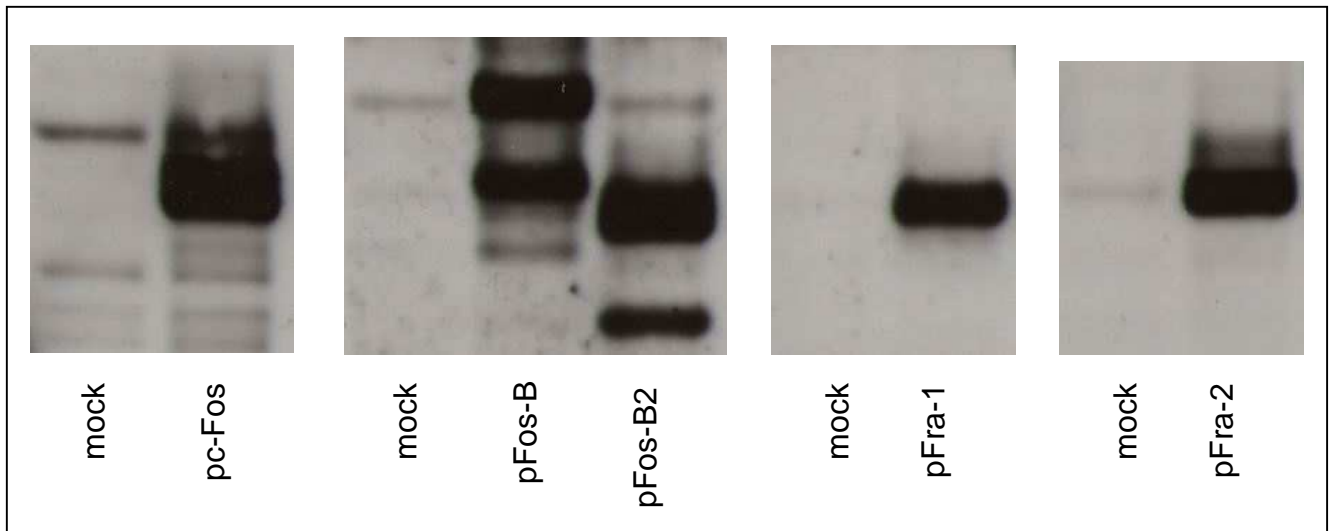


Abbildung 1: Western-Blot-Analyse der Fos-Proteine in mock-transfizierten und fos-transfizierten MCF7 Zellen

Als Kontrollparameter dafür, dass bei den Western-Blot-Analysen mit gleichen Proteinmengen gearbeitet wurde, diente die Bestimmung der Aktin-Expression. Aktin ist ein in allen eukaryoten Zellen enthaltenes Protein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa.

Die Expression von Aktin war bei allen verwendeten Plasmidansätzen vergleichbar stark, so dass von einer genauen Proteinbestimmung und Probenherstellung ausgegangen werden kann.

Eine Ausnahme bildete hierbei Fra-2, wo eine deutlich höhere Aktin-Expression erkennbar war. Da dieser Fehler jedoch reproduzierbar war und auch bei Western-Blot-Analysen mit anderen Zelllinien vorkam, muss in diesem Fall von einer andersgearteten Interaktion ausgegangen werden.

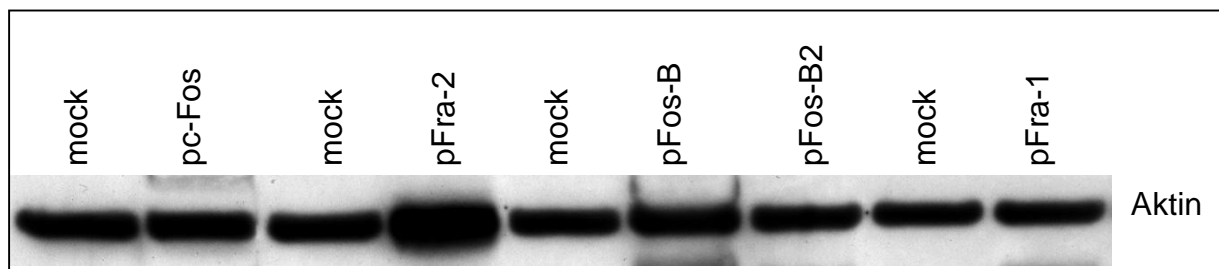


Abbildung 2: Expression von Aktin

4.1.2. Immunzytochemie

Für diese Methode zum Nachweis der erfolgreichen transienten Transfektion wurden die MCF7-Zellen 24h nach Transfektionsbeginn auf gekammerte Objektträger übertragen und nach weiteren 24h Wachstum fixiert und anschließend im DAKO Autostainer mit den entsprechenden Antikörpern (Antikörper s. Western-Blot) für die Fos-Proteine überschichtet.

Bei der anschließenden Betrachtung unter dem Mikroskop ließen sich die transfizierten Zellen mit der entsprechenden Fos-Überexpression durch die starke Färbung deutlich von den nicht-transfizierten Zellen unterscheiden.

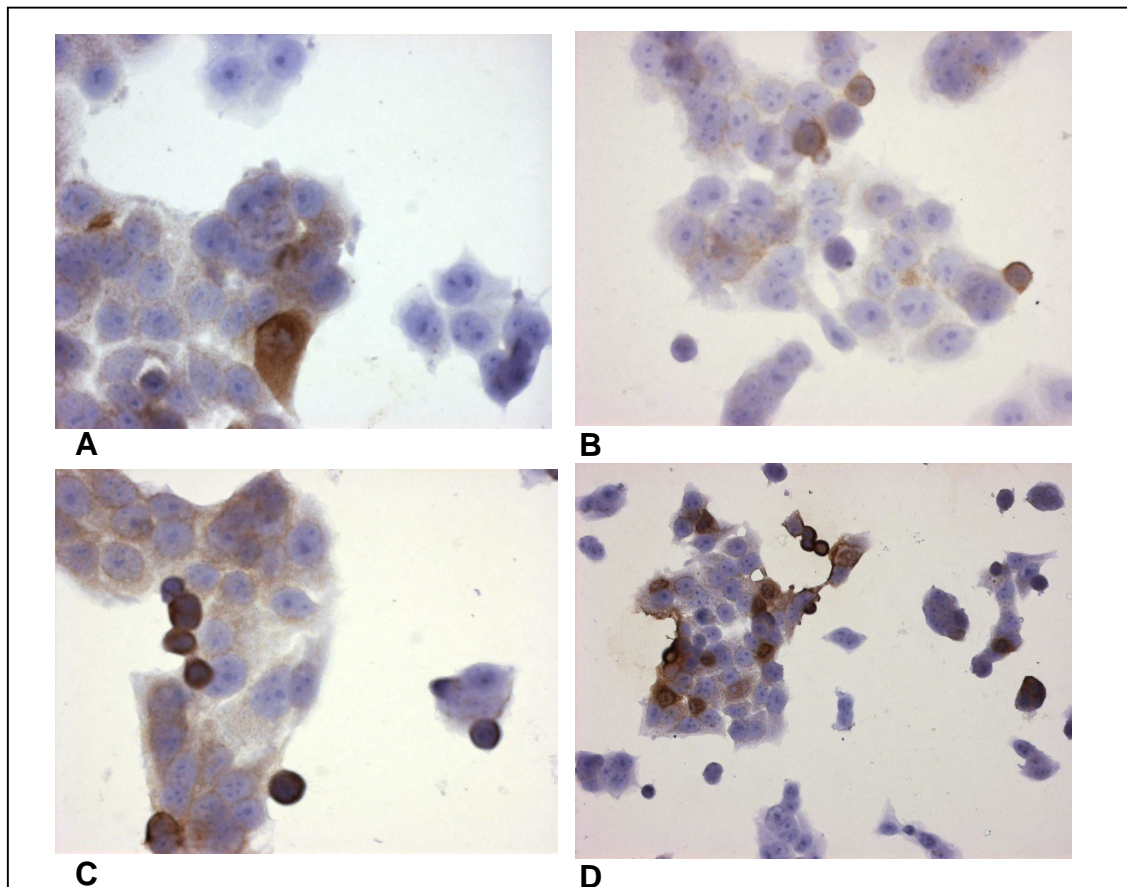


Abbildung 3: Immunzytochemischer Nachweis der Transfektion von MCF7 Zellen.

A: Transfektion mit pc-Fos, Inkubation mit anti-c-Fos-Antikörper. **B:** Transfektion mit pFos-B, Inkubation mit anti-Fos-B-Antikörper. **C:** Transfektion mit pFra-1, Inkubation mit anti-Fra-1-Antikörper. **D:** Transfektion mit pFra-2, Inkubation mit anti-Fra-2-Antikörper.

Als Negativkontrolle dienten die Objektträger mit den mock-transfizierten MCF7-Zellen, welche ebenfalls mit den verschiedenen Fos-Antikörpern überschichtet wurden. Wie in Abbildung 4 am Beispiel nach Inkubation mit dem Fos-B-Antikörper zu sehen, zeigten die mit dem Leerplasmid transfizierten MCF7-Zellen erwartungsgemäß für keines der Fos-Proteine eine Überexpression.

