

Aus dem Institut für Gynäkopathologie
der Frauenklinik des Universitätsklinikums Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Löning

**Experimentelle Untersuchung von FosB
an Mammakarzinomzelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Anja Wolters
aus Braunschweig

Hamburg, 2007

Angenommen von der medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 08.01.2008

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Löning

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. K. Milde-Langosch

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. G. Rune

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. DAS MAMMAKARZINOM	1
1.1.1. Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs.....	1
1.1.2. Klassifikation und Histologie des Mammakarzinoms.....	4
1.2. PROGNOSEFAKTOREN DES MAMMAKARZINOMS.....	5
1.2.1. Etablierte Prognosefaktoren.....	6
1.2.2. Neue Prognosefaktoren	14
1.3. DER AP-1-TRANSKRIPTIONSFAKTOR	18
1.3.1. FosB.....	26
1.4. ZELLZYKLUS UND SEINE KONTROLLE.....	28
1.4.1. CDKs und Cycline	30
1.4.2. Das Retinoblastomgen.....	32
1.5. MATRIX-METALLOPROTEINASEN.....	34
1.6. FRAGESTELLUNG UND ZIELE DIESER ARBEIT	36
2. MATERIAL UND METHODEN	38
2.1. MATERIAL	38
2.1.1. Zelllinien.....	38
2.1.2. Plasmide.....	40
2.1.3. Materialien für Zellkultur, Transfektion und Zellstimulation	43
2.1.4. Antikörper für Westernblotanalyse	44
2.1.5. Materialien für Westernblot.....	44
2.1.6. Übrige Gerätschaften	46
2.2. METHODEN.....	47
2.2.1. Zellkultur	47
2.2.2. Transfektion	48
2.2.3. Zellstimulation mit TPA und 17- β -Östradiol (E ₂)	50
2.2.4. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung	51
2.2.5. Western-Blot-Analyse.....	51
3. ERGEBNISSE	57
3.1. STIMULATION MCF7 UND MDA-MB-231 MIT TPA	57
3.1.1. AP-1-Faktoren unter Stimulation mit TPA in MCF7/MDA.....	57
3.1.2. Zellzyklusproteine unter Stimulation mit TPA in MCF7/MDA.....	58

3.1.3.	PAI-1/uPAR unter Stimulation mit TPA in MCF7/MDA	59
3.1.4.	MMPs unter Stimulation mit TPA in MCF7/MDA.....	59
3.1.5.	Ergebnisse zur Stimulation mit TPA im Überblick.....	60
3.2.	UNTERSUCHUNG VON FOSB IN MDA-MB-ZELLEN.....	61
3.2.1.	FosB-Banden im Westernblot	61
3.2.2.	Transfektion MDA-MB-231 mit FosB-Formen und c-fos.....	62
3.2.3.	Transfektion MDA-MB mit FosB (H1) und Stimulation mit TPA.....	67
3.3.	UNTERSUCHUNG VON FOS-PROTEINEN IN MCF7-ZELLEN.....	72
3.3.1.	Transfektion MCF7 mit Plasmiden für Fos-Proteine.....	72
3.4.	UNTERSUCHUNGEN ZU ER UND AP-1-FAKTOREN IN MDA-MB.....	74
3.4.1.	Transfektion MDA-MB mit ER.....	74
3.4.2.	Transfektion MDA-MB mit ER und Stimulation mit E ₂	76
4.	DISKUSSION.....	78
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	94
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
7.	DANKSAGUNG.....	105
8.	LEBENS LAUF.....	106

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: ER α und ER β 9

Abbildung 2: ER-vermittelte Gentranskription..... 11

Abbildung 3: Malignität und Tumorausbreitung beim Mammakarzinom 14

Abbildung 4: uPA-System 17

Abbildung 5: Leucin-Zipper..... 19

Abbildung 6: Struktur und Organisation der Fos- und Jun-Proteine 20

Abbildung 7: Zellzyklus..... 29

Abbildung 8: Zellzyklus, CDK's und Cycline..... 31

Abbildung 9: Rb im Zellzyklus 33

Abbildung 10: Allgemeine Struktur von MMPs 35

Abbildung 11: Wachstumsmuster der MDA-MB-231-Zelllinie 38

Abbildung 12: Wachstumsmuster der MCF-7-Zelllinie 39

Abbildung 13: Transfektion nach dem Lipofectamin-Protokoll..... 49

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Westernblot-Gelkammer 52

Abbildung 15: AP-1-Faktoren unter TPA-Stimulation in MCF7/MDA..... 57

Abbildung 16: Zellzyklusproteine unter TPA-Stimulation in MCF7/MDA..... 58

Abbildung 17: PAI-1/uPAR unter TPA-Stimulation in MCF7/MDA 59

Abbildung 18: MMPs unter TPA-Stimulation in MCF7/MDA 59

Abbildung 19: Spezifische FosB-Banden (Blocking-Peptid-Versuch)..... 61

Abbildung 20: Transfektion MDA-MB mit FosB-Formen und c-fos 62

Abbildung 21: FosB und Zellzyklusregulatoren in MDA-MB-231 63

Abbildung 22: FosB und Hormonrezeptoren in MDA-MB-231 64

Abbildung 23: FosB und PAI-1/uPAR in MDA-MB-231 65

Abbildung 24: FosB und Matrix-Metalloproteinasen in MDA-MB-231 65

Abbildung 25: FosB und AP-1-Faktoren in MDA-MB-231 66

Abbildung 26: Transfektion MDA mit FosB und Stimulation mit TPA 67

Abbildung 27: FosB und Zellzyklusregulatoren (Stimulation mit TPA) 67

Abbildung 28: FosB und Hormonrezeptoren (Stimulation mit TPA)..... 68

Abbildung 29: FosB und PAI-1/uPAR (Stimulation mit TPA)..... 69

Abbildung 30: FosB und MMPs (Stimulation mit TPA)..... 70

Abbildung 31: FosB und AP-1-Faktoren (Stimulation mit TPA) 70

Abbildung 32: Transfektion MCF7 mit Fos-Proteinen 72

Abbildung 33: Fos-Proteinen und MMPs, PAI-1, Rb in MCF7-Zelllinien 73

Abbildung 34: Transfektion MDA mit ER 74

Abbildung 35: ER und AP-1-Faktoren..... 75

Abbildung 36: Transfektion MDA mit ER und Stimulation mit E₂..... 76

Abbildung 37: ER und AP-1-Faktoren (Stimulation mit E₂)..... 76

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs [Russo 2004]..... 3

Tabelle 2: Etablierte und neue Prognosefaktoren..... 5

Tabelle 3: Prognose bei Befall der axillären LK 6

Tabelle 4: Tumorgösse und 5-JÜR ohne axillären LK-Befall 7

Tabelle 5: ER- und PR-Status und deren Verteilung beim Mammakarzinom 9

Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnung 44

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenngels (30 ml) 53

Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammelgels (12,5 ml)..... 53

Tabelle 9: Expressionsveränderung unter TPA-Stimulation..... 60

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
AA/Bis-AA	Acrylamide/Bis-Acrylamide
Abb.	Abbildung
A.d.	Aqua destillans
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
allg.	allgemein
Anm.	Anmerkung
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
BCA	bicinchoninic acid
bes.	besonders
bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.	der, des
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
d.h.	das heisst
d.i.	das ist
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E ₂	17-β-Östradiol (= Östrogen)
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i>)
ER	Östrogenrezeptor
ERICA	engl. <i>Estrogen-Receptor-Immun-Cytochemical-Assay</i>
ERK	Extrazellulär-regulierte Kinase
evtl.	eventuell
f.	folgende Seite
ff.	folgende Seiten

g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HCl	Summenformel für Salzsäure
i.a.	im allgemeinen
IGF-I	insulinähnlicher Wachstumsfaktor I ("insulin-like growth factor I")
<i>in vitro</i>	„im Glas“ (lateinisch: vitrum, i, n. das Glas)
<i>in vivo</i>	„im Lebenden“ (lateinisch: vivum, i, n. das Lebendige)
insbes.	insbesondere
i.S.	im Sinne
JNK	Jun-N-terminale-Kinase
JÜR	Jahresüberlebensrate
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
Min.	Minute
Mio.	Millionen
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	mitochondrale RNA
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i>)
ml	Milliliter
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
pcsb	Probenpuffer
PKC	Proteinkinase C
PR	Progesteronrezeptor
PRICA	engl. <i>Progesteron-Receptor-Immun-Cytochemical-Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRE	Serum-Antwort-Element (engl. <i>serum response element</i>)
sog.	so genannt
TAD	transaktivierende Domäne
TEMED	N N N'N' Tetramethylethyldiamin

TF	Transfektion
TRE	TPA-Antwort Element (engl. <i>TPA response element</i>)
u.	und
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliches
ÜLR	Überlebensrate
u.v.m.	und vieles mehr
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1. EINLEITUNG

1.1. Das Mammakarzinom

1.1.1. Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs

Etwa jede zehnte Frau entwickelt im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom.¹ Von den bösartigen Neubildungen der Frau entfallen ca. 25 % auf das Mammakarzinom bei jährlich 110 Neuerkrankungen pro 100 000 Frauen. Trotz bemerkenswerter Fortschritte in der Vorsorge, Früherkennung und Behandlung von Brustkrebs ist die Mortalität für diese bösartige Neubildung über die letzten 50 Jahre nahezu unverändert geblieben.²

Die Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken, nimmt mit fortschreitendem Lebensalter zu. Es sind aber auch zunehmend junge Frauen betroffen. Die Morbiditätsrate ist ansteigend. In der westlichen Welt ist in der Altersgruppe der 35- bis 55-jährigen Frauen das Mammakarzinom die häufigste Todesursache.¹ Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist unbekannt. Endogene Faktoren scheinen ebenso eine Rolle zu spielen wie exogene Einflüsse. So erhöht sich das Risiko für eine Erkrankung bei familiärer Belastung (Aufreten eines Mammakarzinoms bei Mutter oder Schwester, d.h. bei Verwandten ersten Grades) um den Faktor zwei bis neun für die betreffende Frau.¹

Das Brustkrebsrisiko ist bei Nullipara und bei späten Primipara um das zwei- bis dreifache gesteigert und um das ein- bis zweifache bei Frauen mit früher Menarche und später Menopause, welche einem längerdauernden Östrogeneinfluss ausgesetzt sind. Diese Vorgänge unterliegen einer direkten Kontrolle der Ovarien.³ Eine zentrale Rolle der Ovarien bei der Entstehung von Brustkrebs wird aus der Tatsache abgeleitet, dass eine chirurgische oder hormonelle Ausschaltung der Ovarfunktion einen Rückgang der Inzidenz von Brustkrebs bei diesen Frauen gezeigt hat.⁴

Geographische Unterschiede in der Inzidenz des Mammakarzinoms lassen sich möglicherweise auf unterschiedlichen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten zurückführen. Vor allem im Hinblick auf ein erhöhtes Auftreten von Brustkrebs in der westlichen Welt im Vergleich zu asiatischen Ländern wurde der Einfluss von Ernährungsgewohnheiten diskutiert. Das Verhältnis der Neuerkrankungen zwischen Europäerinnen und Japanerinnen beträgt 6:1. Die Inzidenzrate der in den USA lebenden Japanerinnen ist jedoch deutlich erhöht und ihrer dort geborenen Töchter wiederum noch höher. Eine erhöhte

¹ Vgl. *Stauber, Weyerstahl*, Gynäkologie und Geburtshilfe, Thieme 2001, S.366 ff.

² Vgl. *Jemal et al.*, Cancer Statistics, 53: 5-26, 2003.

³ Vgl. *Russo, Russo*, Molecular Basis of Breast Cancer, Springer 2004, S. 1 ff. u. S. 317 ff.

⁴ Vgl. *Meiser et al.*, Attitudes toward prophylactic oophorectomy and screening utilization in women at increased risk of developing hereditary breast/ovarian cancer. Gynecol. Oncol., 75: 122-129, 1999.

Aufnahme von Fett über die Nahrung ist mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert im Vergleich zu Frauen, die sich überwiegend vegetarisch ernährten.⁵

Regionale Unterschiede beim Auftreten von Brustkrebserkrankungen scheinen sich durch eine unterschiedliche Prävalenz von Risikofaktoren erklären. So steht eine erhöhte Rate für Brustkrebserkrankungen bei Frauen in städtischen Gebieten oder wohlhabenden Regionen wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer verminderten Geburtenzahl, einem höheren Alter bei Erstgeburten, einer kurzen Stillzeit, einem postmenopausalen Übergewicht und einem erhöhten Alkoholkonsum.⁶

Nur bei wenigen Patientinnen lässt sich eine genetische Veränderung des Erbguts als Ursache der Erkrankung direkt nachweisen. Etwa 5 % aller Mammakarzinome folgen einem autosomal-dominanten Erbgang. Davon zeigen ca. 50 % Mutationen in den zwei Tumorsuppressorgenen BRCA-1 (engl. **BR**east **C**Ancer) auf Chromosom 17q und BRCA-2 auf Chromosom 13q. Indirekte Untersuchungen belegen, dass es noch weitere dominant vererbte Brustkrebsgene geben muss, die in nur wenigen Familien verändert sind. Weniger als 1 % der Mammakarzinome lassen sich auf Veränderungen anderer Tumorsuszeptibilitätsgene (z.B. p53, PTEN-Gen (Cowden-Syndrom), ATM (Ataxia teleangiectatica) etc.) zurückführen.⁷

Zusätzliche Risikofaktoren sind chemischer, physikalischer und biologischer Natur. Dazu zählt die Exposition gegenüber Karzinogenen (z.B. bei aktiven oder passiven Raucherinnen) und ionisierender Strahlung.

Diese epidemiologischen und genetischen Risikofaktoren erklären jedoch lediglich ein Drittel aller Brustkrebsfälle. Bis heute sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und der Stellenwert jedes einzelnen dieser Risikofaktoren bei der Entwicklung eines Mammakarzinoms nicht vollständig verstanden. Das Auftreten und Entstehen von Brustkrebs resultiert aus einer komplexen Karzinogenese bestehend aus unkontrollierter Zellproliferation im Zusammenspiel mit einem fehlerhaften programmierten Zelltod als Konsequenz aus akkumulierten Schäden in der Erbsubstanz, welche zu einer Aktivierung von Protoonkogenen und einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen.⁸

⁵ Vgl. *Freudenheim et al.*, Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits and related nutrients. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 340-348, 1996.

⁶ Vgl. *Clarke et al.*, Breast cancer incidence and mortality trends in an affluent population. *Breast Cancer Res.* 4: R13, 2002.

⁷ Vgl. *Straub et al.*, Hereditäres Mammakarzinom. Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, Zuckerschwerdt, 2004.

⁸ Vgl. *Russo, Russo*, Molecular Basis of Breast Cancer, Springer 2004, S. 1 ff. u. S. 317 ff.

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs [Russo 2004]

Risikofaktoren	Eigenschaften	Risikoerhöhung
Genetisch	Nachweis von BRCA1- oder BRCA2-Mutationen	≥ 4.0
	Nachweis von p53-Mutation (in Li-Fraumeni-Syndrom)	≥ 4.0
	Nachweis von PTEN/MMEC1 (im Cowden-Syndrom)	≥ 4.0
	Heterozygot für mutierte Allele vom ATM-Gen	≥ 4.0
	Prämenop. Brustkrebs bei Mutter und Schwester	≥ 4.0
	Prämenop. Brustkrebs bei Mutter oder Schwester	2.0 - 4.0
	Postmenop. Brustkrebs bei Verwandten 3. Grades	≤ 2.0
	Postmenop. Brustkrebs bei Verwandten 1. Grades	2.0 - 4.0
	Mammakarzinom der anderen Seite	2.0 - 4.0
	Zusätzliches Ovarial- oder Endometriumkarzinom	≤ 2.0
Klinisch	Atypische Hyperplasie in Biopsat oder Aspiration	≥ 4.0
	Duktales oder lobuläres Carcinoma in situ	≥ 4.0
	Typische Hyperplasie in Biopsat oder Aspiration	2.0 - 4.0
	Langer Gebrauch oraler Kontrazeptiva (< 45. LJ)	≤ 2.0
	Lange Östrogensersatztherapie	≤ 2.0
Biologisch	Fortgeschrittenes Alter	2.0 - 4.0
	Frühe Menarche (< 12. LJ)	≤ 2.0
	Späte Primipara (> 30. LJ)	≤ 2.0
	Nullipara (< 40. LJ)	≤ 2.0
	Kurze Stillperiode	≤ 2.0
	Späte Menopause (nach dem 49. LJ)	≤ 2.0
	Postmenopausales Übergewicht	≤ 2.0
Sozial	Rauchen	2.0 - 4.0
	Hoher sozioökonomischer Status	≤ 2.0
	Reduzierte körperliche Aktivität	≤ 2.0
Ernährung	Hoher Alkoholkonsum	≤ 2.0
	Hohe Fettaufnahme	≤ 2.0
Umgebung	Bestrahlung des Thoraxes oder der Brust	≤ 2.0
	Exposition gegenüber chemische Karzinogenen	≤ 2.0

Die grosse Herausforderung stellt die multifaktorielle Genese von Brustkrebs dar. Es wird grundsätzlich angenommen, dass ein veränderter Genotyp einer einzelnen Zelle ausreicht, um in ein unkontrolliertes Wachstum dieser Zelle zu münden. Diese maligne Transformation und Expression erfordert jedoch zusätzliche genetische oder epigeneti-

sche Ereignisse.⁹ Nicht jede Frau mit einer Mutation im BRCA1-Gen erkrankt an Brustkrebs. Es besteht also ein kompliziertes Zusammenspiel von vererbten (genetischen) und erworbenen (somatischen) Mutationen und deren Stellenwert in der Karzinogenese einer Brustzelle.