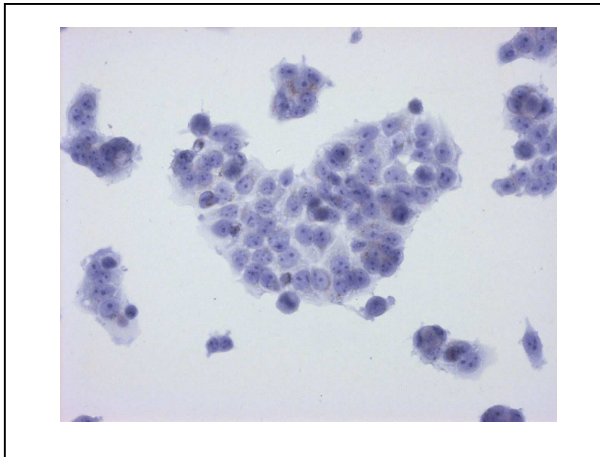


Abbildung 4: Mock-transfizierte MCF7-Zellen nach Überschichtung mit dem Fos-B-Antikörper (Negativkontrolle)

4.2. *Invasions-Assay*

Der Invasions-Assay dient der Untersuchung invasiven Wachstums von Zellen oder Tumorzellen *in vitro* unter Nachahmung physiologischer Bedingungen. Die Zellen müssen hierbei eine in ihrer Zusammensetzung der menschlichen Basalmembran entsprechende sogenannte Matrigel-Beschichtung durchdringen. Die invasiv wachsenden Zellen können durch Auszählung unter dem Mikroskop von den nicht-invasiven Zellen, welche die Hürde der „Basalmembran“ nicht durchdringen konnten, unterschieden werden.

Für die Invasions-Assays wurden die Zellen 24h nach Transfektion in die Invasionskammern übertragen (je 100000 Zellen pro Kammer). Die Auswertung erfolgte nach weiteren 48h Wachstum. Pro Plasmid wurde mit jeweils zwei Ansätzen gearbeitet und unter diesen Bedingungen insgesamt vier unabhängige Experimente durchgeführt.

Als Vergleichsparameter dienten so genannte Kontroll-Inserts, welche wie die Matrigel-Inserts eine dünne porenreiche Membran, jedoch keine Basalmembran-ähnliche Beschichtung enthalten (s. 3.4.).

Des Weiteren wurde jeweils ein Teil der transfizierten Zellen aus den Ansätzen für die Invasions-Assays separiert, die Zellen lysiert und die Proteinextrakte einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Auf diese Weise wurde kontrolliert, dass in den Zellen, die den Invasions-Assays zugeführt wurden, die entsprechenden Fos-Proteine tatsächlich im Überschuss vorlagen.

Auswertung der Matrigel-Inserts:

Die mit den Expressionsvektoren für c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2 transient transfizierten MCF7-Zellen zeigten im Invasions-Assay jeweils unterschiedliche Änderungen ihres invasiven Verhaltens (s. Tabelle 5).

So kam es vor allem durch die Transfektion mit pFra-1 zu einer deutlich gesteigerten Invasivität der Zellen (Mittelwert 245%, $p < 0,001$). Jedoch konnten auch die mit den Vektoren für c-Fos (Mittelwert 181%, $p = 0,015$) und Fos-B (Mittelwert 149%, $p = 0,005$) transfizierten Zellen die Barriere der Matrigel-Membran stets in größerer Anzahl überwinden, als die mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

Die Transfektion mit pFra-2 (Mittelwert 131%) führte nicht zu einer statistisch signifikanten Änderung des invasiven Potentials der MCF7-Zellen.

Nach Transfektion mit dem Fos-B2-Plasmid kam es sogar zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl invasiv wachsender Zellen (Mittelwert 70%, $p = 0,030$).

	Anzahl der Zellen: Matrigel-Inserts	Verteilungsbreite	Standardabweichung
mock	100 %		
c-Fos	181,00 %	117 – 222 %	71,13
Fos-B	148,63 %	110 – 177 %	34,41
Fos-B2	69,67 %	60 – 80 %	24,74
Fra-1	244,75 %	183 – 307 %	59,50
Fra-2	131,50 %	74 – 172 %	52,92

Tabelle 5: Matrigel-Inserts: Invasive Zellen im Invasions-Assay (n = 8 Experimente) nach transienter Transfektion mit Fos-Expressionsvektoren (mock-Transfektion=100%; dies entsprach im Mittel 91,6 Zellen pro Zählfläche)

Auswertung der Kontroll-Inserts:

Auch bei den Kontroll-Inserts ließen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Expressionsvektoren erkennen.

So zeigten auch hier die mit pFos-B (Mittelwert 189%, $p=0,006$) und pc-Fos (Mittelwert 165%, $p=0,011$) transfizierten MCF7-Zellen gegenüber den Negativkontrollen verstärkt die Fähigkeit, die poröse Membran zu überwinden. Für die anderen Fos-Faktoren zeigte sich keine statistisch signifikante Änderung nach Transfektion.

Da das Durchdringen der porösen Kontroll-Membranen ohne Basalmembran-ähnliche Matrigel-Beschichtung jedoch weniger an invasives Potential, sondern eher an die Fähigkeit der Zellen zur Abkoppelung aus dem Zellverband sowie die Zellbeweglichkeit gekoppelt ist, lässt sich mit Hilfe der Kontroll-Membranen mehr die Motilität als die Invasivität der MCF7-Zellen beurteilen.

	Anzahl der Zellen: <u>Kontroll-Inserts</u>	Verteilungsbreite	Standardabweichung
mock	100 %		
c-Fos	165,25 %	137 – 200 %	53,77
Fos-B	188,63 %	135 - 245 %	65,33
Fos-B2	92,17 %	68 – 140 %	41,77
Fra-1	181,63 %	116 – 344 %	118,49
Fra-2	119,38 %	84 – 202 %	56,09

Tabelle 6: Kontroll-Inserts: Zellen mit gesteigerter Motilität im Invasions-Assay (n = 8 Experimente) nach transients Transfektion mit Fos-Expressionsvektoren (mock-Transfektion=100%; dies entsprach im Mittel 39,3 Zellen pro Zählfläche)

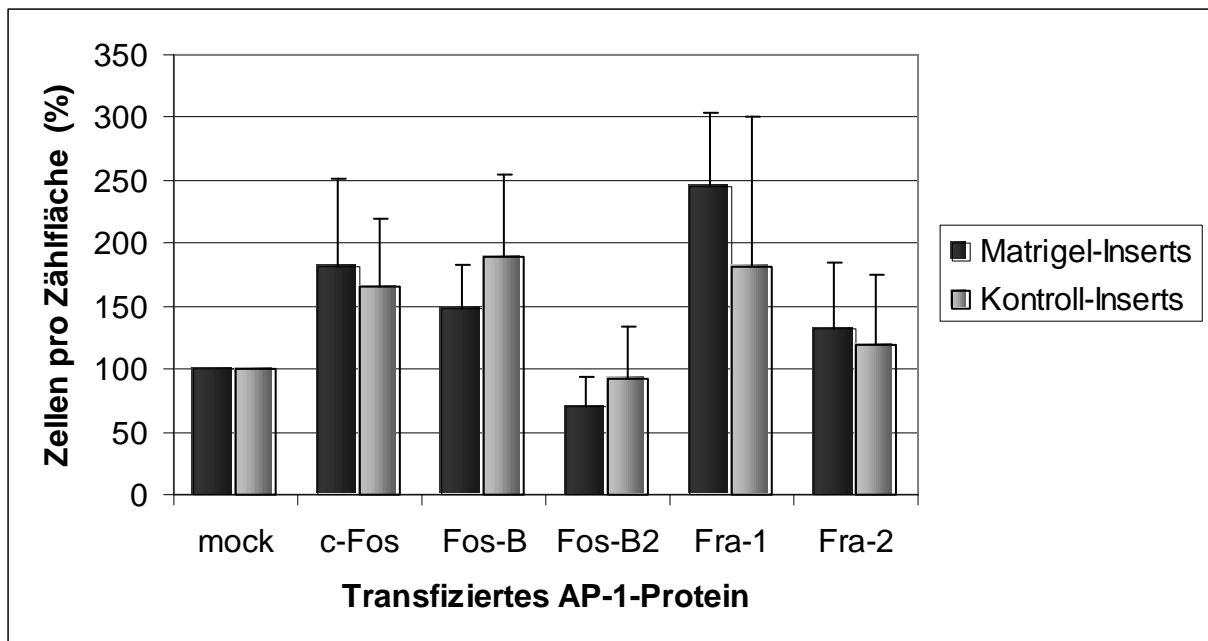


Abbildung 5: Einfluss der transienten Transfektion mit den Expressionsvektoren für c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2 auf das invasive Potential (dunkle Säulen: Matrigel-Inserts) sowie die Motilität (helle Säulen: Kontroll-Inserts) von MCF7-Zellen

Im Vergleich zwischen den Matrigel- und den Kontroll-Membranen war eine weitere Beobachtung zu machen. So überstieg die absolute Anzahl an Zellen, welche die Matrigel-Beschichtung durchdrangen (durchschnittlich 91,6 Zellen pro Zählfläche bei mock-transfizierten Zellen) bei weitem die Anzahl der Zellen, welche die Kontroll-Membranen überwinden konnten (durchschnittlich 39,3 Zellen pro Zählfläche bei mock-transfizierten Zellen). Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei den mock-transfizierten, als auch bei den fos-transfizierten Zellen, und kann am ehesten durch eine chemotaktische Wirkung der Bestandteile des Matrigels auf die Zellen und eine damit verbundene Stimulation zu vermehrter Migration und Invasion erklärt werden.

4.3. Western-Blot-Analysen

Da viele Gene, die an Prozessen der Invasivität und Metastasierung von Zellen und Tumoren beteiligt sind in ihren Promotorregionen AP-1-Bindungsstellen besitzen, sollte hier der Einfluss der Fos-Proteine auf die Expressionsraten von PAI-1, MMP-1, MMP-9 und uPAR mittels Western-Blot-Analyse untersucht werden. Die Zellen

wurden hierfür 24h nach transienter Transfektion lysiert und die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung der Western-Blot-Analyse zugeführt.

Die Western-Blot-Analysen zeigten für keines der Fos-Proteine (c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1, Fra-2) eine eindeutige Änderung der Proteinmengen von PAI-1, MMP-1, MMP-9 oder uPAR.

Hierbei muss darauf verwiesen werden, dass bei der Methode der transienten Transfektion stets nur ein Teil der Zellen eine Überexpression des transfizierten Gens aufweist.

Da der Anteil der transfizierten Zellen also nur einen Bruchteil der Zellen im gesamten Zelllysat ausmacht, scheint die Western-Blot-Analyse zur Darstellung und Quantifizierung geringster Änderungen in der Expressionsrate von Invasionsproteinen (wie z.B. PAI-1) durch geänderte Fos-Expression zu ungenau.

Da ein Einfluss der Fos-Proteine auf die Transkriptionsraten gewisser Zielgene mit Hilfe der Western-Blot-Analysen somit jedoch auch nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde nach einer Methode gesucht, mit deren Hilfe die entsprechenden Proteine auf der Ebene der einzelnen transfizierten Zelle detektiert werden können. Für diese Untersuchung wurde die Methode der nachfolgend beschriebenen Doppeldetektion mit fluoreszierenden Antikörpern gewählt.

4.4. *Immunzytochemische Doppeldetektion mit Fluoreszenz-AK*

Um den Einfluss der Fos-Faktoren auf die Regulation an Invasionsprozessen beteiligter Proteine wie PAI-1, MMP-1, MMP-9 und uPAR auf der Ebene der einzelnen transfizierten Zelle zu untersuchen, wurden die MCF-7-Zellen nach transienter Transfektion mit den Expressionsvektoren für c-Fos, Fos-B, Fra-1 und Fra-2 auf gekammerte Objektträger überführt und nach weiteren 24h Wachstum fixiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit fluoreszierenden Antikörpern, und zwar mit allen Kombinationen zwischen c-Fos, Fos-B, Fra-1 und Fra-2 auf der einen Seite und PAI-1, MMP-1, MMP-9 und uPAR auf der anderen Seite.

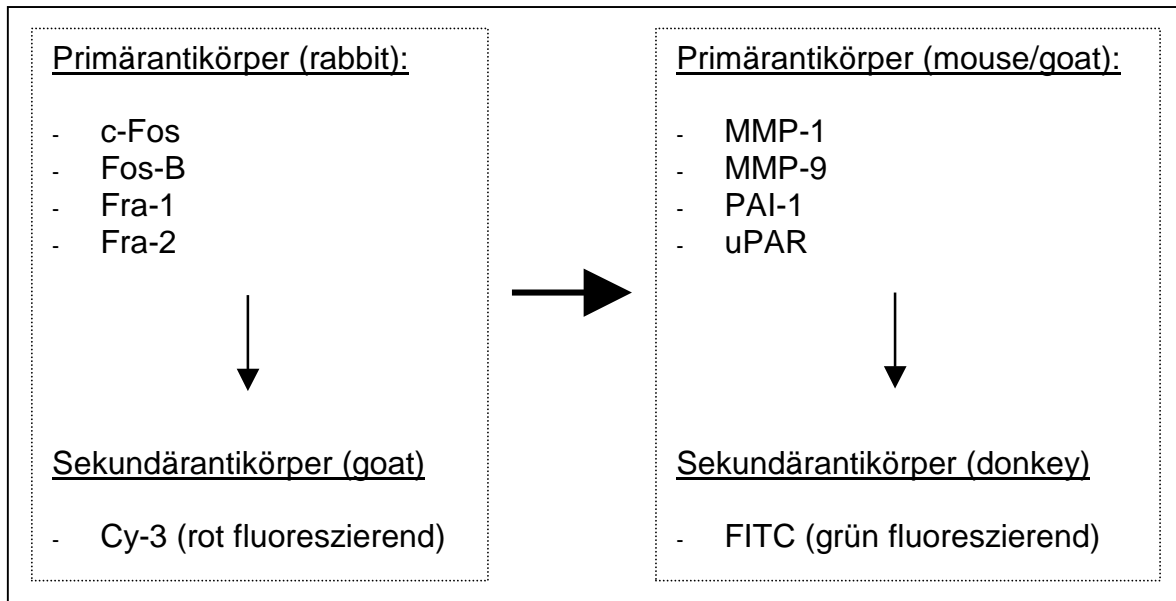


Abbildung 6: Inkubation mit Antikörper für immunzytochemische Doppeldetektion

Es zeigten sich für die einzelnen Fos-Proteine und Invasionsproteine unterschiedliche Effekte in den transfizierten MCF7-Zellen.

So kam es in Zellen mit starker Überexpression von c-Fos, Fra-1 und Fra-2 zu einer deutlichen Hochregulation der PAI-1-Expression. In Zellen mit starker Fos-B-Überexpression war dieser Effekt nicht zu beobachten.

Die Expression von MMP-1, MMP-9 und uPAR blieb hingegen unbeeinflusst von der Überexpression der Fos-Proteine c-Fos, Fos-B, Fra-1 und Fra-2.

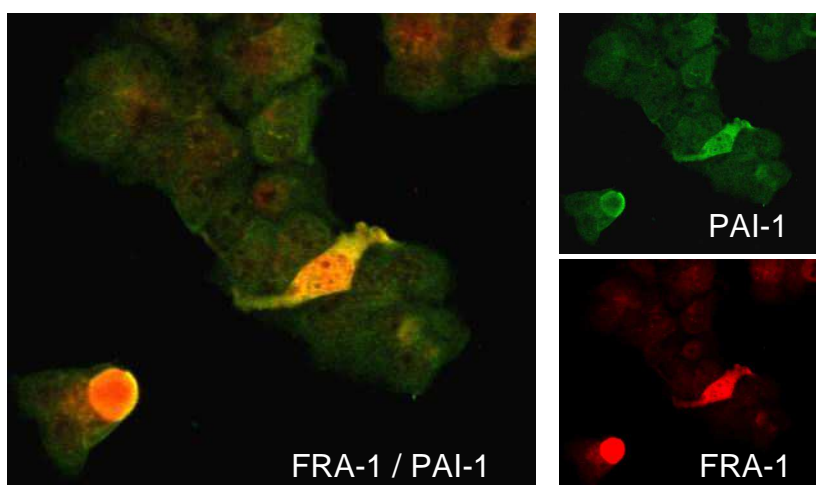


Abbildung 7: Hochregulation der zytoplasmatischen PAI-1-Expression in transfizierten MCF7-Zellen mit nukleärer und zytoplasmatischer Fra-1-Überexpression

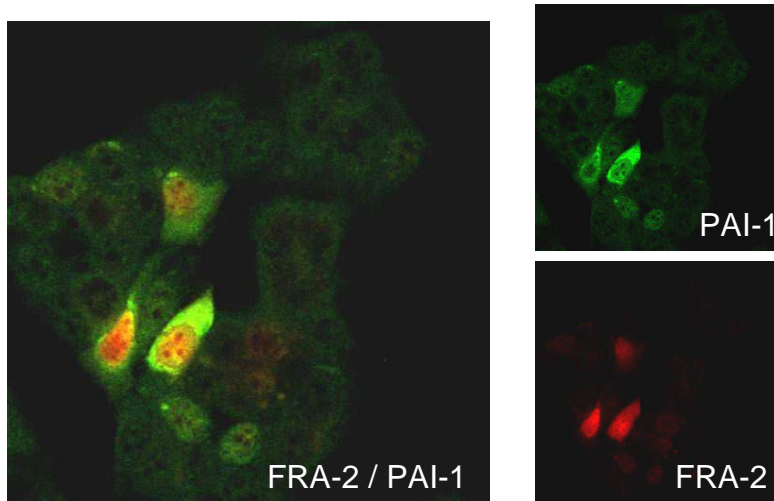


Abbildung 8: Hochregulation der zytoplasmatischen PAI-1-Expression in transfizierten MCF7-Zellen mit nukleärer Fra-2-Überexpression

4.5. Reporter-Assay mit Kotransfektion

Zur Untersuchung des Einflusses der Fos-Proteine auf den MMP-9-Promotor wurden die MCF7-Zellen zum einen mit den Fos-Vektoren (pc-Fos, pFos-B, pFos-B2, pFra-1, pFra-2), zum anderen mit Vektorkonstrukten, welche für Luziferase kodieren, jedoch den menschlichen MMP-9-Promotor enthalten, kotransfiziert. Die Menge der von den Zellen gebildeten Luziferase, welche in diesem Fall anstelle von MMP-9 exprimiert wird, wurde durch eine Lichtreaktion (gemessen in „Relative light units“) sichtbar gemacht.