1.1.2. Klassifikation und Histologie des Mammakarzinoms¹⁰

Das Mammakarzinom ist ein invasiv wachsender, epithelialer Tumor, der seinen Ausgang von *in-situ*-Karzinomen nimmt. Er metastasiert lymphogen und hämatogen. Etwa 30-50 % der Frauen mit einem Mammakarzinom sterben an diesem Tumor.

Das invasiv-lobuläre und das invasiv-duktales Mammakarzinom machen mehr als 90 % aller Mammakarzinome aus. Die beiden morphologisch fassbaren Vorstufen (Präkanzerosen) des Mammakarzinoms werden als duktales (DCIS) und lobuläres *Carcinoma in situ* (CLIS) bezeichnet. *In-situ*-Karzinome machen 5-10 % aller Mammakarzinome aus, von denen 70 % dem DCIS und 30 % dem CLIS zuzuordnen sind. *Carcinoma in situ* (CIS) sind obligate Präkanzerosen und zeigen sich radiologisch in Form von Mikroverkalkungen und klinisch als tastbare Knoten. Die Mehrzahl der Karzinome entsteht im Bereich der TDLE (terminalen duktulo-lobulären Einheit). Die Prädeliktionsstelle für die Krebsentstehung liegt somit in den proliferationsaktiven Parenchymanteilen.

70-80 % der invasiven duktales Mammakarzinome sind nicht weiter spezifizierbar (engl. *not otherwise specified* – NOS) und damit der häufigste Tumortyp.

Lobuläres Karzinom:

- ▶ *in situ* (CLIS)
- ▶ invasiv-lobuläres Mammakarzinom (ca. 10-20 %)

Duktales Karzinom:

- ▶ *in situ* (DCIS, Sonderform: Morbus Paget der Mamille)
- ▶ invasiv-duktales Mammakarzinom
 - *not otherwise specified* (NOS, ca. 80 %)
 - medulläres Karzinom (< 1 %)
 - Gallertkarzinom (2 %)
 - Tubuläres Karzinom (1-2 %)
 - Papilläres Karzinom (< 1 %)
 - Morbus Paget der Mamille mit invasivem, duktalem Karzinom

Das Mammakarzinom befindet sich am häufigsten einseitig im oberen äusseren Quadranten (ca. 55 %) der Brustdrüse. Es folgen mit etwa gleicher Häufigkeit der obere in-

⁹ Vgl. *Stauber, Weyerstahl, Gynäkologie und Geburtshilfe*, Thieme 2001, S.366 ff.

¹⁰ Vgl. *Böcker, Pathologie*, Urban & Schwarzenberg 1997.

neren Quadrant und die retroareoläre Region (jeweils ca. 15 %). Der untere äussere Quadrant ist in ca. 10 % der Fälle betroffen. Die Metastasierung kann bereits früh erfolgen. Eine 5 mm große Geschwulst zeigt in ca. 10 %, eine 20 mm große in 50 % der Fälle eine Fernmetastasierung. Es besteht also eine direkte Beziehung zwischen der Grösse des Primärtumors und seiner metastatische Ausbreitung über die Lymph- und Blutbahnen.¹¹

1.2. Prognosefaktoren des Mammakarzinoms

Prognostische Faktoren lassen erkennen, mit welcher Wahrscheinlichkeit mit einem späteren Wiederauftreten der Erkrankung (Rezidiv, Metastasierung) oder dem Tod durch die Erkrankung zu rechnen ist. Zum Zeitpunkt der Primärerkrankung können sie über die Aggressivität des Tumors und damit über das Risiko für ein Wiederauftreten oder Tod durch die Tumorerkrankung in der Zukunft informieren. Unter prädiktiven Faktoren versteht man dagegen therapierelevante Faktoren, die eine Resistenz oder Sensitivität des Tumors auf eine jeweilige Therapie anzeigen können. Der ideale Prognosefaktor würde alle Patientinnen mit einem späten Rezidiv definieren und dadurch indirekt die Patientinnen charakterisieren, die durch eine Primäroperation alleine bereits geheilt sind. Den Frauen mit einer hervorragenden Langzeitprognose (< 10 % Rezidivrisiko in 10 Jahren) könnte z.B. eine zytotoxische Chemotherapie erspart bleiben. Heute werden die sog. etablierten Prognosefaktoren von den neuen, meist tumorbiologisch begründeten Prognosefaktoren abgegrenzt.

Tabelle 2: Etablierte und neue Prognosefaktoren¹²

Etablierte Prognosefaktoren	Neue (tumorbiologische) Prognosefaktoren
TNM-Status: Tumorgrösse (maximaler Durchmesser); Axillärer Lymphknotenbefall (Zahl)	Proliferation und Ploidie: S-Phasen, Ploidie; Ki-67-Antigen (MIB-1); Thymidin-Labeling-Index; EGF-Rezeptor
Morphologie: Grading, Histologischer Typ, Vaskuläre Invasion	Onkogene/Tumorsuppressorgene: HER-2/neu-Onkoprotein, p53, myc
Steroidhormonrezeptoren: Östrogen-, Progesteronrezeptor	Invasion und Metastasierung: Tumorassozierte Proteasen, uPA, PAI-1, Kathepsine und deren Inhibitoren, MMPs, TIMPs, Adhäsionsmoleküle (Integrine, CD 44 u.a.)

¹¹ Vgl. *Stauber, Weyerstahl*, Gynäkologie und Geburtshilfe, Thieme 2001, S.366 ff.

¹² Aus: *Management des Mammakarzinoms*, Springer, 2002

1.2.1. Etablierte Prognosefaktoren

1.2.1.1 Lymphknotenstatus

Das Mammakarzinom metastasiert lymphogen in die regionären Lymphknoten (LK) der ipsilateralen Axilla. Das Vorhandensein oder Fehlen axillarer Lymphknotenmetastasen ist gegenwärtig der zuverlässigste morphologische Parameter für die Prognose. Der Lymphknotenstatus dient als Indikator für eine stattgefundenen Fernmetastasierung und hat große Bedeutung bei der Therapieplanung.¹³

Ein Viertel der Lymphdrainage aller Quadranten der Brust erfolgt in die vorgeschalteten brustdrüsenkörpereigenen Lymphknoten (engl. *internal mammary (IM) nodes*).¹⁴ Sind die Lymphknoten der Axilla tumorfrei, so liegen in nur ca. 5 % der Fälle Lymphknotenmetastasen in den inneren Brustdrüsenlymphknoten vor. Aus diesem Grund wurde das chirurgische Vorgehen einer radikalen Mastektomie bei negativem Lymphknotenstatus der Axilla zu Gunsten einer brusterhaltenen Operation verlassen. Die Signifikanz histologisch gesicherter Mikrometastasen ($\leq 0,2$ cm) ist noch nicht geklärt.

Die Anzahl der positiven regionären Lymphknoten (LK) in der Axilla ist der signifikanteste Prognosefaktor:

Tabelle 3: Prognose bei Befall der axillären LK¹⁵

Anzahl befallener LK	Tumorrezidiv im 5. Jahr
0	~ 10%
1 – 3	15 –20%
4 - 10	30 - 40%
> 11	~ 50% und mehr

1.2.1.2 Tumorgröße

Die Tumorgröße korreliert mit der Anzahl der befallenen LK und bestimmt dadurch die Prognose der Patientin.¹⁶ Bei nodalpositiven Patientinnen wird die prognostische Aussagekraft der Tumorgröße vom LK-Befall überdeckt, d.h. das Risiko für Rezidiv und Tod wird deutlicher durch den LK-Befall angezeigt. Nodalnegative Patientinnen mit einer Primärtumorgröße von < 1 cm haben eine exzellente Prognose. Bei nodalnega-tiven Patientinnen mit Tumoren > 1 cm hat die Grösse keinen sehr deutlichen Einfluss

¹³ Vgl. Böcker, Pathologie, Urban & Schwarzenberg 1997, S. 865 ff.

¹⁴ Vgl. Morrow M., Arch Surg 116: 748-751, 1981.

¹⁵ Vgl. Hayes et al., 1993 Pharmacoeconomics. 1993 Sep;4(3):226-8. Breast cancer: clinical decision making. Hayes JD, Clark EJ. The Nexus Group, Nutley, NJ 07110.

¹⁶ Vgl. Carter C.L. et al. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer. 1989 Jan 1;63(1):181-7. 989.

auf die Prognose. Bei fehlendem Befall axillärer LK scheint somit die Tumorgrösse eher Ausdruck des chronologischen Alters des Tumors als Zeichen seiner Aggressivität zu sein. Man kann spekulieren, dass Tumore, die eine gewisse Grösse überschreiten ohne die axillären LK zu involvieren, ein relativ niedriges metastatisches Potential haben dürften.¹⁷

Tabelle 4: Tumorgrösse und 5-JÜR ohne axillären LK-Befall¹⁸

Tumorgrösse [cm]	Zahl der Patientinnen [n]	5-Jahresüberlebensrate [%]
< 0,5	269	99,2
0,5-0,9	791	98,3
1,0-1,9	4668	92,3
2,0-2,9	4010	90,6
3,0-3,9	2072	86,2
4,0-4,9	845	84,6
5,0 und >	809	82,2

1.2.1.3 Grading

Das Grading berücksichtigt die Histopathologie des Tumors und leitet daraus eine prospektive Abschätzung des Tumorverhaltens ab. Das heute gebräuchliche Gradingssystem umfasst drei aufsteigende Malignitätsgrade (Grad 1–3) und bezieht zudem Drüsenbildung, Kernatypien und die Zahl der Mitosen des Tumorgewebes in die Beurteilung mit ein. Höhere Malignitätsgrade sind mit einer höheren Rezidivrate, Metastasenrate und damit mit einer schlechteren Prognose verbunden.¹⁹

1.2.1.4 Hormonrezeptorstatus

Die Brustdrüse ist ihrer Natur nach ein hormonbeeinflusstes Organ. Ihre Entwicklung und ihr Wachstum wird beeinflusst von einer Vielzahl von Hormonen. Die Stimuli münden in unterschiedlichen Antworten in Bezug auf Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod. Unter den verschiedenen Hormonen spielen Östrogene und Progesterone die entscheidende Rolle; sie wirken wachstumsstimulierend, sowohl auf die normalen als auch auf die Karzinomzellen des Brustdrüsengewebes.²⁰

Trotz anfänglich widersprüchlicher Ergebnisse zeigten spätere Studien mehrheitlich die unabhängige prognostische Bedeutung des Östrogen- und Progesteronrezeptors. Es

¹⁷ Vgl. Rosen PP., Journal Clin. Oncology 11: 2090-2100, 1993.

¹⁸ Vgl. Clark and McGuire, 1988.

¹⁹ Vgl. Böcker, Pathologie, Urban & Schwarzenberg 1997, S. 866 ff.

²⁰ Vgl. Russo J., Russo I.H., Role of hormones in cancer initiation and progression, Biological Neoplasia 3: 49-61, 1998.

wurde eine längere Gesamtüberlebenszeit bei positivem Hormonrezeptorstatus nachgewiesen. Hierbei scheint der prognostische Aussagewert bei prämenopausalen Pat. ausgeprägter als bei postmenopausalen. Nach dem Auftreten einer Metastasierung ist der Hormonrezeptorstatus des Primärtumors einer der stärksten Prognosefaktoren für die Dauer der rezidivfreien Überlebenszeit. Möglicherweise hängt dies mit dem besseren Ansprechen auf palliative endokrine Therapiemassnahmen zusammen.²¹

Zwei Drittel der Brustkrebsfälle betrifft Frauen in der Postmenopause. Davon sind zwei Drittel der Tumore ER-positiv (engl. *estrogen receptor*) und wiederum etwa zwei Drittel dieser Tumore sprechen auf eine endokrine Therapie an. Daher wird beim Vorliegen eines Mammakarzinoms stets dessen Rezeptorgehalt bestimmt. Aus Brustkrebsbiopsien wird neben dem ER-Status auch der PR-Status (engl. *progesterone receptor*) erhoben, weil die Expression von PR durch Östrogenstimulation über ER induziert wird.²² Somit lässt sich aus der Anwesenheit beider Rezeptoren ein funktionstüchtiger ER ableiten. Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe biochemischer und immunhistochemischer Methoden. Die Expression kann auf Protein- oder mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Im klinischen Alltag erfolgt die Proteinbestimmung v.a. durch Immunhistochemie (ERICA/PRICA, engl. *Estrogen/Progesterone-Receptor-Immun-Cytochemical-Assay*). In beiden Verfahren wird die Expression des Rezeptors quantitativ bestimmt. Die Angabe erfolgt in Femtomol pro Milligramm Zytosolprotein. Die Methode lässt jedoch keine Aussage über den zellulären Ursprungsort des Rezeptors zu, d.h. zu welchem Anteil die bestimmte Menge an Rezeptor aus gesunden oder aus maligne transformierten epithelialen Zellen stammt. Hinweise hierzu liefert die immunhistochemische Bestimmung.²³

Nach endokriner Therapie (Anti-Östrogene = Tamoxifen®, Oophorektomie) liegt die Regression bei Östrogen-positiven Karzinomen bei ca. 70 %, bei Östrogen-negativen Karzinomen bei ca. 5 %. Die höchste Ansprechraten haben Östrogen- und Progesteron- positive Karzinome.²⁴

²¹ Vgl. Clark G.M. et al., Steroid receptors and other prognostic factors in breast cancer; Semin. Oncol. 15 (1988) 15: 20.

²² Vgl. Horwitz K.B. et al., Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. J. Biol. Chem. 1978; 253:2223-2228.

²³ Vgl. Furmanski P. et al., The prognostic value of estrogen receptor determinations in patients with primary breast cancer, Cancer 1980; 46: 2794-2796.

²⁴ Vgl. Böcker, Pathologie, Urban & Schwarzenberg 1997, S. 866 ff.