Die Zellen wurden zu diesem Zweck 24 h nach der Kotransfektion lysiert und zunächst eingefroren. Die Auswertung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe des Luciferase Assay Systems (Promega) im Luminometer.

Auf diese Weise wurden insgesamt 6 Versuche mit je drei Ansätzen pro Plasmid durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten auch hier mock-transfizierte Zellen mit nicht gesteigerter Fos-Expression.

Die Transfektion mit dem c-Fos-Plasmid führte im Gegensatz zur Transfektion mit dem Leerplasmid zu einer deutlich gesteigerten Aktivität des MMP-9-Promotors (ca. 1,65-fach gesteigert). Auch bei Überexpression von Fos-B2 konnte eine intrazelluläre

Zunahme von Luziferase und damit eine Zunahme der MMP-9-Promotoraktivität auf das ca. 1,77-fache beobachtet werden.

Nach Kotransfektion der Transfektionsvektoren pFos-B, pFra-1 und pFra-2 mit dem Reporterplasmid zeigten sich hingegen keine signifikanten Änderungen in der MMP-9-Promotoraktivität.

	MMP-9 Promotoraktivität nach Transfektion	Verteilungsbreite	Standardabweichung
Mock	100 %		
c-Fos	165,12 %	127,5 - 196,1 %	26,80
Fos-B	98,98 %	73,4 – 124,5 %	20,46
Fos-B2	176,93 %	149,2 – 200,3 %	22,01
Fra-1	116,75 %	93,2 – 140,4 %	17,24
Fra-2	94,40 %	63,9 – 126,1 %	24,28

Tabelle 7: MMP-9 Promotoraktivität nach Transfektion mit Fos-Vektoren (Aktivität nach mock-Transfektion=100%). Zahlen sind Mittelwerte aus 4 Versuchen mit je drei Ansätzen.

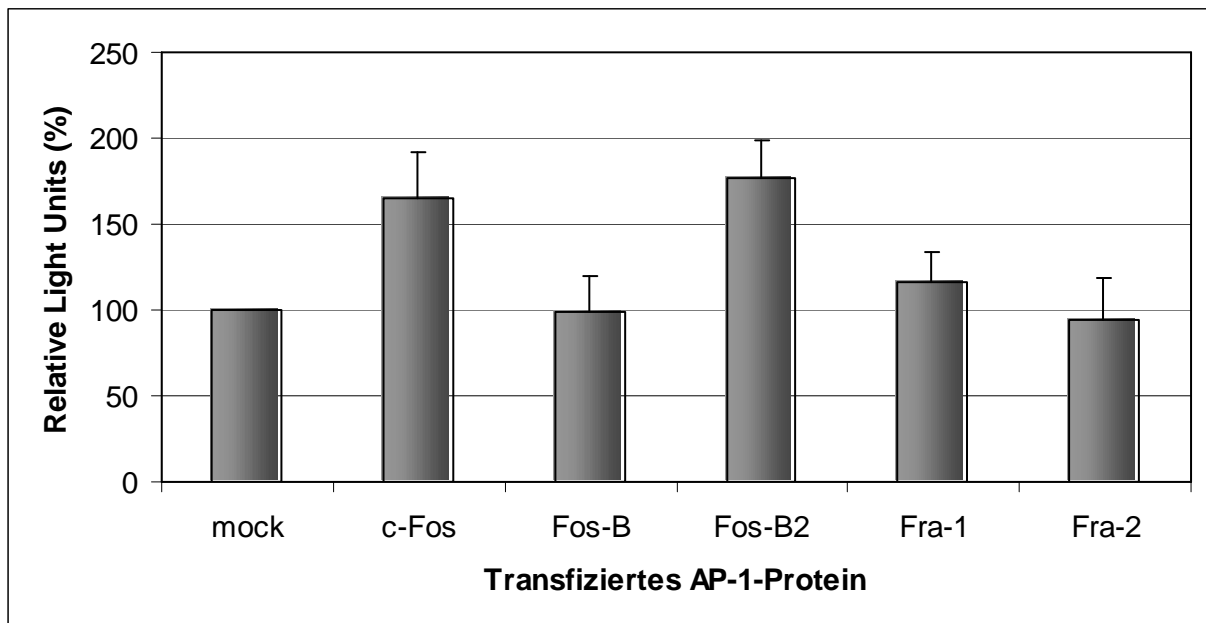


Abbildung 9: Einfluss der Fos-Proteine auf die Aktivität des MMP-9-Promotors

4.6. Einfluss von TPA

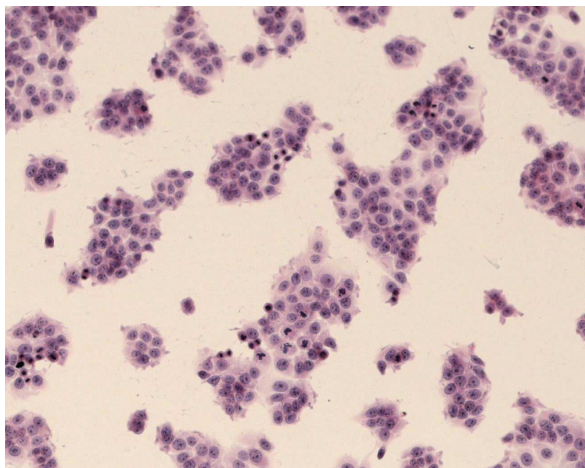
Mit den nachfolgend beschriebenen Versuchen sollte der Einfluss des Phorbolesters TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) als klassischer Aktivator der AP-1-Aktivität auf die Morphologie der MCF-7-Zellen und auf die Regulation des MMP-9-Promotors untersucht werden.

4.6.1. Einfluss von TPA auf die Zellmorphologie

Hierbei wurden die MCF7-Zellen auf gekammerte Objektträger überführt (je 200.000 Zellen) und die Hälfte davon mit TPA stimuliert (2µl TPA auf 2ml Medium complete). Nach 48h Wachstum wurden die Zellen fixiert und gefärbt.

Die mit TPA behandelten Zellen zeigten hierbei eine deutliche Veränderung der Morphologie. Zum einen ließ sich eine Auflockerung der epithelialen Zellverbände und eine vermehrte Loslösung der einzelnen Zellen aus dem Verband feststellen. Zum anderen zeigten die TPA-stimulierten Zellen vermehrt längliche Zellausläufer und nahmen so dem Aussehen nach einen eher mesenchymalen Charakter an.

MCF7 ohne TPA-Stimulation



MCF7 mit TPA-Stimulation

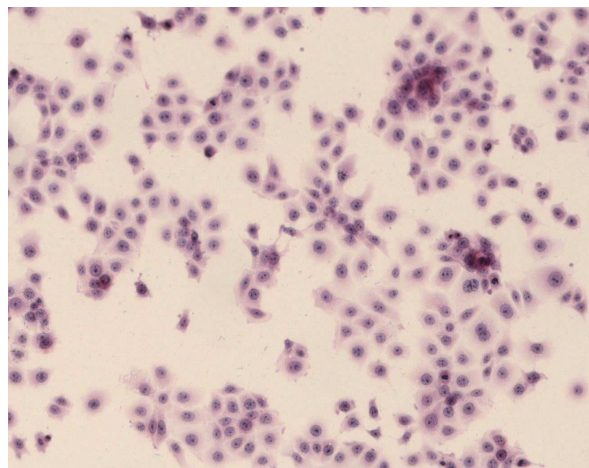


Abbildung 10: Einfluss von TPA auf die Zellmorphologie von MCF7-Zellen (HE-Färbung)

4.6.3. Reporter-Assay mit TPA-stimulierten Zellen

Um den Einfluss von TPA auf die Aktivität des MMP-9-Promotors im Reporter-Assay (vergleiche hierzu 4.5.) zu untersuchen, wurde für jedes Plasmid (mock, c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1, Fra-2) die doppelte Anzahl an Ansätzen erstellt. Es erfolgte zunächst wie in Kapitel 4.5. beschrieben die Kotransfektion mit den Fos-Plasmiden einerseits und dem MMP-9-Luziferase-Vektorkonstrukt andererseits. Bei allen Ansätzen wurde 12 h nach Transfektionsbeginn das Medium ausgetauscht, die Hälfte der Transfektionsansätze jedoch mit TPA-haltigem Medium stimuliert. Die MMP-9-Promotoraktivität wurde anhand der Luziferase-Expression mit Hilfe einer Lichtreaktion im Luminometer bestimmt. Auf diese Weise wurden drei Versuche mit je drei Ansätzen pro Plasmid durchgeführt.

Die TPA-stimulierten Zellen zeigten bezüglich der Änderung der MMP-9-Promotoraktivität bei unterschiedlichen Fos-Expressionsraten ein ähnliches Ergebnis wie die unstimulierten MCF7-Zellen (s. 4.5.). So kam es nach Transfektion mit dem c-Fos-Plasmid zu einer ca. 2,1-fach gesteigerten Aktivität des MMP-9-Promotors, die Transfektion mit Fos-B2 bewirkte eine Steigerung auf das 1,8-fache im Vergleich zu den mock-transfizierten Zellen. Die Transfektion mit pFos-B, pFra-1 und pFra-2 führte wie bei den nicht-stimulierten Zellen zu keiner signifikanten Änderung der Luziferase-Expression und damit der MMP-9-Promotoraktivität.

Die Phorbol ester-behandelten Zellen zeigten jedoch gegenüber den unstimulierten MCF-7-Zellen insgesamt deutlich gesteigerte Luziferase-Expressionsraten und damit also eine gesteigerte MMP-9-Promotoraktivität nach TPA-Stimulation.

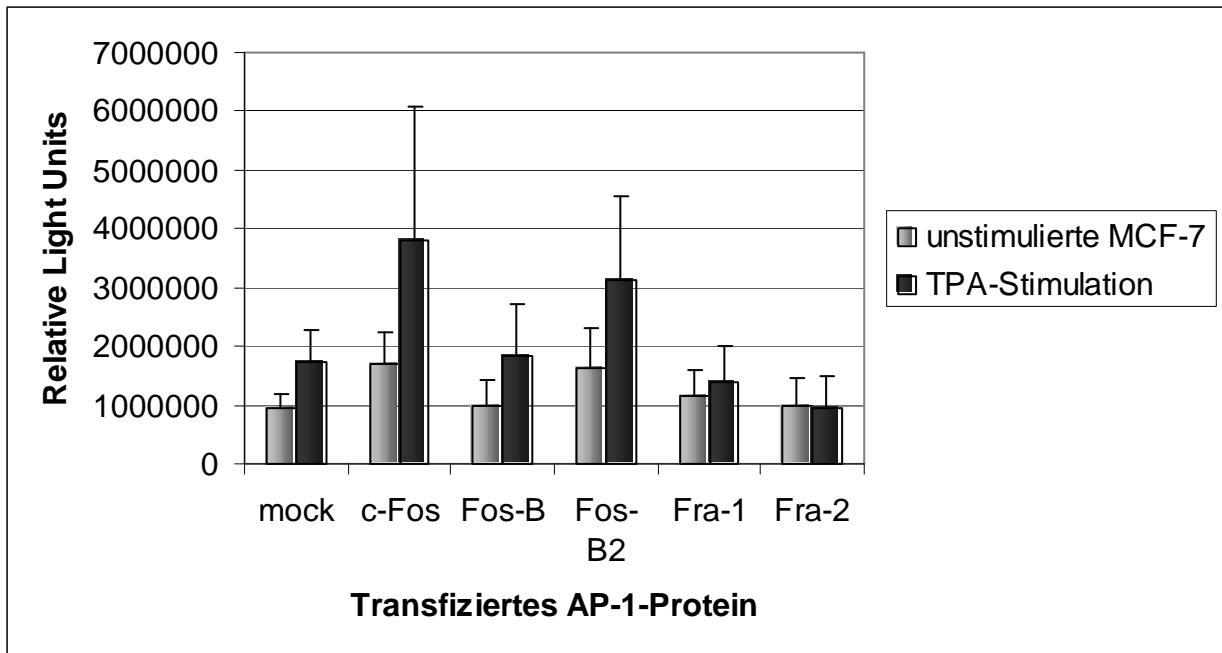


Abbildung 11: Einfluss der TPA-Stimulation auf die MMP-9-Promotoraktivität

5. Diskussion

Die Mitglieder der Fos-Familie der AP-1-Transkriptionsfaktoren, c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2, sind durch Dimerbildung mit Jun-Proteinen (c-Jun, JunB, JunD) in der Lage, an AP-1-Bindungsstellen, den so genannten TPA-responsiven Elementen (TRE's), welche sich in den Promotor-/Enhancerregionen von Zielgenen befinden, zu binden, und hierdurch zu einer Alteration der Genexpression zu führen. Die Ausbildung der Dimerstruktur erfolgt hierbei über so genannte „leucine zipper“, die Bindung der DNA der verschiedenen Zielgene über hoch konservierte „basic regions“ (Angel u. Karin 1991).

Trotz des grundsätzlich einheitlichen Mechanismus der Dimerisierung und DNA-Bindung, verfügen die einzelnen Fos-Jun-Heterodimere jedoch über unterschiedlich stark ausgeprägte transaktivierende Fähigkeiten.

Durch das Vorhandensein bzw. das Fehlen so genannter transaktivierender Domänen in den N- und C-terminalen Bereichen lassen sich die Fos-Proteine in zwei Untergruppen einteilen. C-Fos und Fos-B gehören zu den transformierenden, Fra-1, Fra-2 und Fos-B2 zu den nicht-transformierenden Fos-Proteinen (Tulchinsky 2000). C-Fos stellt hierbei als bekanntes Onkogen den Prototyp der Fos-Proteine dar. Es besitzt starke transformierende Eigenschaften und in verschiedensten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sowohl für die Aktivierung von Enhancerregionen gewisser Gene benötigt wird, deren Genprodukte an malignem Wachstum und Metastasierung beteiligt sind (z.B. die Matrixmetalloproteasen), als auch für das Voranschreiten der malignen Transformation von Tumoren unabdingbar ist (Tulchinsky 2000; Saez et al. 1995). Auch scheint c-Fos eine Rolle für den bei Entstehung und Fortschreiten epithelialer Tumoren oftmals beobachteten Übergang der Zellen von phänotypisch epithelialen hin zu eher mesenchymalen Zellcharakteristika zu spielen (Reichmann et al. 1992).

Auch Fos-B, welches wie c-Fos verschiedene transaktivierende Domänen in seinen N- und C-terminalen Abschnitten enthält, ist als Aktivator der Transkription zur Transformation von Fibroblasten befähigt (Wisdom et al. 1992).

Doch trotz der fehlenden transaktivierenden Domänen und des damit verbundenen transformierenden Potentials, scheinen auch die übrigen Fos-Faktoren, Fra-1, Fra-2

und Fos-B2, eine wichtige Rolle bei der Entstehung, der Aufrechterhaltung und dem Fortschreiten von maligner Transformation in Tumoren sowie bei der Modulation der Transkription wichtiger Zielgene zu spielen.

Es ist anzunehmen, dass die verschiedenen Mitglieder der Fos-Familie spezifische biologische Funktionen beim Prozess der malignen Transformation und dem voranschreitenden Tumorwachstum ausüben.

5.1. Invasions-Assay

Um zu untersuchen, welche der Mitglieder der Fos-Familie der AP-1-Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Motilität und die Invasivität der MCF7-Brustkrebszellen haben, wurden Invasions-Assays nach transienter Transfektion der Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren durchgeführt.

Hierbei führte vor allem die Überexpression von Fra-1, in geringerem Maße aber auch von c-Fos und Fos-B zu einer signifikanten Zunahme der Invasivität der MCF7-Zellen. Die Mehrexpression von Fra-2 führte zu keiner statistisch signifikanten Änderung, und die Transfektion mit pFosB2 bewirkte gar eine Abnahme der Invasivität der Zellen in vitro.

Bei den Paralleluntersuchungen mit Kontroll-Inserts, welche im Gegensatz zu den Matrigel-Inserts der Beurteilung der Motilität und Migrationsfähigkeit der Zellen dienen, führte die Transfektion mit Vektoren für Fos-B und c-Fos zu einer signifikanten Zunahme der Motilität der MCF7-Brustkrebszellen.

Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass die Überexpression von Fra-1 zu einer starken, die Überexpression von c-Fos zu einer etwas schwächer ausgeprägten Zunahme der Invasivität der MCF7-Zellen führte. Im Falle von Fos-B war der stimulierende Effekt bei den Kontroll-Inserts deutlich größer als bei den Matrigel-Inserts. Trägt man diesen Ergebnissen der Kontrollmembranen Rechnung, so scheint die Überexpression von Fos-B weniger zu einer Zunahme der Invasivität als zu einer Zunahme der Zellmotilität zu führen.

Die verschiedenen Fos-Faktoren scheinen also unterschiedlich starke Effekte auf die Änderung des invasiven Potentials von Tumorzellen zu haben. Die bei c-Fos-Überexpression beobachtete gesteigerte Invasivität der MCF7-Zellen geht konform

mit der Identifizierung von c-Fos als Onkogen mit starkem transformierendem Potential und seiner Beteiligung an Entstehung und Aufrechterhaltung von maligner Transformation (Tulchinsky 2000).

Die vorliegenden Untersuchungen lassen jedoch auch vermuten, dass der Einfluss der verschiedenen Fos-Faktoren auf die Invasivität von Zellen nicht an deren transaktivierende Fähigkeiten gekoppelt ist. In diesem Fall bewirkte eben gerade die Überexpression des nicht-transformierenden Fos-Proteins Fra-1 den stärksten Effekt hinsichtlich der Steigerung der Invasivität.