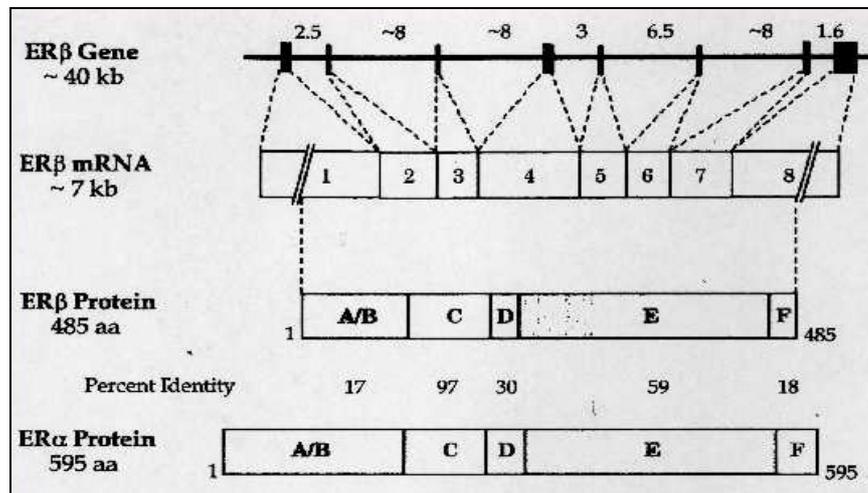
Tabelle 5: ER- und PR-Status und deren Verteilung beim Mammakarzinom²⁵

Rezeptorstatus	Prozentuale Verteilung
ER-positiv, PR-positiv	55 %
ER-positiv, PR-negativ	20 %
ER-negativ, PR-positiv	5 %
ER-negativ, PR-negativ	20 %

Der Östrogenrezeptor (ER)

Der Östrogenrezeptor (engl. *estrogen receptor*) ist ein nukleärer Rezeptor. Nachdem 1996 ein zweites ER-Gen identifiziert und auf Chromosom 14q22-24 lokalisiert worden war, wurde dieses als ERβ bezeichnet. Der bekannte Rezeptor erhielt die Bezeichnung ERα. Das ERα-Gen ist auf Chromosom 6q25.1 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit dem Molekulargewicht von 66 kD. Beide ER-Gene zeigen eine ähnliche funktionelle Organisation. Es existieren sechs Regionen unterschiedlicher Homologie (A-F), wobei die Regionen C und E hochkonserviert sind (s. Abb. 1).²⁶

Abbildung 1: ERα und ERβ



Die N-terminale A/B-Region enthält eine Liganden-unabhängige transaktivierende Funktion (AF-1), welche für eine maximale ER-Wirkung notwendig ist. Die Region C ist durch eine Helix-Loop-Helix-Struktur charakterisiert und enthält eine DNA-Bindungsdomäne für die spezifische Interaktion mit Zielgenen. Die Scharnierregion D besitzt nukleäre Ortssignale und E und F sind verantwortlich für die Vermittlung der Liganden-abhängigen transaktivierenden Wirkung von ER.²⁷ Die DNA-

²⁵ Vgl. Ferno M. et al., ER and PR analyses in more than 4000 human breast can-cer samples, Acta Oncology 1990; 29: 129-135.

²⁶ Vgl. Krust A. et al., The chicken ER sequence: homology with v-erbA and the human ER und GR. EMBO J. 1986,5:891-897.

²⁷ Vgl. Kumar V. et al., Localisation of the E2-binding and putative DNA-bindg. domains of the hum. ER. EMBO J. 1986,5:2231-6.

Bindungsdomänen von ER α und ER β unterscheiden sich in nur 2 Aminosäuren und sind somit zu 97% identisch. Diese Domäne ist zu einem hohen Anteil konserviert und erlaubt eine Bindung an EREs sowohl in Form von ER β / β -Homodimeren als auch von ER α /ER β -Heterodimeren.²⁸

Die Bedeutung, Regulation und gegenseitige Beeinflussung beider Rezeptoren, v.a. der Stellenwert von ER β , ist noch nicht vollständig verstanden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass in gesundem Gewebe die Expression von ER β prädominant ist und die meisten Brustkrebstumore ER α exprimieren, entweder allein oder zusammen mit ER β . Eine Koexpression beider Rezeptortypen korrelierte im Brustkrebsgewebe von Patientinnen mit einem positiven LK-Status und einem höheren Grading und war somit mit einer schlechteren Prognose verbunden.²⁹

Die Wirkung des Östrogens (17- β -Östradiol = E₂) erfolgt über drei bisher bekannte Signalwege: Auf dem klassischen Weg schliessen sich zwei ER-Liganden zu einem Homodimer zusammen und münden in der Transkription von Zielgenen, welche EREs (engl. *estrogen response elements*) aufweisen (s. Abb. 2 „A“).³⁰ Das ER-Protein induziert Gentranskription vornehmlich über zwei AS-Regionen, AF-1 (engl. *activation function*) und AF-2. AF-1 liegt in der N-terminalen Region des Proteins und ist hormonunabhängig aktiv, wohingegen AF-2 in der Region E die Bindung von E₂ erfordert. Die Wirkung von AF-1 und AF-2 variiert in Abhängigkeit vom Promotor und Zelltyp. In manchen Zellen ist die Aktivität beider Stellen für einen ungestörten Transkriptionsvorgang erforderlich.³¹

Östrogen moduliert Genexpression über einen zweiten Mechanismus, bei welchem ER mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert. Dieser Prozess wird auch als *crosstalk* von Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Dabei stabilisiert ER die DNA-Bindung anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1³², den nukleären Faktor κ B (NF κ B)³³ und Sp-1³⁴ oder rekrutiert Koaktivatoren für diesen Komplex (s. Abb. 2 „B“). Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass ein konstruierter ER α mit fehlender DNA-Bindungsdomäne trotzdem AP-1-Aktivität modulieren konnte.³⁵ Blockade von AP-1-Faktoren zeigte zudem

²⁸ Vgl. Cowley S.M., Hoare S, ER alpha and beta form heterodimers on DNA. J. Biolog. Chemie, 1997; 272:19858-19862.

²⁹ Vgl. Speirs V., Parkes A.T., Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: Poor prognostic factors in human breast cancer. Cancer Research, 1999; 59:525-528.

³⁰ Vgl. Soto A.M., Cell proliferation of estrogen sensitive cells, Endocrine Review 48: 52-58, 1987.

³¹ Vgl. Tora et al., The human ER has two transcriptional AFs. Cell 1989; 59:477-487.

³² Vgl. Kushner P.J et al., 2000 ER pathways to AP-1. J Steroid Biochem Mol Biol 74:311-317.

³³ Vgl. Stein B, Yang MX, 1995 Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . Mol Cell Biol 15:4971-4979.

³⁴ Vgl. Safe S., 2001 Transcriptional activation of genes by 17 β -estradiol through ER-Sp1 interactions. Vitam Horm 62:231-252

³⁵ Vgl. Jakacka M. et al., 2001 Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical API pathway. J Biol Chem 276:13615-13621.

eine Hemmung Östrogen-vermittelten Wachstums von Mammakarzinom-Zelllinien über eine bis dahin unklare Interaktion.³⁶

Der dritte Mechanismus wird als nichtgenomischer Signalweg bezeichnet: Dabei bindet Östrogen an einen ausserhalb des Zellkerns lokalisierten ER. Dieser zytoplasmatisch gelegene oder membranständige ER vermittelt Signalübertragung im Zytosol der Zelle. Über diesen Weg kann Östrogen die MAP-Kinase aktivieren oder andere Signalwege induzieren, die in einer gesteigerten Aktivität von Proteinkinase C und Proteinkinase A münden.^{37,38} Dies hat eine Aktivierung oder Hemmung sämtlicher abwärts von diesen Kinasen beeinflussten Gene zur Folge. Über ERK kann somit auch wieder AP-1-Aktivität reguliert werden, ohne dass ER vorher an DNA oder einen Transkriptionskomplex binden musste.³⁹

Abbildung 2: ER-vermittelte Gentranskription

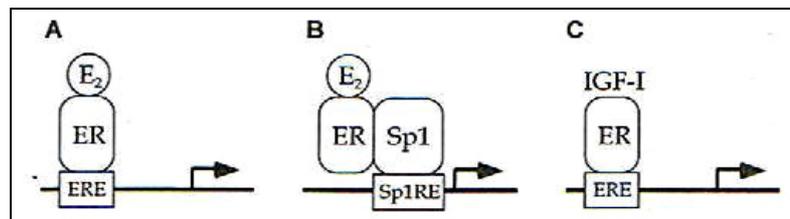


Abb. 2 zeigt den klassischen Weg der Transkription, in welcher E_2 im Komplex mit ER an ERE bindet (A), den ERE-unabhängigen Weg, bei welchem ER über einen anderen Transkriptionsfaktor (hier: Sp1) mit dem Zielgen (hier: Sp1RE) interagiert (B) und den E_2 -unabhängigen Weg (C). Bei der Möglichkeit C wird ER durch Phosphorylierung (z.B. durch eine Proteinkinase oder einen Wachstumsfaktor wie IGF-I) unter Abwesenheit von E_2 aktiviert als ein weiteres Beispiel für das Zusammenspiel zwischen Signaltransduktion und Steroidrezeptor-vermittelter Transkription (engl. *crossstalk*).

ER interagiert mit dem AP-1-Transkriptionsfaktor. Ein Beispiel ist das Ovalbumin-Gen, dessen Expression von E_2 verwaltet wird. Sein proximaler Promotor unterscheidet sich lediglich in einem Nukleotid von der DNA-Bindungsdomäne TRE für AP-1.⁴⁰

Transkriptionsversuche zeigten einen synergistischen Effekt für c-Jun, c-Fos und ER am Ovalbumin-Promotor.⁴¹ Weitere Beispiele für die Kooperation von ER und AP-1-

³⁶ Vgl. Liu Y. et al., 2002 Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene* 21:7680–7689.

³⁷ Vgl. Tesarik J. et al., 1995 Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1438–1443.

³⁸ Vgl. Levin ER, 1999 Cellular functions of the plasma membrane ER. *Trends Endo. Metab* 10:374–377.

³⁹ Vgl. Morton S. et al., 2003 A reinvestigation of the multisite phosphorylation of c-Jun. *EMBO J* 22:3876–3886.

⁴⁰ Vgl. Lee W. et al., AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 1987; 49:741–752.

⁴¹ Vgl. Gaub M.P. et al., Activation of the ovalbumin gene by the ER involves the Fos-Jun complex. *Cell* 1990; 63:1267–1276.

Faktoren sind für die Regulation von c-Fos⁴², Kollagenase⁴³ und IGF-I-Genen⁴⁴ gefunden worden. ER kann zudem stressinduzierte AP-1-Aktivität hemmen, indem es in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom-Zelllinien phosphoryliertes c-Jun bindet.⁴⁵

Webb *et al.*⁴⁶ erhoben nach weiteren Untersuchungen von Östrogen-induzierbaren Genen den Vorschlag für zwei alternative AP-1-Signalwege durch ER. Bei dem ersten Weg, AP-1 α , erfolgt die ER-Interaktion mit einem unbekanntem Zielprotein und aktiviert nachfolgend eine Kaskade, die die Transkriptionsaktivität von Jun/Fos-Proteinen an ihrer AP-1-Bindungsstelle erhöht. Bei diesem Vorgang ist die DNA-Bindungsdomäne (DBD, engl. *DNA binding domain*) von ER erforderlich. Sowohl E₂ als auch Tamoxifen können über diesen Weg wirken. Die DBD liegt in der Region C, umfasst die AS 180 bis 262 und ist als Zinkfinger-Motiv für die DNA-Bindung hochkonserviert.⁴⁷

Über den AP-1 β -Weg, der unabhängig von der ER-DNA-Bindungsdomäne ist und nur von E₂ aktiviert wird, interagiert ER direkt mit Jun/Fos-Heterodimeren und erreicht so die AP-1-DNA-Bindungsstelle. Der AP-1 α -Weg war prädominant in HeLa-Zellen und Ishikawa-Endometriumkarzinomzellen, während der AP-1 β -Weg sich in Brustkrebszellen zeigte. Interessanterweise senden ER α und ER β gegensätzliche Signale über den AP-1 β -Weg.⁴⁸ E₂ aktivierte ER α -vermittelte Transkription und inhibierte ER β -vermittelte Transkription. Auch die pharmakologische Wirkung an beiden Rezeptorformen zeigte sich gegensinnig. Das Anti-Östrogen Tamoxifen war ein potenter Transkriptionsaktivator an der AP-1-Bindungsstelle mit ER β im Kontakt mit einem Jun/Fos-Heterodimer. In der Gegenwart von ER α erwies sich das Medikament als Transkriptionshemmer.⁴⁹ Daraus lässt sich ableiten, dass beide Östrogenrezeptorisoformen ER α und ER β eine unterschiedliche Rolle bei der Genregulation über die AP-1-Bindungsstelle spielen.

Östrogen induziert die Genexpression von PR (Progesteronrezeptor) in verschiedenen Zielgeweben, im Brustkrebsgewebe und in Brustkrebszelllinien.⁵⁰ Die ursprüngliche Annahme, dass ER-vermittelte Transkription die Bindung von E₂ und die Interaktion mit EREs erfordert, wurde verlassen, nachdem zwei alternative Wege für ER-vermittelte Transkription entdeckt wurden.⁵¹

⁴² Vgl. Weisz A. *et al.*, 1990 Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the ER and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res* 18:5097–5106.

⁴³ Vgl. Webb P. *et al.*, 1992 The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. *Mol Endocrinol* 6:157–167.

⁴⁴ Vgl. Umayahara Y. *et al.*, 1994 Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* 269:16433–16442.

⁴⁵ Vgl. Qi X. *et al.*, ER inhibits c-Jun-dependent stress-induced cell death by binding and modifying c-Jun activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):6769–77.

⁴⁶ Vgl. Webb P. *et al.*, Tamoxifen activation of the ER/AP-1 pathway. *Mol. Endocrin.* 1995; 9:443–456.

⁴⁷ Vgl. Green S. *et al.*, The N-terminal DBD 'zinc finger' of the ER determines target gene specificity. *EMBO J.* 1988; 7:3037–3044.

⁴⁸ Vgl. Paech K. *et al.*, Diff. ligand activation of ER α and ER β at AP-1 sites. *Science* 1997; 277:1509.

⁴⁹ Vgl. Paech K. *et al.*, Diff. ligand activation of ER α and ER β at AP-1 sites. *Science* 1997; 277:1510.

⁵⁰ Vgl. Kraus W.L. *et al.*, Identification of multiple EREs in the rat PR gene; *Molecul. Endocrinology* 1994; 8:952–969.

⁵¹ Vgl. Wu-Peng X.S. *et al.*, *Mol. Endocrinology* 1992; Dubik D. *et al.*, *Oncogene* 1992; Porter W. *et al.*, *Mol. Endocrinology* 1996; Johnston S.D. *et al.*, *Mol. Endocrinology* 1997.

Der Progesteronrezeptor (PR)

Das menschliche Gen für den Progesteronrezeptor kodiert für zwei Proteinisoformen, PR-A und PR-B⁵², die je nach Gewebespezifität unterschiedlich exprimiert werden.⁵³ PR-A ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 94 kD und PR-B hat ein Molekulargewicht von 116 kD. Die mRNA beider Proteine entstehen durch Verwendung unterschiedlicher Promotoren im PR-Gen und werden Östrogen-vermittelt reguliert, obwohl keiner von ihnen EREs aufweist.⁵⁴

Die Aktivität von PR wird u.a. über AP-1-Faktoren reguliert. So zeigt PR eine Steigerung seiner Aktivität nach Stimulation von MCF-7-Zellen mit E₂, obwohl dem PR-Gen selbst palindromische Östrogen-Bindungs-Elemente (EREs engl. *estrogen response elements*) fehlen. Es existiert aber eine plus 90 bp gelegene AP-1-DNA-Bindungsstelle, über welche ER unter Mitwirkung von Fos- und Jun-Proteinen eine E₂-Wirkung am PR-Gen vermittelt.⁵⁵ Bei der Untersuchung von PR-B-Expression im Zusammenhang mit der Expression von AP-1-Faktoren korrelierte eine positive Expression von FosB mit einem positiven Rezeptorstatus für ER und PR.⁵⁶ Die Expression von Fra-1 korrelierte invers mit der Expression von PR-B.⁵⁷

Bei der Untersuchung von gesundem Brustgewebe hat sich eine Prädominanz der PR-A-Isoform gezeigt. Im Brustkrebsgewebe war in 94% der Fälle der PR-A-Level grösser oder gleich dem PR-B-Level im Westernblot. Das Verhältnis PR-A-Level kleiner oder gleich dem PR-B-Level war mit einem G1/G2-Grading der Tumore assoziiert. Die Expression beider Isoformen korrelierte signifikant miteinander sowie mit der Expression von ER. Für die PR-B-Expression konnte gezeigt werden, dass sie mit der Abwesenheit von Erb2/neu und einer besseren Differenzierung der Tumore (Grading G1/G2) korrelierte. Im Hinblick auf AP-1-Faktoren korrelierte eine PR-B-Expression negativ mit der Expression von Fra-1 und positiv mit der von FosB.⁵⁸

⁵² Vgl. Lessey B.A. et al., The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors. *Endocrinology* 1983; 112:1267-74.

⁵³ Vgl. Vegeto E. et al., Human PR A form is a cell- and promoter-specific repressor of human PR B function. *Mol Endocrinol* (1993):1244-1255

⁵⁴ Vgl. Kastner P. et al., Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990; 9:1603-1614.

⁵⁵ Vgl. Petz L.N. et al., Estrogen receptor alpha and AP-1 mediate estrogen responsiveness of the PR gene. in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2002; 143:4583-4591.

⁵⁶ Vgl. Bamberger A.M., Methner C. et al., AP-1 family in breast cancer: Association of FosB with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int. J. Cancer* 1999; 84:533-538.