Vergleichbare Ergebnisse konnten Kustikova et al. (1998) für die aus Adenokarzinomzellen der Mäusebrustdrüse gewonnenen CSML0-Zellen finden. CSML0-Zellen besitzen wie MCF7-Zellen ein epitheliales Aussehen mit engen Zellkontakten und kein metastasierendes Potential. Die Überexpression von exogenem Fra-1 in CSML0-Zellen führte neben der Änderung der Morphologie hin zu länglicheren Zellformen und Fibroblasten-ähnlichem Aussehen, zu einer Zunahme der Invasivität und Motilität im in-vitro Invasions-Assay. Des Weiteren zeigte dieselbe Arbeitsgruppe durch Northern-Blot-Analysen an 13 verschiedenen Tumorzelllinien, dass die Überexpression von fra-1 mRNA mit der Expression von mts1 (S100A4) korrelierte, einem Gen, das kennzeichnend für hohe Metastasierungsfähigkeit und mesenchymale Umwandlung von Karzinomzellen ist. Gleichzeitig wiesen diese Zellen einen Verlust der E-Cadherin-Expression auf, was ebenfalls im Zuge der malignen Transformation von Zellen zu beobachten ist (Kustikova et al. 1998).

An denselben CSML0-Zellen, die normalerweise nur wenig c-Fos und weder Fra-1 noch Fra-2 exprimieren, zeigten Tkach et al., dass die Transfektion mit c-fos und fra-1, nicht aber mit fra-2 zu einer gesteigerten Motilität der Zellen führte. Bei einer anderen Zelllinie, den fibroblastoiden L929-Zellen, welche sowohl Fra-1 als auch Fra-2, aber kein c-Fos exprimieren, und die durch hohe Motilität gekennzeichnet sind, führte die Transfektion mit anti-sense-fra-1 und -fra-2 zu einer starken Abnahme der Motilität. Diese Veränderung der Zellmotilität, die also sowohl bei Überexpression transformierender als auch nicht-transformierender Fos-Faktoren beobachtet werden konnte, korrelierte außerdem mit Veränderungen der Zellmorphologie und dem Ausmaß an Kontakt der Zellen mit dem Untergrund (Tkach et al. 2003).

Eine ebenfalls an MCF7-Zellen durchgeführte Studie konnte ein deutliches Ansteigen der Fra-1-Aktivität bei Jun-Überexpression in den Zellen aufzeigen. Einhergehend mit der veränderten AP-1-Zusammensetzung durch Fra-1-Überexpression kam es zu

einer erhöhten biologischen Aggressivität und gesteigerter Motilität und Invasivität der MCF7-Zellen (Smith et al. 1999).

Auch in Untersuchungen an Brustkrebsgewebe konnte eine Korrelation hoher Fra-1-Expression mit starker Expression von Proliferationsmarkern wie Ki67 und Cyclin-E gefunden werden. Eine erhöhte Fos-B-Expression war in diesen Untersuchungen hingegen mit einem höher differenzierten und schwach proliferierenden Phänotyp vergesellschaftet (Bamberger et al. 1999; Milde-Langosch et al. 2000).

Die oftmals beobachtete Änderung der Zellmorphologie ließ sich in unseren eigenen Experimenten an MCF7-Zellen nicht klar genug herausstellen, so dass keine genauen Zuordnungen zwischen transfiziertem AP-1-Protein und Änderungen des Phänotyps getroffen werden konnten. In parallel in unserem Institut durchgeführten Experimenten an MDA-MB231 Brustkrebszellen waren im Gegensatz zu den MCF7-Zellen diesbezüglich deutlichere Effekte zu beobachten. MDA-Zellen mit starker c-Fos- und Fra-1-Überexpression wiesen im Gegensatz zu mock-transfizierten Zellen deutlich elongierte Zellkörper mit langen Zellausläufern auf. Nach pFos-B Transfektion zeigten die Zellen ein eher rundliches Aussehen mit nur wenigen Zellfortsätzen (Milde-Langosch et al. 2004).

Vor dem Hintergrund unserer eigenen Ergebnisse und der hier aufgeführten Studien scheinen besonders die beiden Fos-Proteine c-Fos und Fra-1 eine entscheidende Rolle für die Invasivität von Mammkarzinom-Zellen zu spielen. Um die Unterschiede zwischen den einzelnen Fos-Faktoren hinsichtlich der Steigerung der Invasivität noch genauer zu untersuchen und herauszustellen, könnten beispielsweise Invasions-Assays nach stabiler Transfektion anstelle der hier durchgeführten transienten Transfektion der Zellen von Nutzen sein.

5.2. Immunzytochemie mit Doppeldetektion

Da nach transients Transfektion mit Fos-Vektoren die Expressionsänderung von AP-1-Zielgenen in den MCF7-Zellen mit Hilfe von Western-Blot-Analysen nicht zu bestimmen war, führten wir Doppelmarkierungsversuche mit fluoreszierenden Antikörpern durch. Hiermit sollte der Einfluss der Fos-Faktoren auf die Regulation der

PAI-1-, MMP-1-, MMP-9- und uPAR-Expression auf der Ebene der einzelnen transfizierten Zelle untersucht werden.

Es zeigte sich eine deutliche Hochregulation der PAI-1-Expression in Zellen mit starker Überexpression von c-Fos, Fra-1 und Fra-2. Bei Fos-B-Überexpression blieb dieser Effekt aus. Die Expressionsraten von MMP-1, MMP-9 und uPAR blieben weitestgehend unbeeinflusst von der Überexpression der Fos-Proteine.

Dass die Expressionsraten verschiedener Gene, die mit Metastasierungsfähigkeit und schlechter Prognose von Tumoren vergesellschaftet sind, durch die einzelnen Fos-Proteine unterschiedlich stark beeinflusst werden, konnte schon in diversen Untersuchungen gezeigt werden. Fra-1 scheint bei der Regulation dieser Zielgene eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte durch die Induzierung vermehrter Fra-1-Synthese im Zellmodell eine Hochregulation sämtlicher Mitglieder des uPA/PAI-Systems beobachtet werden (Kustikova et al. 1998).

Ähnliche Ergebnisse konnten an Mäusezelllinien gefunden werden. Hier führten vor allem die Überexpression von c-Fos und Fra-1 zu einer Transkriptionsaktivierung von PAI-1, bei Fra-2 hingegen war dieser stimulierende Effekt praktisch nicht vorhanden (Andersen et al. 2002).

Western-Blot-Analysen an Tumorgewebe aus 75 Mammakarzinomen zur Quantifizierung und Korrelation der Expressionsraten von MMP-1, MMP-9, PAI-1 und uPAR mit der der Fos-Proteine zeigten eine deutliche Korrelation von MMP-1 mit hoher Expression von Fos-B und phosphoryliertem Fra-2. Außerdem zeigte sich, ähnlich wie für Fos-B, eine Assoziation von MMP-1 mit günstigeren Prognosefaktoren wie positivem Östrogenrezeptorstatus und negativem Lymphknotenstatus. Hohe MMP-9-Aktivität in den Tumoren korrelierte mit hoher c-Fos- und Fra-2-Expression und war außerdem noch mit positivem Lymphknotenstatus assoziiert. Für PAI-1 zeigte sich eine starke Korrelation mit hohen Fra-2 Levels (Milde-Langosch et al. 2004).

Wie bereits in unseren Invasions-Assays gezeigt werden konnte, scheinen vor allem die Transkriptionsfaktoren c-Fos und Fra-1 mit höherer Aggressivität und Invasivität von Tumorzellen vergesellschaftet zu sein. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Doppelmarkierungsversuche, scheint diese Steigerung der Invasivität zu einem Teil mit einer erhöhten PAI-1 Expression der Zellen zusammenzuhängen. Interessant

ist diese Beobachtung vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass PAI-1 neben uPA mittlerweile als unabhängiger prognostischer Faktor bei der Therapie von Mammakarzinomen anerkannt und hierbei mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist (Jänicke et al. 1993). Diese in den Doppelmarkierungsversuchen beobachtete PAI-1-Hochregulation in Zellen mit gleichzeitig hoher c-Fos-, Fra-1- und Fra-2-Expression würde die Vermutung stützen, dass c-Fos, Fra-1 und eventuell auch Fra-2 im Gegensatz zu Fos-B tatsächlich mit vermehrter Invasivität und Metastasierungsfähigkeit von Tumoren im Zusammenhang stehen und diese auf bestimmtem Wege mit bedingen. Zur genauen Klärung der hierbei ablaufenden Mechanismen und zur Identifizierung aller daran beteiligten Kofaktoren, sollten sicherlich weitere Untersuchungen zur Rolle der einzelnen Fos-Faktoren durchgeführt werden.

5.3. Reporter-Assay mit Kotransfektion

Die mit Hilfe von MMP-9-Luziferase-Vektorkonstrukten und Fos-Vektoren durchgeführten Experimente zur Untersuchung eines direkten Einflusses der Fos-Proteine auf die Aktivität des MMP-9-Promotors konnten nur für c-Fos und Fos-B2 eine leichte Steigerung der MMP-9-Promotoraktivität aufzeigen. Obwohl, wie oben bereits diskutiert, offensichtlich einige der Fos-Proteine die Invasivität von Brustkrebszellen zu beeinflussen vermögen, scheint dies in Anbetracht der Ergebnisse unserer Kotransfektionsexperimente zumindest nicht durch eine direkte und alleinige Regulation der Promotoren von Matrix-Metalloproteinasen, wie in diesem Falle der Gelatinase MMP-9, welche sich unter anderem durch die Spaltung von Basalmembranbestandteilen auszeichnet, zu geschehen. Dies steht sowohl im Einklang mit den Ergebnissen von Andersen et al., bei deren Versuchen mit CSML0-Zellen keines der Fos-Proteine die MMP-9-Expression induzieren konnte, als auch mit den Ergebnissen unserer immunzytochemischen Doppelmarkierungsversuche mit fluoreszierenden Antikörpern, wo keine Hochregulation der MMP-9-Expression in Fos-überexprimierenden Zellen zu finden war.

Obwohl in unseren Experimenten ein klarer Einfluss der Fos-Proteine auf die Invasivität und Migrationsfähigkeit von MCF7-Brustkrebszellen aufgezeigt werden

konnte, bleibt nach wie vor unklar, ob diese vermehrte Invasivität auf einer direkten und alleinigen Regulation der an Metastasierung beteiligten Gene durch die AP-1-Proteine beruht, oder ob andere Faktoren gemeinsam mit den Fos-Proteinen eine Hochregulation von z.B. PAI-1 bewirken. Ein multifaktorielles Geschehen scheint in Anbetracht der oben genannten Ergebnisse jedoch am wahrscheinlichsten.

Um eine angesichts der vorliegenden Ergebnisse möglicherweise sogar prognostische Rolle der Fos-Faktoren beim Mammakarzinom zu definieren, sind sicherlich weitere in-vivo und in-vitro Untersuchungen nötig. Sollte sich der oben beschriebene Zusammenhang vor allem von Fra-1 und c-Fos mit erhöhter PAI-1-Expression sowie vermehrter Invasivität und damit Metastasierungsfähigkeit von Brustkrebszellen bestätigen, sollten sich außerdem Untersuchungen anschließen, welche die Tauglichkeit von Fos-Faktoren nicht nur als unabhängige prognostische Faktoren sondern eventuell sogar als Targets in der Krebstherapie untersuchen. Erste Erfolge in dieser Richtung konnten bereits an Mäusen erzielt werden. Hier führte die Impfung mit einer oralen DNA-Vakzine gegen Fra-1 gekoppelt an sekretorisches IL-18 zu einer über antiangiogenetische Vorgänge und CD8-T-Lymphozyten vermittelten Suppression des Wachstums von Primärtumor und Metastasen bei Mammakarzinomen (Luo et al. 2003 u. 2005).

5.4. Einfluss des Phorbolesters TPA

Der Phorbolester TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) ist als potenter Tumorpromotor und klassischer Aktivator der AP-1-Transkriptionsfaktoren bekannt (Guberman et al. 2005).

In den oben beschriebenen Experimenten führte die Stimulation der MCF7-Zellen mit TPA-haltigem Medium zu einer Änderung des Phänotyps von epithelialen hin zu mesenchymalen Zellcharakteristika. Neben einer vermehrten Ausbildung von länglichen Zytoplasmaausläufern konnte eine Auflockerung der epithelialen Zellverbände und Vereinzelung der Zellen beobachtet werden. Diese unter dem Einfluss von TPA beobachtete Entdifferenzierung der MCF7-Zellen lässt auf eine Rolle des Phorbolesters bei der Induktion neoplastischer Transformation schließen, welche bereits von diversen anderen Autoren beschrieben wurde.

Die neben der Induktion neoplastischer Transformation beschriebene Rolle von TPA als klassischer AP-1-Aktivator könnte verantwortlich für die Ergebnisse der Reporter-Assays sein. Hier zeigte sich im Gegensatz zu den unstimulierten Zellen unter Einfluss von TPA eine deutliche Steigerung der MMP-9-Promotoraktivität, wobei der unterschiedliche Aktivierungsgrad durch die verschiedenen Fos-Proteine im Verhältnis jedoch gleich blieb. Die gesteigerte MMP-9-Promotoraktivität scheint hier also durch eine TPA-vermittelte Steigerung der AP-1-Aktivität bedingt zu sein.

6. Zusammenfassung

Die Mitglieder der Fos-Familie der AP-1-Transkriptionsfaktoren (c-Fos, Fos-B, Fos-B2, Fra-1 und Fra-2) sind über Dimerbildung mit Jun-Proteinen in der Lage, regulatorische Genabschnitte von Zielgenen zu binden und darüber zu einer Alteration der Genexpression zu führen. Da viele an Tumorinvasion beteiligte Proteasen AP-1-abhängig reguliert werden, liegt die Vermutung nahe, dass die Expression einzelner Fos-Proteine auch für die Invasivität von Mammakarzinomen relevant ist. Um dies zu untersuchen führten wir transiente Transfektionen mit Fos-Expressionsvektoren bei MCF7-Mammakarzinomzellen durch und untersuchten anschließend das invasive Verhalten der Zellen im in-vitro Invasions-Assay, bei welchem die Zellen eine künstliche Basalmembran überwinden müssen. Die Transfektion mit fra-1 führte hierbei zu einer Zunahme der Invasivität der Zellen auf das 2,4-fache, die Transfektion mit c-fos zu einer Steigerung auf das 1,8-fache. Die Überexpression von Fra-2 bewirkte in unseren Experimenten keine Änderung des invasiven Verhaltens, und nach Fos-B2-Transfektion kam es gar zu einer signifikanten Abnahme der invasiv wachsenden Zellen. Für Fos-B-Überexpression konnte statt einer Änderung der Invasivität eine Zunahme der Zellmotilität beobachtet werden.

Um Einflüsse auf die Regulation verschiedener Zielgene der AP-1-Faktoren zu untersuchen, führten wir immunzytochemische Doppelmarkierungsversuche mit fluoreszierenden Antikörpern durch. Hierbei führte die transiente Transfektion mit c-fos, fra-1 und fra-2 zu einer Hochregulation der PAI-1-Expression in den MCF7-Zellen. Die Expressionsraten von MMP-1, MMP-9 und uPAR blieben hingegen unbeeinflusst von der Überexpression der Fos-Faktoren.

Für die Untersuchung des Einflusses der Fos-Proteine auf die MMP-9-Promotoraktivität verwendeten wir Vektorkonstrukte, welche den menschlichen MMP-9-Promotor und die kodierende Sequenz für Luziferase enthalten. Nach Kotransfektion mit dem Vektorkonstrukt und den Fos-Vektoren konnte die MMP-9-Promotoraktivität anhand einer Luziferase-katalysierten Lichtreaktion gemessen werden. Von den Fos-Proteinen bewirkten hierbei c-Fos und Fos-B2 eine deutliche Stimulation der MMP-9-Promotoraktivität.

Des weiteren untersuchten wir den Einfluss des Phorbolesters TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) als klassischen Aktivator der AP-1-Aktivität auf die Morphologie der MCF7-Zellen sowie auf die Regulation des MMP-9-Promotors. Die Stimulation mit dem Phorbol ester führte zu einer deutlichen Änderung der Zellmorphologie mit Auflockerung der epithelialen Zellverbände und Annahme mesenchymaler Zellcharakteristika. Des weiteren führte die TPA-Stimulation der Zellen zu einer Steigerung der bereits in Abwesenheit von TPA beobachteten c-Fos- und Fos-B2-vermittelten Zunahme der MMP-9-Promotoraktivität.

Die vorausgehend beschriebenen Untersuchungen konnten zusammenfassend zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren der Fos-Familie in unterschiedlichem Ausmaß an der Regulation der Invasivität von MCF7-Mammakarzinomzellen beteiligt sind. Wie bereits in Untersuchungen an Tumormaterial und Korrelation der Expression von AP-1-Proteinen mit klinischen Daten für Mammakarzinome gezeigt werden konnte, führte auch in unseren Experimenten die Fra-1-Überexpression zu einer deutlichen Steigerung der Invasivität der MCF7-Zellen. Diese Zunahme der Invasivität, die in geringerem Maße auch nach c-fos-Transfektion nachzuweisen war, scheint offenbar unter anderem mit einer Steigerung der PAI-1-Expression in den Zellen zusammenzuhängen. Für die anderen „Invasionsmoleküle“ MMP-1, MMP-9, sowie uPAR konnten wir keinen Zusammenhang mit der Expression der Fos-Proteine nachweisen.

Interessant ist diese Steigerung der PAI-1-Expression durch Fos-Faktoren, die auch für die Invasivität von Zellen verantwortlich zu sein scheinen, auch vor dem Hintergrund, dass PAI-1 in der Therapie des Mammakarzinoms als unabhängiger prognostischer Faktor anerkannt und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Es sollten daher weitere in-vitro und in-vivo Untersuchungen zur Rolle der einzelnen Fos-Faktoren, sowie deren Tauglichkeit als prognostische Marker oder als Targets für so genannte biologische Krebstherapien erfolgen.