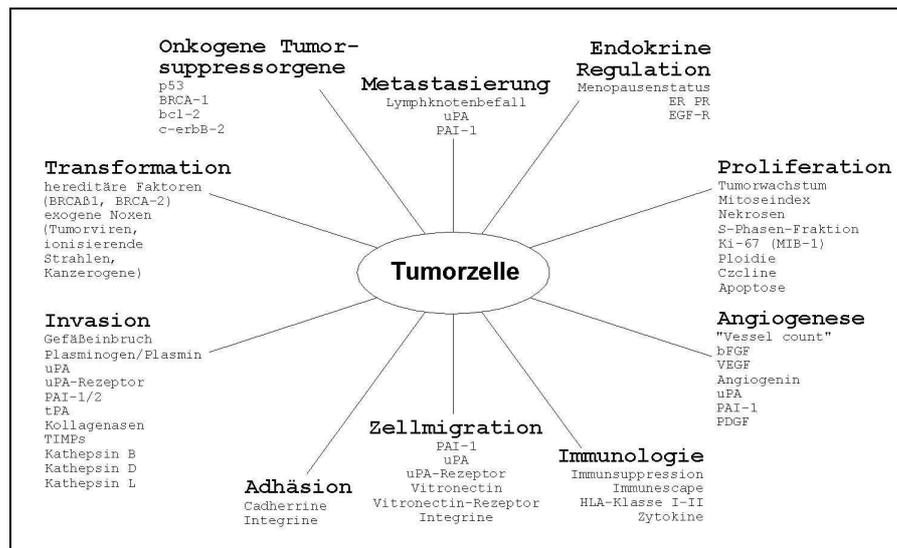
⁵⁷ Vgl. Bamberger A.M. and Milde-Langosch K. et al., PR-B and PR-A in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm. Research* 2000; 54:32-37.

⁵⁸ Vgl. Bamberger A.M. and Milde-Langosch K. et al., PR-B and PR-A in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm. Research* 2000; 54:32-37.

1.2.2. Neue Prognosefaktoren

Die malignen Eigenschaften der Tumorzelle stellen die Grundlage der neuen tumorbiologischen Prognosefaktoren dar. Die Komplexität tumorbiologischer Vorgänge begründet die Vielzahl der in den letzten Jahren untersuchten Faktoren (s. Abb. 3).

Abbildung 3: Malignität und Tumorausbreitung beim Mammakarzinom⁵⁹



Expression des HER-2/neu-Rezeptors (c-erbB-2-Rezeptor)

HER-2/neu ist ein membranständiger Wachstumsfaktor-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 185 kD, der von dem auf Chromosom 17q21 lokalisierten c-erbB-2-Gen kodiert wird.⁶⁰

Die Stimulation von HER-2/neu führt zu einer Aktivierung der HER-2/neu-Kinase. Diese bewirkt eine Signaltransduktion, die zur Zellproliferation und Zelldifferenzierung führt.⁶¹ Dabei hat jede Zelle in ca. 25 % der Mammakarzinome nicht nur zwei Genkopien (eine auf jedem Chromosom 17), sondern im Einzelfall bis zu 50 HER-2/neu-Genkopien pro Zelle.⁶² Die Genamplifikation führt sowohl auf der Ebene der Transkription als auch auf Proteinebene zu einer Überexpression des membranständigen Rezeptors, so dass in malignen Geweben an Stelle der normalerweise 20.000-50.000 Moleküle pro Zelle bis zu 2.000.000 HER-2/neu-Moleküle vorhanden sind. Bei Vorliegen der HER-2/neu Überexpression kommt es zu einer ligandenunabhängigen Autoaktivierung des Rezeptors und zu einer gesteigerten mitogenen Signalgebung.

⁵⁹ Aus: Management des Mammakarzinoms, R. Kreienberg, Springer, 2002.

⁶⁰ Vgl. King C.R. et al., Amplification of a novel v-erb-B-2-related gene in human mammary carcinomas. *Science* (1985) 229: 974-976.

⁶¹ Vgl. Wen D. et al.; Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* (1992) 69: 559-572.

⁶² Vgl. Seshadri R. et al., Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* (1993) 11: 1936-1942.

Eine Überexpression zeigt sich in ca. 20-30 % der Mammakarzinome, wobei der genaue Anteil vom Tumortyp abhängig ist. So wird z.B. im DCIS doppelt so häufig eine Überexpression gefunden im Vergleich zum invasiven Brustkrebs. Im lobulären Mammakarzinom lässt sich dagegen nur selten eine Überexpression von c-erB-2 nachweisen.⁶³ 1989 konnte von *Slamon et al.* gezeigt werden, dass diese molekulare Veränderung beim primären Mammakarzinom mit einer ungünstigen klinischen Prognose assoziiert ist, wobei es zu einem kürzeren rezidivfreien und Gesamtüberleben der betroffenen Patientinnen kommt.⁶⁴ Das mittlere Überleben von Frauen, die LK-positiv waren und eine c-erB-2-Überexpression aufwiesen (20 % der Patientinnen), betrug 5 Jahre, im Vergleich zu 12 Jahren bei Patientinnen, die keine Überexpression hatten.⁶⁵ Eine Amplifizierung von c-erB-2 in Mammakarzinomen wird mit einem raschen Wachstum des Tumors und mit einer frühen Metastasierung in Verbindung gebracht.⁶⁶ *Carlo-magno et al.* konnten bei 30 % von LK-negativen Patientinnen eine c-erB-2-Überexpression nachweisen, die direkt mit der Tumorgroße und invers mit der Konzentration des Östrogenrezeptors korrelierte.⁶⁷ Bei LK-positiven Brustkrebspatientinnen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Amplifikation von c-erB-2, der Anzahl befallener Lymphknoten, einem höheren Grading und einem negativen Östrogenrezeptorstatus nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine Überexpression dieses Protoonkogenprodukts in biologisch aktiven Tumoren schliessen.

Die prognostische Stärke von HER-2/neu wurde durch die Tatsache abgeschwächt, dass der Nachweis der Amplifizierung nur eine prognostische Aussage bei nodalpositiven Patientinnen brachte, welche eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten, nicht jedoch bei unbehandelten, nodalnegativen Patientinnen. Metaanalysen zeigten später, dass HER-2/neu in allen Subgruppen einen prognostischen Faktor mässiger Stärke darstellt. Klinisch ist HER-2/neu eher prädiktiv bezüglich der Wirksamkeit einer Hormon- und Chemotherapie⁶⁸ in der adjuvanten oder palliativen Situation bedeutsam und wird dort kontrovers diskutiert. Aufgrund der klinisch relevanten Zusammenhänge ist die Bestimmung von HER-2/neu heute bei jeder Patientin mit primären Mammakarzinom indiziert und in jedem Fall ist ein positiver HER-2/neu-Status die Voraussetzung für den Einsatz des humanisierten Antikörpers Trastuzumap (Herceptin®).

⁶³ Vgl. *Gusterson B.A.*, Journal Clinical Oncology 10: 1049-1056, 1992

⁶⁴ Vgl. *Slamon D.J. et al.*, Correlation of relapse and survival with amplification on HER-2/neu. Science (1987) 235: 177-182.

⁶⁵ Vgl. *Hartmann L.C. et al.*, Prognostic value of c-erB-2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. Cancer 1994; 74:2956-2963.

⁶⁶ Vgl. *Bui T.D. et al.*, Expression of Wnt5a is downregulated by extracellular matrix and mutated c-Ha-ras in the mammary epithelial cell line MCF-10A. Bio. Res. Commun. 1997; 239:911-917.

⁶⁷ Vgl. *Carlo-magno C. et al.*, C-erB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in earlystage breast cancer without axillary lymph node metastasis. J. Clin. Oncol. 1996; 14: 2702-2708.

⁶⁸ Vgl. *Amadori D.*, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 15: 110 (104a), 1996.

Anzahl der Tumorzellen in der S-Phase des Zellzyklus

Wenn sich eine große Anzahl von Tumorzellen in der S-Phase des Zellzyklus befindet, spricht dies für ein hohe Rate an Zellproliferation und ist mit einer schlechten Prognose verbunden (v.a. im Hinblick auf Mammakarzinome mit einem negativen LK-Status).⁶⁹

DNA-Ploidie

Hierbei wird zytometrisch der DNA-Gehalt in den Tumorzellkernen bestimmt. Euploide Tumoren (normaler DNA-Gehalt = 2n) haben eine günstige, aneuploide (d.h. mit abnorm vermehrtem DNA-Gehalt) eine ungünstigere Prognose. Die meisten Mammakarzinome sind aneuploid. Die Signifikanz dieses Faktors ist jedoch noch ungeklärt.⁷⁰

Das Tumorsuppressorgen p53

Das p53-Protein wurde als ein mit dem großen T-Antigen von SV40-Viren assoziiertes zelluläres Protein entdeckt. Das Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert. P53 integriert afferente und efferente Signalwege, die den Zellzyklus kontrollieren und unter bestimmten Bedingungen das Programm der Apoptose anstossen. P53 wird als Tumorsuppressorgen angesehen, da ein Verlust der Heterozygotie und die Mutation von p53 mit einer ausgeprägten Tumordisposition einhergeht.⁷¹

Expression von mutiertem p53-Protein im Mammakarzinom:⁷²

- 50 % im metastasierten Mammakarzinom mit positivem LK-Status
- 25 % im invasiven Mammakarzinom
- 13 % im intraduktalen Mammakarzinom
- 20 % im komedoartigen DCIS

Es erfolgt keine Expression in atypischer epithelialer Hyperplasie und in nicht-komdedoartigen DCIS. Im Mammakarzinom finden p53-Mutationen bereits in einem frühen Tumorstadium statt. Es wurden Mutationen bzw. durch eine Mutation hervorgerufene Akkumulation des p53-Proteins in Tumoren gefunden, die die Basalmembran noch nicht durchbrochen hatten.⁷³ Im Hinblick auf das Ansprechen einer Chemotherapie liegen konträre Studienergebnisse vor: während Tumore mit HER-2/neu und simultaner p53-Überexpression⁷⁴ chemosensitiv sein sollen, konnten andere Untersuchungen für p53 keinen Zusammenhang mit einem Therapieansprechen zeigen. Möglicherweise sind p53-überexprimierende Tumoren jedoch stärker strahlensensibel als p53-negative.

⁶⁹ Vgl. *Hedley D.W.*, Cytometry 14: 482-485, 1993.

⁷⁰ Vgl. *Böcker*, Pathologie, Urban & Schwarzenberg 1997, S. 867 ff.

⁷¹ Vgl. *Wagner C.*, Molecular Oncology, Thieme 1999, S. 139 ff. *Makris A.*, Lancet 345: 1181-1182, 1995.

⁷² Vgl. *Davidoff A.M.*, J. Surg. Oncol. 48: 260-267, 1991.

⁷³ Vgl. *Wagner C.*, Molecular Oncology, Thieme 1999, S. 52 ff.

⁷⁴ Vgl. *Thor A.D. et al.*, erbB-2, p53 and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast can-cer, J. Natl. Cancer Inst. 90: 1346-1360.

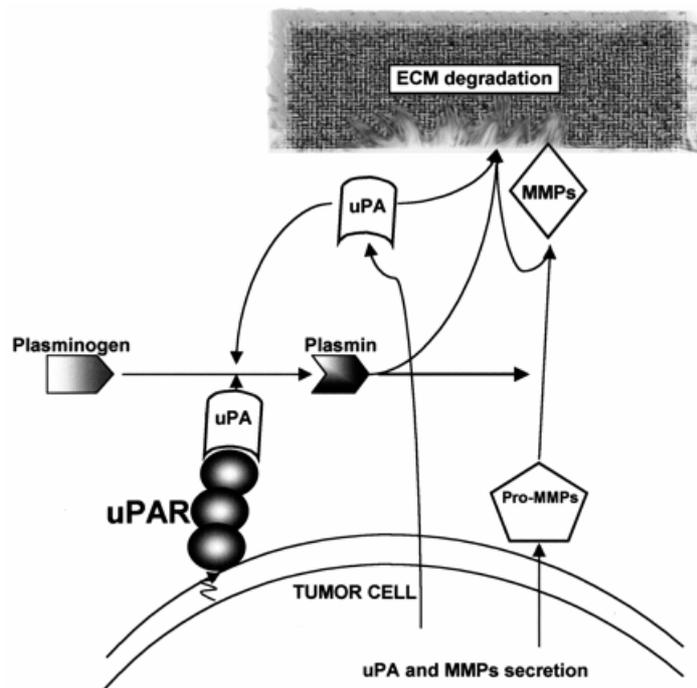
Das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System (uPA-System)

Das uPA-System setzt sich zusammen aus der Serinprotease uPA, seinem Glykolipid-Rezeptor (uPAR) und zwei Serin-Inhibitoren, dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2 (PAI-2). UPA bindet an seinen spezifischen Rezeptor (uPAR).

Der uPAR ist eine 55-60 kD grosses Glykoprotein, welches über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden ist. An seinen Rezeptor gebundenes uPA führt zur Aktivierung von Plasminogen in Plasmin. Plasmin kann Matrix-Metalloproteinasen aktivieren, die ebenfalls von der Tumorzelle sezerniert werden können.⁷⁵

UPA kann in Mammakarzinomen vermehrt gebildet werden. Über die o.g. Zusammenhänge entsteht so ein auf die Zelloberfläche fokussiertes Proteasesystem, welches die Tumorzellen befähigt, umgebene Strukturen des Tumorstromas (Proteine) und der Basalmembran anzudauern (Invasion) und sich aus dem Gewebeverband zu lösen (Infiltration).

Abbildung 4: uPA-System



PAI-1 ist ein von uPA unabhängiger Prognosefaktor und korreliert paradoxerweise ebenfalls mit einer schlechteren Prognose für Patientinnen mit einem Mammakarzinom. Diese Beobachtung wird durch seine schützende Wirkung des Tumorstromas vor

⁷⁵ Vgl. Mignatti P. et al., (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73, 161–195.

Autodigestion, die Förderung der Neubildung des Tumorstromas und einer funktionellen Beziehung zur Angiogenese erklärt.⁷⁶ Der wesentliche Vorteil der kombinierten uPA/-PAI-1-Bestimmung liegt in der Definition des *low-risk*-Kollektivs: auch nach Langzeitbeobachtungen von mehr als acht Jahren besitzen nodalnegative Patientinnen mit niedrigen Werten für uPA und PAI-1 eine Rezidiv- und Metastasierungswahrscheinlichkeit von unter 10 %. Diesen Frauen kann eine adjuvante Chemotherapie erspart bleiben.⁷⁷

Für das von uPA vermittelte invasive Wachstum von Tumorzellen ist die Bindung an seinen Rezeptor (uPAR) essentiell.⁷⁸ Dem uPA-Rezeptor wurde im Primärtumor ebenfalls eine prognostische Bedeutung zugeschrieben, welche jedoch geringer als die von uPA und PAI-1 ist. Im Gegensatz dazu wurde ihm eine erhebliche Bedeutung in mikrometastatischen Zellen zugewiesen.⁷⁹

1.3. Der AP-1-Transkriptionsfaktor

Der AP-1-Transkriptionsfaktor (engl. *activator-protein-1*) umfasst sieben nukleäre Transkriptionsfaktoren. In seiner Erforschung identifizierten *Peter Angel* und *Michael Karin* Mitglieder der Fos- und Jun-Gene als seine Komponenten.⁸⁰ Dazu zählt die Familie der Fos-Proteine (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) und die Familie der Jun-Proteine (c-Jun, JunB, JunD).

C-Fos und c-Jun wurden als zelluläre Homologe der retroviralen Onkoproteine v-Fos und v-Jun identifiziert.⁸¹ Zu den AP-1-Proteinen werden auch die Dimerisierungspartner der Jun-Proteinen (JDP1 und JDP2, engl. *Jun dimerizations partners*) und die naheverwandten Transkriptionsfaktoren ATF2, LRF1/ATF3 und B-ATF gezählt.⁸²

AP-1-Aktivität wird durch verschiedene Stimuli modifiziert. Jun- und Fos-Gene zählen zu der Gruppe der sog. *immediately-early*-Gene und können sehr schnell und vorübergehend durch Serum,⁸³ Wachstumsfaktoren,⁸⁴ Onkoproteine,⁸⁵ TNF α ,⁸⁶ Tumorpromoto-

⁷⁶ Vgl. *Duffy M.J.*, The uPA activator system: Role in malignancy, *Current-Pharmaceutical-Design*; 10(1): 39-49, 2004.