7. Literaturverzeichnis

Andersen H, Mahmood S, Tkach V, Cohn M, Kustikova O, Grigorian M, Berezin V, Bock E, Lukanidin E, Tulchinsky E (2002) The ability of Fos family members to produce phenotypic changes in epithelioid cells is not directly linked to their transactivation potentials. *Oncogene* 21:4843-4848

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72:1-22

Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129-157

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M (2001) Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20:2413-2423

Bamberger AM, Methner C, Lisboa BW, Stadtler C, Schulte HM, Loning T, Milde-Langosch K (1999) Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int J Cancer* 84:533-538

Bland KI, Konstadoulakis MM, Vezeridis MP, Wanebo HJ (1995) Oncogene protein co-expression. Value of Ha-ras, c-myc, c-fos, and p53 as prognostic discriminants for breast carcinoma. *Ann Surg* 221:706-718

Böcker W, Kunze KD (1997) Mamma. In: Böcker W, Denk H, Heiz Ph U (Hrsg) *Pathologie*. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore, S 157f

Brown JR, Ye H, Bronson RT, Dikkes P, Greenberg ME (1996) A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell* 86:297-309

Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Loning T, Herbst H (1999) Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 435:566-573

Brummer O, Bohmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kuhnle H (2002) MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 84:222-227

Chiappetta G, Tallini G, De Biasio MC, Pentimalli F, de Nigris F, Losito S, Fedele M, Battista S, Verde P, Santoro M, Fusco A (2000) FRA-1 expression in hyperplastic and neoplastic thyroid diseases. *Clin Cancer Res* 6:4300-4306

Garbett EA, Reed MW, Brown NJ (1999) Proteolysis in human breast and colorectal cancer. *Br J Cancer* 81:287-293

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266:443-448

Gruda MC, van Amsterdam J, Rizzo CA, Durham SK, Lira S, Bravo R (1996) Expression of FosB during mouse development: normal development of FosB knockout mice. *Oncogene* 12:2177-2185

Guberman AS, Scassa ME, Canepa ET (2005) Repression of 5-aminolevulinate synthase gene by the potent tumor promoter, TPA, involves multiple signal transduction pathways. *Arch Biochem Biophys* 436: 285-296

Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M (2004) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* 91:450-456

Hennigan RF, Hawker KL, Ozanne BW (1994) Fos-transformation activates genes associated with invasion. *Oncogene* 9:3591-3600

Hu E, Mueller E, Oliviero S, Papaioannou VE, Johnson R, Spiegelman BM (1994) Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J* 13:3094-3103

Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H (1993) Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24:195-208

Kahari VM, Saarialho-Kere U (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 31:34-45

Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-246

Krebs in Deutschland. 4.überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken 2004

Kupferman ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ (2000) Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* 157:1777-1783

Kustikova O, Kramerov D, Grigorian M, Berezin V, Bock E, Lukanidin E, Tulchinsky E (1998) Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 18:7095-7105

Lallemant D, Spyrou G, Yaniv M, Pfarr CM (1997) Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts. *Oncogene* 14:819-830

Löffler G (1999) Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 3., vollst. überarb. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Singapur Tokio

Luo Y, Zhou H, Mizutani M, Mizutani N, Reisfeld RA, Xiang R (2003) Transcription factor Fos-related antigen 1 is an effective target for a breast cancer vaccine. Proc Natl Acad Sci USA. 100:8850-8855

Luo Y, Zhou H, Mizutani M, Mizutani N, Liu C, Xiang R, Reisfeld RA (2005) A DNA vaccine targeting Fos-related antigen 1 enhanced by IL-18 induces long-lived T-cell memory against tumor recurrence. Cancer Res. 65:3419-3427

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Methner C, Rieck G, Loning T.(2000) Expression of cell cycle-regulatory proteins rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members. Int J Cancer 87:468-472

Milde-Langosch K, Kappes H, Riethdorf S, Loning T, Bamberger AM (2003) . FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 77:265-275

Milde-Langosch K, Röder H, Andritzky B, Aslan B, Hemminger G, Brinkmann A, Bamberger CM, Lönning T, Bamberger AM (2004) The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, Fos-B, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. Breast Cancer Res Treat 86:139-152

Mumberg D, Lucibello FC, Schuermann M, Muller R (1991) Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. Genes Dev 5:1212-1223

Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE (1998) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. J Pathol 185:256-261

Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE (1996) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat med* 2:461-462

Ransone LJ, Visvader J, Lamph WW, Sassone-Corsi P, Verma IM (1989) fos and jun interaction: the role of the leucine zipper. *Int J Cancer Suppl* 4:10-21

Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, Busslinger M, Beug H (1992) Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* 71:1103-1116

Rinehart-Kim J, Johnston M, Birrer M, Bos T (2000) Alterations in the gene expression profile of MCF-7 breast tumor cells in response to c-Jun. *Int J Cancer* 88:180-190

Ryseck RP, Bravo R (1991) c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6:533-542

Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, Spiegelman BM (1995) c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 82:721-732

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G, Wallwiener D (Hrsg) (2002) Gynäkologische Onkologie, Diagnostik, Therapie und Nachsorge auf der Basis der AGO-Leitlinien. Schattauer, Stuttgart New York, S109f

Smith LM, Wise SC, Hendricks DT, Sabichi AL, Bos T, Reddy P, Brown PH, Birrer MJ (1999) cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene* 18:6063-6070

Suzuki T, Murakami M, Onai N, Fukuda E, Hashimoto Y, Sonobe MH, Kameda T, Ichinose M, Miki K, Iba H (1994) Analysis of AP-1 function in cellular transformation pathways. *J Virol* 68:3527-3535

Suzuki T, Okuno H, Yoshida T, Endo T, Nishina H, Iba H (1991) Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Res* 19:5537-5542

Tavassoli FA, Devilee P (eds) (2003) World Health Organisation Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press, Lyon

Testa JE, Quigley JP (1990) The role of urokinase-type plasminogen activator in aggressive tumor cell behavior. *Cancer Metastasis Rev* 9:353-367

Tkach V, Tulchinsky E, Lukanidin E, Vinson C, Bock E, Berezin V (2003) Role of the Fos family members, c-Fos, Fra-1 and Fra-2, in the regulation of cell motility. *Oncogene* 22:5045-5054

Toi M, Ishigaki S, Tominaga T (1998) Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Res Treat* 52:113-124

Tulchinsky E (2000) Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol Histopathol* 15:921-928

Vallone D, Battista S, Pierantoni GM, Fedele M, Casalino L, Santoro M, Viglietto G, Fusco A, Verde P (1997) Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product. *EMBO J* 16:5310-5321

Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse H, Van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-536

Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF (1992) Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360:741-745

Welter JF, Eckert RL (1995) Differential expression of the Fos and Jun family members c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB and JunD during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncogene* 11:2681-2687

Wisdom R, Yen J, Rashid D, Verma IM (1992) Transformation by FosB requires a trans-activation domain missing in FosB2 that can be substituted by heterologous activation domains. *Genes Dev* 6:667-675

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2002 bis September 2003 im Institut für Gynäkopathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning durchgeführt.

Mein Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning für die rasche Vermittlung der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Karin Milde-Langosch und die Überlassung des Themas.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Karin Milde-Langosch für die exzellente wissenschaftliche und sehr herzliche Betreuung und Unterstützung sowohl bei der experimentellen Planung und Durchführung dieser Arbeit, als auch bei der kritischen Hinterfragung, Diskussion und letztlich auch Veröffentlichung der vorliegenden Ergebnisse bedanken.

Für die ausgezeichnete und geduldige Einarbeitung in die Zellkultur und die Labortechnik, für die Unterstützung und Beratung bei Problembewältigungen und für die äußerst nette Zusammenarbeit im Labor möchte ich Frau Gabriele Rieck danken. Des weiteren danke ich Frau Bianca Kelp für die Einarbeitung in spezielle Labortechniken, die Hilfe und Anregung bei Versuchsdurchführungen und die äußerst gute Unterstützung in der Zellkultur.

Mein weiterer Dank gilt Frau Doris Pankoke für ihre freundliche Hilfe und ihren unermüdlichen Einsatz bei der Auswertung der Luziferase-Assays.

Auch bei allen hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Gynäkopathologie, die zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

9. Lebenslauf

Name	Birte Katrin Andritzky
Geburtsdatum	26.02.1978
Geburtsort	Reinbek
Eltern	Dr. rer. pol. Klaus Andritzky Susanne Janausch-Andritzky, geb. Beier
Schulbildung	1984-1988 Grundschule Weststadt, Ravensburg 1988-1989 Carl-von-Ossietzky-Gymnasium, Bonn 1989-1997 Welfen-Gymnasium, Ravensburg 1997 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Studium	April 1998 - April 2005 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
Beruf	seit 01.05.2005 Assistenzärztin / wissenschaftliche Mitarbeiterin, Zentrum für Innere Medizin, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Abteilung für Onkologie und Hämatologie mit den Sektionen Knochenmarktransplantation und Pneumologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. C. Bokemeyer)

10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Birte Andritzky