⁷⁷ Vgl. *Harbeck N. et al.*, Clinical utility of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts. *Clin Breast Cancer*. 2002 Aug;3(3):196-200.

⁷⁸ Vgl. *Kariko K. et al.*, Overexpression of uPAR increases invasion in human osteosarcoma cell line. *Cancer Res*. 53 (1993) 3109.

⁷⁹ Vgl. *Heiss M.M. et al.*, uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat. Med.* (1995) 1035.

⁸⁰ Vgl. *Angel/Karin*, The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Bio-chemica et Biophysica Acta*, 1072 (1991) 129-157.

⁸¹ Vgl. *Van Straaten et al.*, Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jun;80(11):3183-7.

⁸² Vgl. *Liebermann D.A. et al.*, *Int. Journal Oncology*, 1998; 12:685-700.

⁸³ Vgl. *Lamph et al.*, Induction of proto-oncogene Jun/AP-1 by serum and TPA. *Nature*. 1988 Aug 18;334(6183):629-31.

⁸⁴ Vgl. *Quantin and Breathnach*, Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature*. 1988 Aug 11;334(6182):538-9.

⁸⁵ Vgl. *Angel/Karin*, The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1072 (1991) 129-157.

⁸⁶ Vgl. *Brenner D.A. et al.*, Prolonged activation of jun and collagenase genes by TNF α . *Nature*. 1989 Feb 16;337(6208):661-3.

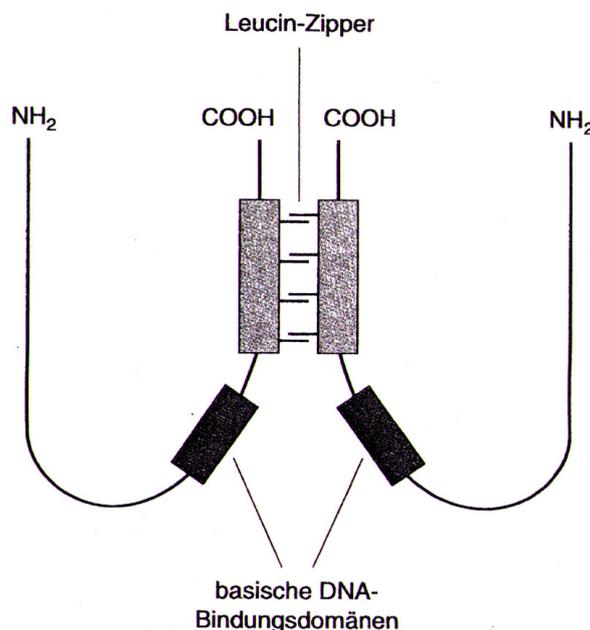
ren (z.B. TPA) und IL-1⁸⁷ aktiviert werden. Diese Erkenntnis führte schon früh zu der Annahme, dass der basalen und induzierbaren AP-1-Aktivität eine Bedeutung bei der Kontrolle verschiedener Zielgene zukommt und somit für Wachstum und maligne Transformation menschlicher Zellen eine wichtige Rolle spielt.

Struktur der AP-1-Faktoren

Bezüglich ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren verfügen die AP-1-Faktoren über zwei wichtige Regionen: eine Region ist verantwortlich für das Binden an die DNA des jeweiligen Zielgens (DNA-Bindungsdomäne = DBD) und die andere reguliert die Transkription des Zielgens (transaktivierende Domäne = TAD).

Die DNA-Bindungsdomäne definiert die AP-1-Faktoren als bZip-Proteine. BZip bezeichnet zwei unabhängige Untereinheiten in Form einer basischen Domäne und dem Leucin-Zipper-Motiv. Die basische Domäne ist reich an basischen Aminosäuren, welche den Kontakt zur DNA vermitteln. Die Leucin-Zipper-Region ist durch eine Serie von Leucin-Resten im Abstand von 7 Aminosäuren charakterisiert. Die Sequenz bildet eine α -Helix mit übereinanderliegenden Leucin-Seitenketten.

Abbildung 5: Leucin-Zipper



Die Dimerisierung zweier Proteine aus der Jun- und Fos-Familie erfolgt über den Zusammenschluss zweier Helices, indem sich deren regelmäßige Leucine als so genannte *coiled coils* (umwickelte Spiralen) umeinanderwinden. Dabei entsteht eine hydro-

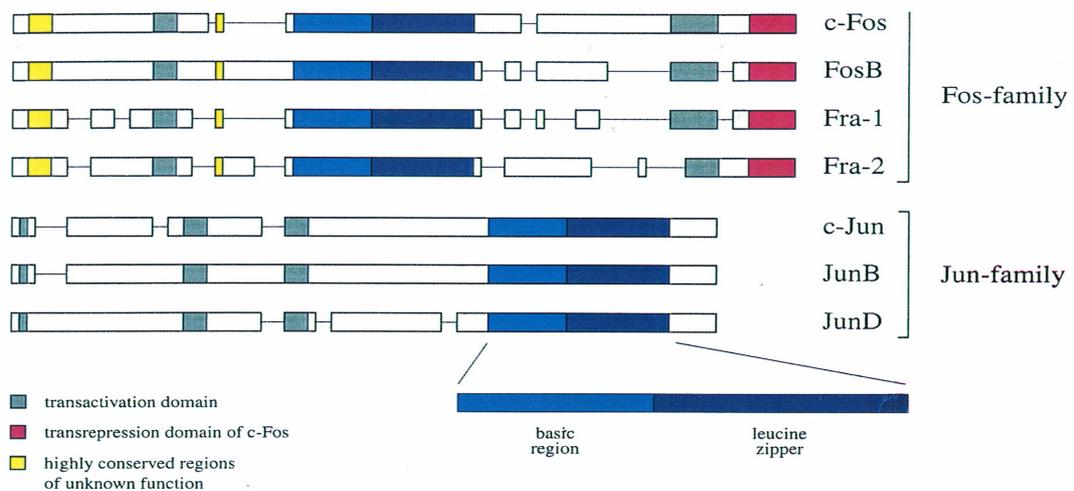
⁸⁷ Vgl. Goldgaber *et al.*, Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Oct;86(19):7606-10.

phobe Oberfläche, welche den Zusammenschluss zusätzlich stabilisiert.⁸⁸ Das Leucin-Zipper-Motiv ist zwar essentiell für die DNA-Bindung, für die direkte Assoziation mit der DNA ist jedoch vielmehr die benachbarte basische DNA-Bindungsdomäne verantwortlich.^{89, 90}

AP-1-Proteine bilden stabile Homo- und Heterodimere. Sie binden mit hoher Affinität an eine asymmetrische Heptanukleotid-Sequenz TGA(C/G)TCA (TRE engl. *TPA response elements*) und mit schwächerer Affinität an eine symmetrische Oktanukleotid-Sequenz TGACGTCA (CRE engl. *cAMP response element*). Das TRE-Element ist in einer Vielzahl von Promotoren und Enhancern von Ziegenen vertreten. TPA (TPA = 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) ist ein Phorbolstertumorpromotor. Als Antwort auf TPA kann über TREs Genexpression induziert werden.⁹¹

Jun-Proteine formen stabile Homodimere. Fos-Proteine bilden keine Homodimere; sie schliessen sich jedoch mit Jun-Proteinen zu sehr stabilen Heterodimeren zusammen und haben so eine höhere DNA-Bindungsaktivität als Jun-Homodimere.⁹²

Abbildung 6: Struktur und Organisation der Fos- und Jun-Proteine



Die sieben Jun- und Fos-Proteine können somit 18 verschiedene Dimerformationen bilden. ATF-Proteine formen ihrerseits sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit Jun-Proteinen und binden vornehmlich an CREs.⁹³ Im Gegensatz zu der DNA-Bindungsdomäne sind die strukturellen Eigenschaften der transaktivierenden Domäne

⁸⁸ Vgl. Knippers R., Molekulare Genetik, Thieme 2001, S. 369.

⁸⁹ Vgl. Johnson P.F., Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. Annu. Rev. Biochem. 1989: 58.

⁹⁰ Vgl. Admakiewicz J. et al., Mapping of functional domains in Fos and Jun proteins using epitopespecific antibodies. Oncogene. 1990 Apr;5(4):525-33.

⁹¹ Vgl. Angel P. et al., Cell, 1987; 49:729-739.

⁹² Vgl. Angel et Karin, The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, Biochemica et Biophysica Acta, 1072 (1991) 129-1571991.

⁹³ Vgl. Ryseck and Bravo, c-Jun, Jun B, and Jun D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. Oncogene. 1991 Apr;6(4):533-42.

(TAD) bisher noch wenig verstanden. Zur Aufklärung ihrer Funktion wurde die TAD auf heterologe DNA-Bindungsdomänen wie die des Transkriptionsfaktors GAL4 übertragen. Mit der Schaffung derartiger Fusionsproteine, bei denen kein Dimerisierungspartner für die Transkriptionsfunktion mehr erforderlich war, konnten wichtige Aminosäuren in den TADs identifiziert werden. Es zeigte sich, dass sich die verschiedenen Jun-, Fos- und ATF-Proteine in ihrem Transkriptionspotential unterscheiden. C-Fos, FosB und c-Jun wirkten z.B. als starke Transkriptionsfaktoren, wohingegen JunB, JunD, Fra-1 und Fra-2 nur geringes Potential aufwiesen. Die letztgenannten konnten unter besonderen Umständen sogar als Repressor der AP-1-Aktivität fungieren, indem sie kompetitiv an AP-1-Zielgene banden oder mit c-Fos, FosB und c-Jun inaktive Heterodimere bildeten.

Die TAD ist auch Zielstruktur von Proteinkinasen, welche an die TAD binden und diese als Antwort auf extrazelluläre Stimuli phosphorylieren. Auf diesem Weg erfolgt u.a. eine Expressionskontrolle von AP-1-Zielgenen.⁹⁴

Regulation von AP-1-Aktivität

Die Funktion der Fos/Jun-Familie ist abhängig vom Zelltyp und dem zellulären Kontext, in welchem sie exprimiert wird. Die Mechanismen, welche die jeweilige Funktion garantieren, umfassen die selektive Dimerbildung, diverse Interaktionen mit anderen regulatorischen Proteinen und posttranslationelle Modifikationen. Extrazelluläre Stimuli kontrollieren die Transkription, die mRNA-Stabilität und die Aktivität der Dimere von Fos/Jun.⁹⁵

Die Regulation von AP-1-Faktoren erfolgt u.a. auf Transkriptionsebene: So wird z.B. die Transkription von c-Fos über Enhancer wie *serum-responsive element* (SRE), *cAMP-responsive element* (CRE) und *sis-induzierten Enhancer* (SIE) hochreguliert.⁹⁶ Letztere werden von den Transkriptionsfaktoren der STAT-Gruppe erkannt, welche die Endstrecke des Jak/Stat-Signalweges darstellen und über Cytokine reguliert werden. Im c-Jun-Promotor werden zwei AP-1-ähnliche DNA-Bindungsstellen (Jun1, Jun2) von Jun/ATF-Heterodimeren oder ATF-Homodimeren erkannt.⁹⁷

Ein bedeutendes Mitglied der Klasse der Proteinkinasen, welche AP-1-Aktivität als Antwort auf extrazelluläre Stimuli regulieren, sind die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs). Durch Phosphorylierung von MAPK-Kinasen an konservierten Threonin- und Tyrosinresten werden sie aktiviert. Die Dauer der Antwort nach MAPK-Aktivierung

⁹⁴ Vgl. *Minden A. et al.*, Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim. Acta* 1997; 1333:85-104.

⁹⁵ Vgl. *Chinenov Y. et al.*, (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*. 20:2438-52.

⁹⁶ Vgl. *Sheng et al.*, 1991; *Treisman*, 1992; *Darnell et al.*, 1994.

⁹⁷ Vgl. *Van Dam H. et al.*, Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 1993 Feb;12(2):479-87.

wird durch MAPK-Phosphatasen reguliert, welche unmittelbar durch die gleichen Stimuli induziert werden. Nach Art des Stimulus werden die MAP-Kinasen in drei Untergruppen eingeteilt: ERK1/2 (engl. *extracellular signal regulated kinases*), die Jun-N-terminalen-Kinasen 1-3 (JNK 1-3) und die p38-MAP-Kinasen (p38 α , p38 β , p38 γ). Bis auf die JNKs (auch bekannt als SAPK, engl. *stress-activated kinases*) und die p38-MAP-Kinasen, welche durch Cytokine und zellulären Stress stimuliert werden, werden die extrazelluläre Signalvermittelnden Kinasen durch Wachstumsfaktoren und Phorbol-ester aktiviert.⁹⁸ JNKs können c-Jun phosphorylieren und somit die Transkription von c-Jun-Zielgenen beeinflussen.⁹⁹ Hyperphosphorylierung von Jun- und ATF-Proteinen führte zudem zu einer Konformationsänderung in der TAD, was über Kofaktoren die Verbindung der Transkriptionsfaktoren mit der RNA-Polymerase II erleichterte, verstärkte und somit die Transkription von Zielgenen erhöhte. Darüber hinaus konnte ein Ubiquitin-vermittelter Abbau von c-Jun durch Hyperphosphorylierung verhindert werden.¹⁰⁰ Im Gegensatz dazu führte eine Phosphorylierung von c-Jun durch GSK-3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) und Casein-Kinase II *in vitro* zu einer verminderten DNA-Bindungsaktivität.¹⁰¹

AP-1-Aktivität kann jedoch auch über Protein-Protein-Interaktion reguliert werden. Für den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) ist so ein *crosstalk* von Transkriptionsfaktoren bekannt. Abhängig von der Zusammensetzung des AP-1-Dimers können sich die Proteine gegenseitig positiv oder negativ regulieren.¹⁰² Für die Transkriptionsfaktoren NF κ B,¹⁰³ MyoD¹⁰⁴ und YY1¹⁰⁵ konnten ähnliche Interaktionen gezeigt werden.

Physiologie und Pathologie der AP-1-Faktoren

Die einzelnen Mitglieder der Fos- und Jun-Familie zeigen unterschiedliche Fähigkeiten zur Transformation von Zellen und ein unterschiedliches Verhalten in der Regulation von Zielgenen. Im Zusammenspiel dieser 7 Transkriptionsfaktoren lässt sich von einem komplexen Netz der Selbstregulation und gegenseitigen Beeinflussung, hemmender oder stimulierender Art, ausgehen.

⁹⁸ Vgl. Lewis T.S. *et al.*, Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74 (1998).

⁹⁹ Vgl. Sabapathy K. *et al.*, Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell.* 2004 Sep 10;15(5):713-25.

¹⁰⁰ Vgl. Musti A.M. *et al.*, Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAPkinases. *Science.* 1997 Jan 17;275(5298):400-2.

¹⁰¹ Vgl. Boyle W.J. *et al.*, Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell.* 1991 Feb 8;64(3):573-84.

¹⁰² Vgl. Gottlicher M. *et al.*, Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med.* 1998 Jun;76(7):480-9.

¹⁰³ Vgl. Stein B. *et al.*, Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* 1993 Oct;12(10):3879-91.

¹⁰⁴ Vgl. Bengal E. *et al.*, Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell.* 1992 Feb 7;68(3):507-19.

¹⁰⁵ Vgl. Kang J.H. *et al.*, Weakening of the repressive YY-1 site on the thrombospondin-1 promoter via c-Jun/YY-1 interaction. *Exp Mol Med.* 2004 Aug 31;36(4):300-10.

Mit der Entdeckung des AP-1-Transkriptionsfaktors als Vermittler von Genexpression durch den Phorbolästertumorpromotor TPA und nach Identifikation von c-Fos und c-Jun als homologe Onkoproteine und Bestandteil von AP-1 erfolgte der Rückschluss auf eine Mitwirkung von AP-1 bei der Kontrolle von Zellwachstum und Onkogenese.

Unter den Jun-Proteinen zeigte c-Jun das höchste Aktivierungspotential nach DNA-Bindung *in vitro*.¹⁰⁶ Zusammen mit c-Fos wird die Fähigkeit zur Transaktivierung auf der Grundlage einer sehr stabilen Heterodimerkonfiguration noch weiter verstärkt.¹⁰⁷ JunB hatte einen gegenteiligen Effekt.¹⁰⁸

Im Hinblick auf durch AP-1 regulierte Gene wie Cyclin D1 und p21, die am Zellzyklus teilhaben, zeigte sich in Zellkulturen und *knock-out*-Mäusen ein ähnlicher c-Jun/JunB-Antagonismus. Eine Überexpression von c-Jun führte über eine verstärkte Expression von Cyclin D1 zu einer Transition der Zelle in die S-Phase. Gleichzeitig wurde die Expression des CDK-Inhibitors p16 gehemmt.¹⁰⁹ Auf der anderen Seite führte eine dominant-negative Form von c-Jun (c-JunDN, TAM67) zu einer Hemmung der Rb-Phosphorylierung und zu einer reduzierten E2F-Aktivität. Die Cycline D und E zeigten sich bei herabgesetzter CDK-2- und CDK-4-Aktivität und gleichzeitiger Erhöhung des CDK-Inhibitors p27 in Klonen von MCF7-Zellen vermindert, welche TAM67 als induzierbaren Promotor exprimierten. Aus diesem Ergebnis wurde über eine reduzierte Expression von Cyclinen als Vermittler des Übertritts der Zelle von der G1- in die S-Phase auf eine wachstumshemmende Wirkung von TAM67 in Brusttumorzellen geschlossen.¹¹⁰ JunB kann im Zellzyklus am G1/S-Phasenübergang über Hemmung von Cyclin D und über p16^{INK4a} als Repressor agieren.¹¹¹

Eine Überexpression von JunD resultierte in verschiedenen Zelllinien in einer langsamen Proliferationsrate und in einem hohen Prozentsatz von Zellen in der ruhenden Zellzyklusphase G1/G0. Darüber hinaus konnte für transiente Transfektionen mit JunB eine Repression c-Jun-vermittelter Transaktivierung und Ras-induzierter Transformation gezeigt werden, wahrscheinlich über die Formation inaktiver c-Jun/JunB-Heterodimere.¹¹² Für AP-1-Komplexe mit c-Jun als Bestandteil lässt sich ihre wachstumsfördernde Funktion durch die repressive Regulation von Tumorsuppressorgenen

¹⁰⁶ Vgl. Ryseck and Bravo, c-Jun, Jun B, and Jun D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene*. 1991 Apr;6(4):533-42.

¹⁰⁷ Vgl. Halazonetis T.D. et al., c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*. 1988 Dec 2;55(5):917-24.

¹⁰⁸ Vgl. Chiu R. et al., Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell*. 1989 Dec 22;59(6):979-86.

¹⁰⁹ Vgl. Bakiri L. et al., Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J*. 2000 May 2;19(9):2056-68.

¹¹⁰ Vgl. Liu Y. et al., AP-1 blockade in breast cancer cells causes cell cycle arrest by suppressing G1 cyclin expression and reducing cyclin-dependent kinase activity. *Oncogene*. 2004 Oct 28;23(50):8238-46.

¹¹¹ Vgl. Passegue E. et al., (2000) *EMBO J*. 19, 2969-2979

¹¹² Vgl. Angel P. et al., *The fos and jun families of transcription factors*. CRC press 1994; pp. 1-310

wie p53, p21 und p16 erklären.¹¹³ In vielen Modellen wurde daher eine Überexpression von c-Jun als wachstumsfördernd, JunB jedoch als negativer Regulator der Zellproliferation angesehen.

Dass die Zusammenhänge komplexer sind, zeigt die Tatsache, dass die Injektion von Antikörpern gegen jeden der drei Jun-Proteine zu einer Hemmung der Zellzyklusprogression führte. Bei diesem Ergebnis war kein c-Jun/JunB-Antagonismus ersichtlich. In Bezug auf die Fos-Proteine mündete in dieser Versuchsreihe nur eine Antagonisierung aller Fos-Mitglieder durch Antikörper-Mikroinjektion in einer Hemmung des Zellzyklus beim Übertritt in die S-Phase. Die Antagonisierung einzelner Fos-Komponenten konnte keine effiziente Hemmung des Zellzyklus zeigen.¹¹⁴

In einer anderen Studie war die Expression von c-Fos und c-Jun, die AP-1-DNA-Bindungsaktivität und die transaktivierende Aktivität in normalen und immortalisierten HMECs-Zellen erhöht, wohingegen onkogen transformierte HMECs-Zellen und die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 abnehmende AP-1-Aktivität zeigten.¹¹⁵

Eine Vielzahl von Studien hat die Bedeutung von AP-1 bei Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und maligner Transformation näher untersucht. Der nächste Schritt liegt darin, die Signalwege, welche die AP-1-Aktivität kontrollieren, die Zielgene, die durch AP-1 reguliert werden und die posttranslationelle Modifikation der AP-1-Proteine sicher zu identifizieren.

Die sieben Mitglieder der Fos-Proteinfamilie lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: in die transformierenden (FBJ-v-Fos, FBJ-v-Fos, c-Fos, FosB) und die nicht-transformierenden (FosB₂, Fra-1, Fra-2) Proteine. Während c-Fos und FosB in ihren N- und C-terminalen Ende zahlreiche transaktivierende Elemente aufweisen (N-TA, HOB1, HOB2, C-TM und TBM),¹¹⁶ fehlen diese bei Fra-1, Fra-2 und FosB₂.¹¹⁷

Fos-Proteine interagieren mit einem der drei Jun-Proteine in Form von Heterodimeren als AP-1-Komplex. Sie aktivieren die Transkription von Zielgenen, indem sie an TREs mit der Sequenz 5'-TGAG/CTCA-3' in Promotoren und Enhancern ihrer Zielgene binden.¹¹⁸ Die Zuständigkeiten der einzelnen AP-1-Faktoren und ihre Hetero- bzw. Homodimerbildung ändern sich in Anpassung an die Erfordernisse der Zelle. Auf Induktion reagieren FosB und c-Fos mit einer schnellen und vorübergehenden Expression, wo-

¹¹³ Vgl. *Passequé and Wagner*, JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16 (INK4a) expression. *EMBO J.* 2000 Jun 15;19(12):2969-79.

¹¹⁴ Vgl. *Kovary and Bravo*, The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1991 Sep;11(9):4466-72.

¹¹⁵ Vgl. *Smith L.M. et al.*, Breast cancer cells have lower activating protein 1 transcription factor activity than normal mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1997 Jul 15;57(14):3046-54.

¹¹⁶ Vgl. *Sutherland et al.*, 1992; *Metz et al.*, 1994; *Brown et al.*, 1995; *Funk et al.*, 1997.

¹¹⁷ Vgl. *Wisdon R. et al.*, Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7429-38.

¹¹⁸ Vgl. *Lee et al.*, 1987.

hingegen Fra-1 und Fra-2 eine verspätete Antwort zeigen.¹¹⁹ Beim Vergleich von ruhenden und stimulierten Swiss 3T3-Zellen war c-Fos in ruhenden Zellen das bestimmende Protein im Komplex mit den Jun-Faktoren (c-Jun, JunB, JunD), wurde jedoch nach Stimulation mit Serum unmittelbar von Fra-1 und Fra-2 bei der Heterodimerbildung mit Jun-Proteinen abgelöst. Während des Wachstums verblieb die Synthese von Fra-1 und Fra-2 auf einem stets nachweisbaren Level, wobei die Expression von c-Fos und FosB undetektierbar wurde. Diese Beobachtung gab Anlass zu der Annahme, dass Fra-1 und Fra-2 als hemmende Faktoren agieren können, indem sie unter bestimmten Umständen die Dauer der AP-1-Antwort limitieren.¹²⁰ Fra-1 und Fra-2 sind die vorherrschenden Fos-Proteine in sich asynchron teilenden Zellen.¹²¹

Eine Vielzahl externer Stimuli induziert die Synthese und Aktivität verschiedener Fos-Proteine. Ebenso lässt die Entdeckung der DNA-Bindungsdomäne TRE für AP-1-Proteine in unterschiedlichen Zielgenen den Schluss auf eine weitreichende biologische Funktion dieser Proteinfamilie zu. Tatsächlich sind in den vergangenen Jahren unterschiedliche Effekte im Hinblick auf Zellzykluskontrolle,¹²² Apoptose,¹²³ Zelldifferenzierung,¹²⁴ onkogene Transformation und Tumorprogression¹²⁵ in Säugetierzellen beschrieben worden.

Trotz ihrer Ähnlichkeit im Aufbau und ihrer Eigenschaft, mit Jun-Proteinen zu dimerisieren und an TREs zu binden, regulieren die einzelnen Fos-Proteine unterschiedliche Zielgene und haben somit abweichende biologische Funktionen.

Von Fra-1 und Fra-2 wird angenommen, dass sie weniger potente Transkriptionsaktivität besitzen als c-Fos und FosB. Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass sie in transfizierten Fibroblasten einen inhibitorischen Effekt auf c-Fos-vermittelte Promotoraktivierung von AP-1-Zielgenen haben.¹²⁶ Sie scheinen jedoch auch einen Beitrag zur Aufrechterhaltung und Progression von transformierten Zellen zu leisten. So ist z.B. die Anwesenheit von Fra-1 für die Ausbildung eines vollständig transformierten Phänotyps von Schilddrüsenkarzinomzellen notwendig.¹²⁷

Eine Beteiligung der Fos-Proteine am Zellzyklus konnte am Beispiel von Cyclin D1 gezeigt werden. Untersuchungen des Cyclin-D1-Promotors in Fibroblasten mit der Eigenschaft c-Fos^{-/-} und FosB^{-/-} enthüllten die Notwendigkeit beider Fos-Proteine für die

¹¹⁹ Vgl. Nishina H. *et al.*, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3619-3623.

¹²⁰ Vgl. Tulchinsky E. (2000) Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol. Histopathol.* 15:921-8.

¹²¹ Vgl. Kovari K. *et al.*, Existence of Fos/Jun complexes during the G0-to-G1 transition and during growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins. *Mol Cell Biol.* 1992 Nov;12(11):5015-23.

¹²² Vgl. Kovari and Bravo, 1991 und Balsalobre und Jolicoeur, 1995.

¹²³ Vgl. Preston *et al.*, 1996 und Karin *et al.*, 1997.

¹²⁴ Vgl. Lord *et al.*, 1993; Baset-Séguin *et al.*, 1994; Grigoriadis *et al.*, 1994.

¹²⁵ Vgl. Reichmann *et al.*, 1992; Saez *et al.*, 1995.

¹²⁶ Vgl. Suzuki *et al.*, 1991.

¹²⁷ Vgl. Kustikova O. *et al.*, Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasi-veness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol.Cell. Biol.* 1998, 18:7095-7105.

Aktivität dieses Promoters. Die Fibroblasten zeigten ein eingeschränktes Wachstum und einen Defekt beim Übergang in die S-Phase des Zellzyklus; beides korrelierte mit einem spezifischen Verlust von Cyclin D.¹²⁸

Die genannten Beispiele können lediglich als Hinweis auf die Bedeutung der Fos-Proteine und des AP-1-Komplexes dienen. Sie zeigen die Komplexität und anscheinende Widersprüchlichkeit dieses Transkriptionsfaktors in seiner Regulation und in seinem Stellenwert bei der Kontrolle von Zellzyklus, Zelldifferenzierung und onkogener Transformation. Bis heute sind die genauen Regulationswege für die Kontrolle der AP-1-Aktivität nicht verstanden. Ebenso fehlt eine sichere Identifizierung der durch AP-1 regulierten Zielgene und deren Bedeutung im Zellzyklus. Von der schrittweisen Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen und Interaktionen erhoffen sich Forscher in den Fachbereichen Biologie, Biochemie und Medizin weitere Erkenntnisse zur Prognose und Therapie maligner Tumoren.

1.3.1. FosB

FosB ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor. Sein Gen weist eine hohe Homologie mit c-Fos in wesentlichen Elementen wie der Leucin-Zipper-Region und der DNA-Bindungs-Domäne auf, zeigt jedoch Unterschiede in seinem transformierenden Potenzial, was mit seinem C-terminalen (dort ist eine Prolin-reiche Transkriptionsdomäne lokalisiert)¹²⁹ und N-terminalen Ende¹³⁰ in Verbindung gebracht wird.¹³¹ Das FosB-Gen besteht aus 4 Exons und 3 Introns. Die Promotorregion befindet sich strangaufwärts von der TATA-Box und enthält mehrere konservierte Sequenzen wie SRE-, CRE- NF-1- und AP-1-Bindungsstellen. Ebenso wie c-Fos ist FosB durch Wachstumsfaktoren induzierbar, formt Heterodimere mit Jun-Proteinen und bindet an *TPA-response-elements* (TREs).¹³² FosB besitzt die Fähigkeit zur negativen Autoregulation, welche wie bei c-Fos über ein SRE vermittelt wird. Beide Proteine haben auch die Möglichkeit, sich gegenseitig negativ zu regulieren.¹³³ Unterschiede zwischen c-Fos und FosB lassen sich in der Gewebespezifität während der Maus-Entwicklung bei *knock-out*-Mäusen aufzeigen und v.a. durch die Entdeckung, dass FosB im Gegensatz zu c-Fos

¹²⁸ Vgl. Brown J. et al., Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. Mol. Cell. Biol. 1998, 18: 5609-5619.

¹²⁹ Vgl. Wisdon R. et al., Transformation by FosB requires a trans-activation domain missing in FosB2 that can be substituted by heterologous activation domains. Genes Dev. 1992 Apr;6(4):667-75.

¹³⁰ Vgl. Wisdon R. et al., Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation. Mol Cell Biol. 1993 May;13(5):2635-43.

¹³¹ Vgl. Schuermann M. et al., FosB is a transforming gene encoding a transcriptional activator. Oncogene. 1991 Apr;6(4):567-76.

¹³² Vgl. Redemann-Fibi B. et al., Stage and tissue-specific expression of fosB during mouse development. Differentiation 1991 Feb;46(1):43-9.

¹³³ Vgl. Lazo P.S. et al., Structure and mapping of the fosB gene. FosB downregulates the activity of the fosB promoter. Nucleic Acids Res. (1992) 20:343-50.

nicht in der Lage ist, die differenzierende Wirkung vom Glukokortikoid-Rezeptor (GR) durch Protein-Protein-Interaktion zu inhibieren.¹³⁴

In Maus-Lymphomzellen konnte nach TPA-Stimulation die Transkription von FosB, c-Fos, c-Jun und Kollagenase induziert werden.¹³⁵ Hinweise für FosB und c-Fos als Vermittler zwischen Serum-Stimulation und Zellzyklusprogression fanden sich in der fehlenden Proliferation von Fibroblasten durch das Unvermögen zur Cyclin-D-Induktion in FosB^{-/-}- und c-Fos^{-/-}-Mäusen nach Serum-Stimulation. FosB^{-/-}/c-Fos^{-/-}-Mäuse waren im Phänotyp 30 % kleiner als c-Fos^{-/-}-Mäuse.¹³⁶ Interessanterweise zeigten FosB^{-/-}/c-Fos^{+/-}-Fibroblasten eine normale Proliferation in der Zellkultur, während FosB^{+/-}/c-Fos^{-/-}-Fibroblasten in gleichem Mass wie FosB^{-/-}/c-Fos^{-/-}-Fibroblasten Defizite bei der Proliferation aufwiesen. Dies ist ein weiterer Hinweis für einen funktionellen Unterschied von FosB und c-Fos. Untersuchungen an FosB^{-/-}-Mäusen zeigten keine histologischen Auffälligkeiten oder offensichtlichen Veränderungen im Phänotyp. In einer Studie werden jedoch Verhaltensauffälligkeiten bei weiblichen Mäusen beschrieben, die sich in einem defizitären Nährverhalten ihrem Nachwuchs gegenüber äusserten. Diese Verhaltensänderung korrelierte mit fehlender FosB-Expression in hypothalamischen Regionen.¹³⁷ Embryonale Stammzellen mit dem Merkmal FosB^{-/-} boten einen regelrechten Übergang in die S-Phase und es konnte keine vermehrte Expression anderer Proteine aus der Fos-Gruppe nachgewiesen werden, um das Defizit an FosB auszugleichen.¹³⁸ Bei der Differenzierung menschlicher Keratinozyten zeigte sich, dass FosB in den Kernen aller epidermalen Schichten zu finden war, wohingegen die anderen AP-1-Proteine eine Gewichtung in jeweils spezifischen Schichten aufwiesen.¹³⁹

Durch alternatives Spleissen entstehen aus dem primären FosB-Transkriptionsprodukt zwei unterschiedliche mRNA-Produkte. Sie kodieren für ein längeres FosB-Protein mit 338 Aminosäuren (~ 45 kD) und für eine kürzere Form, FosB₂, mit einer Deletion von 140 bp in der C-terminalen transaktivierenden Domäne mit 237 Aminosäuren (35 kD). Beim Spleissen für FosB₂ wird ein Stop-Codon im Anschluss an die Leucin-Zipper-Region gesetzt.

FosB₂ bildet mit c-Jun ebenfalls Heterodimere und bindet an AP-1-Zielgene, besitzt jedoch kein transaktivierendes Potential. Darüber hinaus kann FosB₂ die transformierende Eigenschaft von c-Fos und c-Jun über Protein/Protein-Interaktion antagonisie-

¹³⁴ Vgl. Lucibello F.C. et al., Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. EMBO J. 1990 Sep;9(9):2827-34.

¹³⁵ Vgl. Boessen J.J. et al., Concomitant induction of signal transduction pathways and genetic instability by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Carcinogenesis. 1991 Mar;12(3):487-92.

¹³⁶ Vgl. Brown J.R. et al., Fos members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. Mol Cell Biol. 1998 Sep;18(9):5609-19

¹³⁷ Vgl. Brown J.R. et al., 1996 Cell., 86, 297-309

¹³⁸ Vgl. Gruda M.C. et al., Expression of FosB during mouse development: normal development of FosB knockout mice. Oncogene. 1996 May 16;12(10):2177-85.

¹³⁹ Vgl. Welter J.F. et al., Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. Oncogene. 1995 Dec 21;11(12):2681-7.

ren.¹⁴⁰ Aus diesem Grund wird FosB₂ als transnegativer Regulator angesehen. Auf der anderen Seite konnte für FosB₂ in Rat-1A-Zellen auch eine Bedeutung für die Zellzyklusprogression gefunden werden, da es die mRNA-Produkte für Cyclin E und CDK2 nach Serumstimulation stabilisierte¹⁴¹ und zu einer Proliferationszunahme in Rat-1A-Zellen führte, von der angenommen wird, dass sie nicht über AP-1-Zielgene vermittelt wird.¹⁴²

Untersuchungen von FosB-Protein und FosB-mRNA-Expression in Mammakarzinomen führten zu der Annahme, dass eine starke Expression von FosB für eine geregelte Proliferation und Differenzierung epithelialer Brustzellen notwendig ist. Eine hohe FosB-Expression korrelierte mit günstigen prognostischen Markern (niedriges Grading, positiver Rezeptorstatus, niedriger Ki67-Index), mit hoher Rb- und hoher MMP-1-Expression sowie niedriger p16-Expression. Eine niedrige Expression von FosB und der Nachweis von Fra-1 waren im Gewebe von Brustkrebstumoren mit ungünstigen Prognosefaktoren (hohes Grading, negativer Rezeptorstatus, hoher Ki67-Index, starke HER-2/neu-Expression, hoher p16-, CyclinE- und MMP-9-Expression) assoziiert.^{143 144}

Auf Grundlage dieser Ergebnisse erschienen weitere Untersuchungen von FosB und den anderen AP-1-Faktoren in den Mammakarzinomzellen MDA-MD-231 (ER- und PR-negativ) und MCF7 (ER- und PR-positiv) interessant. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Mammakarzinom-Zelllinien transient mit den verschiedenen FosB-Formen (FosB-Wildtyp = H1, FosB₂ und FosB-Mutante = H11) transfiziert und die Zellproteine im Westernblot auf Expressionsänderungen von Zellzyklusregulatoren, Rezeptorstatus, Matrix-Metalloproteinasen und Mitgliedern des uPA-Proteinasekomplexes (PAI-1, uPAR) untersucht.

1.4. Zellzyklus und seine Kontrolle

Eine Zelle durchläuft von einer Teilung zu der nächsten verschiedene Phasen des Zellzyklus. In diesen Phasen werden zwei Vorgänge koordiniert: die DNA-Verdopplung und die eigentliche Zellteilung unter Bildung zweier Tochterzellen. Im Ablauf des Zellzyklus lassen sich vier Phasen beschreiben. Die G1-Phase (engl. *gap* = Lücke) umfasst die Zeit zwischen vorausgegangener Kernteilung (Mitose) und dem Beginn der DNA-Synthese. In der S-Phase (Synthese-Phase) wird die DNA repliziert und die G2-Phase, die der S-Phase folgt, endet mit der nächsten Kernteilung (M-Phase). G1-, S-

¹⁴⁰ Vgl. *Mumberg D. et al.*, Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins; *Genes and Develop.*, 1991, 5:1212-1223.

¹⁴¹ Vgl. *Oda S. et al.*, Stabilization of cyclin E and cdk2 mRNAs at G1/S transition in Rat-1A cells emerging from the G0 state. *Oncogene*. 1995 Apr 6;10(7):1343-51.

¹⁴² Vgl. *Nakabeppu Y. et al.*, Proliferative activation of quiescent Rat-1A cells by δ FosB. *Mol Cell Biol*. 1993 Jul;13(7):4157-66.

¹⁴³ Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas. *Breast-Canc.-Res.-Treat*. 2003; 77:265-275.

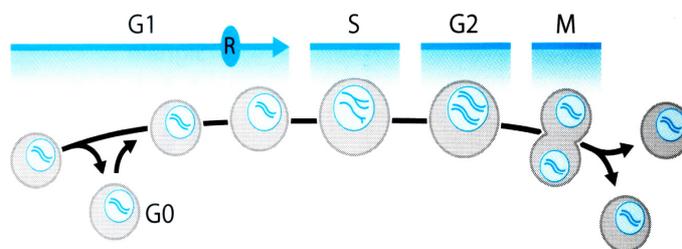
¹⁴⁴ Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, Expression pattern of AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int. J. of can.* (1999) 84:533-8.

und G2-Phase werden als Interphase zusammengefasst. Der Zellzyklus und die einzelnen Zellzyklusphasen dauern je nach Zellart unterschiedlich lang. In Säugetierzellen kann von einer Dauer von 10-30 Stunden ausgegangen werden, wobei für die S-, G2- und M-Phase eine weitgehend konstante Zeit von 10 Stunden benötigt wird, während der Zeitbedarf für die G1-Phase stark variiert.

Die entscheidende Phase für die Regulation von Proliferation und Differenzierung durch externe Faktoren ist die G1-Phase. Aus dieser Phase kann die Zelle in Phasen der Differenzierung eintreten. Wenn differenzierte Zellen noch in den Zellzyklus zurückkehren können, befinden sie sich in der sog. G0-Phase des Zellzyklus. Treten sie aus der G0-Phase in die terminale Differenzierung ein (G_T), ist eine Zellteilung nicht mehr möglich.¹⁴⁵ Ein alternativer Weg ist die Apoptose, der programmierte Zelltod. Normalerweise unterliegen Zellteilung, Differenzierung und Apoptose genauen homöostatischen Kontrollmechanismen. Im neoplastischen Gewebe ist das Gleichgewicht in Richtung Proliferation verschoben und/oder der Untergang von Zellen durch Apoptose blockiert.¹⁴⁶

Um eine ordnungsgemäße Übertragung der genetischen Information von der Mutterzelle auf die beiden Tochterzellen zu garantieren, gibt es im Verlauf des Zellzyklus verschiedene Kontrollpunkte (engl. *checkpoints*). Ein wichtiger Kontrollpunkt liegt in der späten G1-Phase vor der Verdopplung der DNA in der S-Phase (*G1/S-checkpoint*).

Abbildung 7: Zellzyklus



Dort befindet sich auch der sog. Restriktionspunkt, nach dessen Überschreitung die folgenden Phasen des Zellzyklus serumunabhängig, d.h. ohne Einfluss von äusseren Faktoren, ablaufen.¹⁴⁷ Weitere Punkte befinden sich in der späten G2-Phase (*G2/M-checkpoint*) und in der M-Phase (Spindelkontrollpunkt).¹⁴⁸

Der Weg einer Zelle durch die G1-Phase wird von äußeren Faktoren bestimmt. Dazu zählen Nährstoffe, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie Adhäsionsmolekü-

¹⁴⁵ Vgl. Cooper G.M., The Cell. A molecular approach. ASM Press, Washington, 1997.

¹⁴⁶ Vgl. Franks L.M. et al., Introduction to cellular and molec. biolog. of canc.; Oxf. Univers. Press, 1997.

¹⁴⁷ Vgl. Pardee A.B., A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. 1974; 71:1286-1290.

¹⁴⁸ Vgl. Elledge S.J. et al., Cell cycle checkpoints : preventing an identity crisis. Science, 1996: 274:1664.

le, die den Kontakt zur extrazellulären Matrix vermitteln.¹⁴⁹ An dieser Stelle wird eine Vielzahl von unterschiedlichen wachstumsstimulierenden und -hemmenden Signalen erfasst, prozessiert und koordiniert und so um eine Entscheidung über das Schicksal der Zelle getroffen.

1.4.1. CDKs und Cycline

Die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK, engl. *cyclin dependent kinases*) reguliert. CDKs sind Prozessoren vergleichbar, die intra- und extrazelluläre Signale koordinieren und so den ungestörten Übergang durch verschiedene Phasen des Zellzyklus garantieren. CDKs phosphorylieren Zielproteine an Serin- oder Threoninresten und sind so in der Lage, Signale zu verstärken und auf eine große Zahl verschiedener Zielproteine zu übertragen.¹⁵⁰ In vielen humanen Tumoren phosphorylieren und inaktivieren sie Tumorsuppressorgene (z.B. pRb).¹⁵¹

CDKs erfordern die Assoziation mit einem Cyclinpartner, um als aktives Holoenzym wirksam zu sein. In menschlichen und tierischen Zellen kommen verschiedene Cycline vor, die im Verlauf mit unterschiedlichen CDKs (CDK 1, 2, 4, 5 und 6) zu definierten Komplexen zusammentreten. Gut charakterisierte Cycline sind die Cycline A, B1, B2, D1-3 und E. Im allgemeinen ist der Gehalt an CDKs während des Zellzyklus relativ konstant, während die der Cycline deutlich variiert. Dieser Umstand weist darauf hin, dass die Aktivität der Cyclin/CDK-Komplexe in erster Linie durch die Verfügbarkeit des jeweiligen Cyclins gesteuert wird.¹⁵² Die Aktivität der CDKs wird zudem durch Phosphorylierung reguliert. Ihre volle Aktivität erreichen sie durch eine Phosphorylierung an einem konservierten Threoninrest. Die Aktivität von CDK-Cyclin-Komplexen kann schliesslich durch Assoziation mit inhibitorischen Proteinen, den CKIs (engl. *cyclin dependent kinases inhibitors*), durch Phosphorylierung an einem weiteren Threonin- oder Tyrosinrests und durch proteolytischen Abbau beendet werden.¹⁵³

D-Cycline sind die ersten Cycline, die im Zellzyklus nach Abschluss der Mitose nachweisbar sind. Ihre regulatorische Bedeutung ist v.a. auf die G1-Phase gerichtet. Sie assoziieren hauptsächlich mit CDK 4 und CDK 6, zwei alternativen Partnern, deren funktioneller Unterschied noch ungeklärt ist. In den letzten Jahren wurden insbesondere beim Mammakarzinom CDK-unabhängige Cyclin-D-Aktivitäten entdeckt: Bei 15-20 % aller Mammakarzinome liegt das Cyclin-D1-Gen auf Chromosom 11q13 amplifiziert vor. Eine mRNA- und/oder Proteinüberexpression wurden sogar in über

¹⁴⁹ Vgl. Pardee et al., G1 events and regulation of cell proliferation. Science, 1989; 246:603.

¹⁵⁰ Vgl. Morgan D.O., CDKs: engines, clocks and microprocessors. Annu. R. Cell. Dev. Biol., 1997; 13:261.

¹⁵¹ Vgl. Bernards R., CDK-independent activities of D type cyclins. Biochim Acta, 1999, 1424: 17-22.

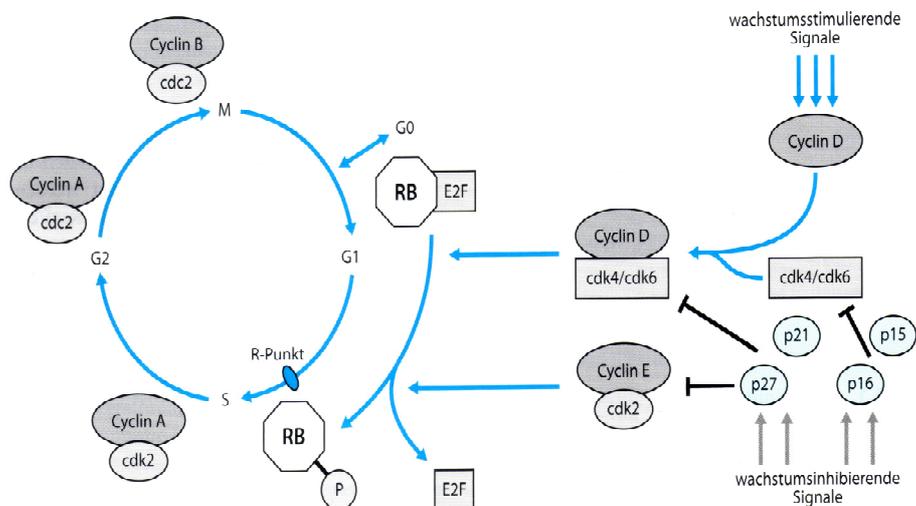
¹⁵² Vgl. Evans T. et al., Cyclin: a protein that is specified by maternal mRNA in sea urchin eggs. Cell 1983 33:389-396.

¹⁵³ Vgl. Grana X. et al., Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, CDKs and CKIs; Oncogene 1995; 11:211-219.

50 % der Fälle gefunden, was auf eine Dysregulation auf verschiedenen molekularen Ebenen hinweist.¹⁵⁴

In der späten G1-Phase und der frühen S-Phase tritt Cyclin E im Komplex mit CDK 2 auf. Die Aktivität dieses Komplexes scheint essenziell für den Eintritt in die S-Phase. Er ist bei einigen Mammakarzinomen überexprimiert und scheint mit niedrigen Cyclin-D1-Werten und Östrogenrezeptornegativität zu korrelieren, was in der Zukunft prognostische Bedeutung erlangen könnte.¹⁵⁵ Cyclin E beschleunigt den Übergang von der G1-zur S-Phase.¹⁵⁶ In Mammakarzinomzelllinien wird das Cyclin-E-Protein sowohl in seiner *full-length*-Isoform als auch in seiner *low-molecular-weight*-(LMW)-Isoform häufig überexprimiert nachgewiesen. Dies führt zu einer chromosomalen Instabilität und ist mit einem onkogenen Potenzial verbunden.¹⁵⁷ In einer Studie mit einer semiquantitativen Analyse von Cyclin E mittels Westernblot zeigte sich eine starke, unabhängige und statistisch signifikante prognostische Bedeutung des Gesamt-Cyclin-E und der Konzentration der LMW-Isoform.¹⁵⁸

Abbildung 8: Zellzyklus, CDK's und Cycline



Im weiteren Verlauf der S-Phase wird Cyclin E durch Cyclin A ausgetauscht. In der G2- und M-Phase ist CDK 1 die dominierende Kinase, die im Komplex mit Cyclin A und Cyclin B vorliegt. Die Aktivierung von CDKs in der G1- und S-Phase geht mit einer Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) einher.

¹⁵⁴ Vgl. Van Diest P.J. et al., Cyclin D expression in breast cancer, Am. J. Path. (1997) 150: 705-711.
¹⁵⁵ Vgl. Nielsen N.H. et al., Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer, Br. J. Cancer (1996) 74: 874-880.
¹⁵⁶ Vgl. Keyomarsi K. et al., Cyclin E and survival in patients with breast cancer; N. Eng. J. Med. 347: 1566-1575.
¹⁵⁷ Vgl. Bortner D.M. et al., Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. (1997) Mol. Cell Biol. 17: 453-459.
¹⁵⁸ Vgl. Keyomarsi K. et al., Cyclin E and survival in patients with breast cancer; N. Eng. J. Med. 347: 1566-1575.

P21 ist ein CDK-Inhibitor, welcher die D- und E-Cyclin-abhängigen Kinasen hemmt und unter direkter Kontrolle von p53 und indirekter Kontrolle von p19 steht. In normalen Zellen liegt p21 in einem Komplex mit Cyclin, CDK und PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) vor. PCNA ist eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ . Diesen Erkenntnissen zufolge kann p21 den Zellzyklus durch Interaktion mit CDK-Cyclin-Komplexen und durch Störung der DNA-Replikation in der S-Phase hemmen.¹⁵⁹

1.4.2. Das Retinoblastomgen

Das Rb-Gen ist ein Tumorsuppressorgen. Die Inaktivierung des Rb-Proteins spielt für die Genese menschlicher Tumoren eine wichtige Rolle. In Tumoren wie z.B. dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem Blasen-, Prostata- und dem Mammakarzinom werden mutierte Rb-Proteine exprimiert. Dabei sind immer beide Allele inaktiviert.¹⁶⁰ Das Rb-Gen kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein mit einer relativen Molmasse von 105 kD. Daneben kommen zwei strukturverwandte Proteine vor, die nach ihrer Molmasse unterschieden werden (p107-Rb und p130-Rb).¹⁶¹

Der Funktions- und Phosphorylierungsstatus des Rb-Proteins korreliert eng mit dem Zellzyklus. Eine Vielzahl von Forschungsergebnissen der letzten Jahre haben das Rb-Protein als das entscheidende Protein bei der Kontrolle des Restriktionspunktes (R-Punkt) identifiziert. Im un- oder hypophosphorylierten Zustand blockiert das Rb-Protein die Passage des R-Punktes. Mit zunehmendem Phosphorylierungsgrad verliert das Rb-Protein seinen wachstumshemmenden Einfluss und erlaubt den Eintritt in die späte G1-Phase und so den Durchlauf der Zelle durch den gesamten Zellzyklus.¹⁶² Auf Grund der Bedeutung von Rb bei der Regulation von Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose ist das Protein als entscheidendes Substrat der CDKs in der G1-Phase anzusehen.¹⁶³

Die Phosphorylierung von Rb geschieht *in vivo* v.a. durch Cyclin-E-CDK-2- und Cyclin-D-CDK-4/CDK-6-Komplexe (s. Abb. 9), welche somit für die Überschreitung des Restriktionspunktes und für den Eintritt der Zelle in die S-Phase entscheidend sind¹⁶⁴. Eine Inaktivierung von Rb kann also durch eine erhöhte Expression von CDKs bzw. Cyclinen oder dem Verlust von CDK-Inhibitoren erklärt werden.

¹⁵⁹ Vgl. Grana X. et al., Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, CDKs and CKIs; *Oncogene* 1995; 11:211-219.

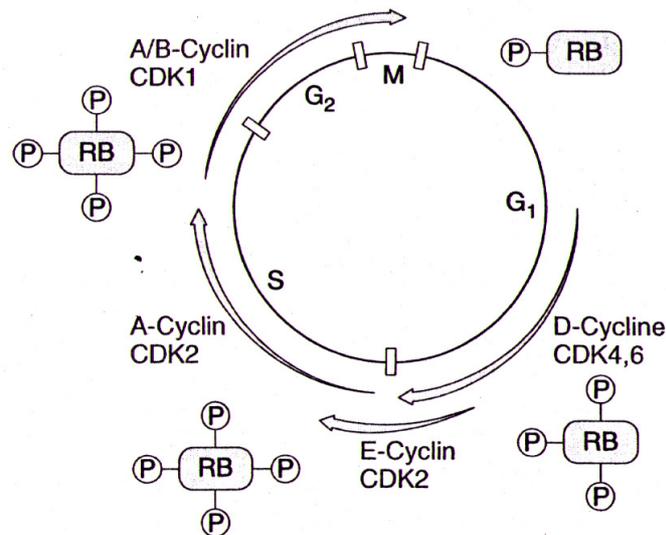
¹⁶⁰ Vgl. Levine A.J., The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1993, 62:623.

¹⁶¹ Vgl. Mulligan G. et al., The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends. Genet.* 1998, 14:223.

¹⁶² Vgl. Weinberg R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995, 81:323.

¹⁶³ Vgl. Weinberg R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control; *Cell* 1995, 81:323.

¹⁶⁴ Vgl. Dowdy S.F. et al., Physical interaction of the RB-protein with human cyclins. *Cell* 1994, 73:499.

Abbildung 9: Rb im Zellzyklus

Effektorfunktionen des un- oder hypophosphorylierten Rb-Proteins bestehen in der Bindung zahlreicher Proteine, die mit dem Transkriptionsapparat der Zelle interagieren (z.B. E2F, ELF-1, MyoD, ATF-2 und c-Abl).¹⁶⁵ Die Tatsache, dass die durch aktives, hypophosphoryliertes Rb inaktivierten E2F-Transkriptionsfaktoren in vielen Zellen für die Überschreitung des Restriktionspunkts und den Eintritt in die S-Phase ausschlaggebend sind, führt zu der Annahme, dass eine Störung von Rb-Signalwegen eine wichtige Bedingung für die ungerichtete Proliferation von Tumorzellen ist.¹⁶⁶

Abgesehen von der direkten Einwirkung durch Cyclin/CDK-Komplexe wird der Phosphorylierungsgrad und damit der Aktivitätsgrad des Rb-Proteins auch von anderen extrazellulären Signalen bestimmt, die auf direktem Weg oder indirekt über Cyclin/CDK-Komplexe die Rb-Aktivität verändern können.^{167 168} So ist z.B. die Bindung von Rb und seine Inaktivierung durch das E7-Protein von Papilloma-Tumoviren (HPV) ein Hinweis dafür, dass ein funktionelles Rb-Protein an der Kontrolle von Proliferation und Zellzyklus einen entscheidenden Anteil hat und als negativer Regulator des Zellzyklus angesehen werden kann.¹⁶⁹

¹⁶⁵ Vgl. Nevins J.R., Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Different.* 1998; 9:585-593.

¹⁶⁶ Vgl. Wang et al., 1994.

¹⁶⁷ Vgl. Liu J.J. et al., Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15:3654-3663.

¹⁶⁸ Vgl. Resnitzky D. et al., Acceleration of the G1/S-Phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14:1669-1679.

¹⁶⁹ Vgl. Dyson N. et al., The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. *Science* 1989, 243:934-937.

1.5. Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer Gruppe von sezernierten oder membranständigen Enzymen, die extrazelluläre Komponenten wie Kollagen, Laminin und Proteoglykane abbauen können.¹⁷⁰

MMPs sind unter physiologischen Bedingungen an der Remodellierung des Bindegewebes (z.B. während der Embryogenese) und an Wachstum und Involution hormonabhängiger Organe beteiligt. Aus der Beobachtung, dass die Invasion menschlicher und tierischer Tumorzellen in bindegewebigen Membranen durch Proteinasehemmer blockiert werden kann, wurde für MMPs eine wichtige Rolle bei der Metastasierung und Invasion maligner Tumoren abgeleitet.¹⁷¹ Eine Vielzahl von Versuchen schreibt den MMPs eine Bedeutung bei der Tumorprogression,¹⁷² dem invasiven Wachstum,¹⁷³ der bindegewebigen Organisation von Tumoren¹⁷⁴ und der Tumordifferenzierung zu.¹⁷⁵

Allen MMPs ist eine strukturell homologe aminoternale Region mit einem Signalpeptid und einer Propeptiddomäne von 10 kDa gemeinsam, die bei Aktivierung der Enzyme abgespalten wird. Wie andere Proteinasen werden die MMPs in Form inaktiver Proenzyme synthetisiert. Die Aktivierung kann durch Autokatalyse oder durch andere Proteinasen erfolgen. Die katalytische Domäne weist ein aus fünf Aminosäuren bestehendes Motiv auf, welches für die Bindung von Zinkionen und die enzymatische Aktivität essenziell ist. Die meisten MMPs enthalten eine C-terminal-gelegene Haemopexin-Domäne und eine Scharnier-Region (engl. *hinge*). Subgruppenabhängig kommen eine Transmembrandomäne, ein zytoplasmatischer Anhang (engl. *cyto-plasmatic tail*), ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, eine Furin-Erkennungsregion, Fibronectin-Typ-II-Repeats, ein N-terminaler-Anker u.a. vor (s. Abb. 10).¹⁷⁶

Die Aktivität der MMPs wird durch Inhibitoren reguliert. Neben dem Serumprotein α_2 -Makroglobulin als generellen Inhibitor gibt es eine Gruppe spezifischer, im Gewebe vorkommender Inhibitoren, die sog. TIMPs (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*).¹⁷⁷

¹⁷⁰ Vgl. Cottam D.W. et al., Int. J. Oncol., 1993; 2:861-872.

¹⁷¹ Vgl. Powell W.C. et al., Complex roles of MMPs in tumor progression. Curr. Microbiol., 1996; 213.

¹⁷² Vgl. Khokha R. et al., Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of melanoma cells in vivo by the overexpression of TIMP-1. J. Can. Inst. 86 (1994) 299.

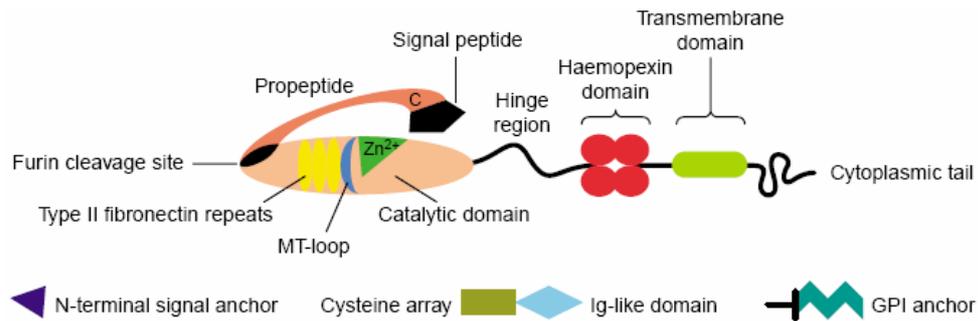
¹⁷³ Vgl. Thorgeirsson U.P. et al., Effect of natural protease inhibitors and a chemoattractant on tumor cell invasion in vitro. J. Nat. Can. Inst. 69 (1982) 1049.

¹⁷⁴ Vgl. Davies B. et al., A synthetic MMP-Inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice. Can. Res. 53 (1993) 2087.

¹⁷⁵ Vgl. Boudreau M.E. et al., Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. Science 267 (1995) 891.

¹⁷⁶ Vgl. Okada Y. et al., J. Biol. Chem., 1992; 267:21712-21719.

¹⁷⁷ Vgl. Durko M.J. et al., The metalloproteinases and their inhibitors. Springer, 1996.

Abbildung 10: Allgemeine Struktur von MMPs¹⁷⁸

In den induzierbaren MMPs (MMP-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13) kann ein AP-1-Element (TRE) in der Promotorregion gefunden werden. Die Bedeutung zusätzlich vorhandener AP-1-Elemente in den Promotoren von MMP-1, -3 und -9 ist nicht geklärt. Sie zeigen eine erhöhte Expression unter gesteigerter AP-1-Bindungsaktivität.^{179,180,181} Für MMP-1, MMP-2 und MMP-9 konnte eine starke Expression im Brusttumorgewebe gefunden werden.¹⁸²

MMP-1 (Intestinale Proteinase) bindet an die Kollagen-Typen I, II, III, VII, VIII und X. MMP-1 wird als Proenzym mit einer Größe von 57 kDa sezerniert, zu einer 52-kDa-Form N-glykosyliert und proteolytisch in seine aktive Form (46/42 kDa) gespalten. Die Aktivierung erfolgt *in vitro* durch Proteinase (z.B. Plasmin und Trypsin) und *in vivo* durch Plasmin und MMP-3. MMP-1 kann extrazelluläre Matrix abbauen. Aus diesem Grund wird angenommen, dass das Enzym eine Bedeutung bei Prozessen wie rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis und maligner Zellinvasion hat.¹⁸³

Eine erhöhte MMP-1-Expression konnte in Bronchialkarzinomen¹⁸⁴, squamösen Zellkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs¹⁸⁵ und in kolorektalen Tumoren nachgewiesen werden, wobei das Ausmaß der MMP-1-Expression bei letzteren mit einer schlechten Prognose korrelierte.¹⁸⁶ In all diesen Tumoren war die Expression von MMP-1 am höchsten in den tumorangrenzenden Stromazellen.

MMP-9 (Gelatinase B) wird als ein Zymogen von 92 kDa sezerniert und durch proteolytische Spaltung in eine aktive Form von 83 kDa überführt. MMP-9 zeigt eine Sub-

¹⁷⁸ Expert reviews, Vol. 5, Cambridge University Press, Sept. 2003.

¹⁷⁹ Vgl. Mackay A.R. et al., Effect of phorbol ester and cytokines on MMP and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion Metastasis*. 1992;12(3-4):168-84.

¹⁸⁰ Vgl. Balbin M. et al., Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS*. 1999 Jan;107(1):45-53.

¹⁸¹ Vgl. Smith L.M. et al., cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*. 1999 Oct 28;18(44):6063-70.

¹⁸² Vgl. Iwata H. et al., Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res*. 1996 Jun;87(6):602-11.

¹⁸³ Vgl. Liotta L.A. et al., In seminars in cancer biology. M.M. Gottesmann, 1990; Vol. 1:99-106.

¹⁸⁴ Vgl. Bolon I. et al., (1996) Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c- Ets-1 during progression of precancerous bronchial lesions. *Lab. Invest.* 75,1-13.

¹⁸⁵ Vgl. Johansson N. et al., (1997) Expression of MMP-13 in SCC of the head and neck. *Am. J. Pathol.* 151,499-508.

¹⁸⁶ Vgl. Murray G. I. et al., (1996) MMP-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat. Med.* 2,461-462.

stratspezifität gegenüber Typ IV- und Typ V-Kollagen, Gelatin und Elastin.¹⁸⁷ MMP-9 wird reichlich in verschiedenen bösartigen Tumoren und im Mammakarzinom¹⁸⁸ exprimiert, aber auch in Entzündungszellen wie Gewebsmakrophagen und Eosinophilen.¹⁸⁹ Vergleiche von MMP-9-Expression mit dem klinischen Staging in Brusttumorgewebe zeigten, dass das inaktive Zymogen (proMMP-9) v.a. in frühen klinischen Stadien dominierte, während bei fortgeschrittener Erkrankung beide Formen auftraten.¹⁹⁰ In den hier durchgeführten Versuchen wurde die Expression von MMP-1 und MMP-9 in Mammakarzinom-Zelllinien untersucht. Beide Enzyme werden in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, T47D und MCF-7 exprimiert, jedoch nicht in normalen epithelialen Brustkrebszelllinien.¹⁹¹

1.6. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Das Mammakarzinom betrifft ungefähr acht Prozent der weiblichen Bevölkerung und ist damit der häufigsten bösartige Tumor der Frau.¹⁹² Trotz grosser Fortschritte der letzten Jahre in der frühen Diagnosestellung, der chirurgischen Therapie und adjuvanter Therapiemaßnahmen hat sich die Prognose der Patientinnen nicht befriedigend verbessert. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass die gegenwärtig verwendeten Risikofaktoren, die die Entscheidungsgrundlage für adjuvante Behandlungsempfehlungen darstellen, für eine zuverlässige Prognosestellung bei der individuellen Mammakarzinompatientin nicht ausreichend sind. Daher sind zusätzliche Prognosefaktoren notwendig, die zusammen mit den gesicherten klinisch-pathologischen Faktoren die Erstellung eines optimalen Risikoprofils erlauben. Bei der Evaluierung werden zunehmend solche Faktoren berücksichtigt, die das Invasionsverhalten und Metastasierungspotenzial des Primärtumors reflektieren.¹⁹³

In früheren Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass eine starke Expression von FosB in der Immunhistologie von Mammakarzinomen signifikant mit einem positiven Rezeptorstatus für ER und PR und im Tumorgewebe mit einem gutdifferenzierten Tumortyp (G1-2) korrelierte.¹⁹⁴ So ergab sich der Schluss, dass FosB ein positiver Prognosefaktor für das Mammakarzinom sein könnte.

¹⁸⁷ Vgl. *Liotta L.A. et al.*, In seminars in cancer biology. M.M. Gottesmann, 1990; Vol. 1:99-106.

¹⁸⁸ Vgl. *Heppner K. J. et al.*, (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am. J. Pathol.* 149,273-282.

¹⁸⁹ Vgl. *Stähle-Bäckdahl M. et al.*, (1993) 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 142,995-1000.

¹⁹⁰ Vgl. *Rha S.Y. et al.*, Sequential production and activation of matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Apr;43(2):175-81.

¹⁹¹ Vgl. *Bartsch J.E. et al.*, MMP expression in breast cancer; *J.-Surg.-Res.* 2003; 110(2):383-392.

¹⁹² Vgl. *Jemal A. et al.*, Cancer Statistics, 2003. *CA Can. J. Clin.* 2003; 53:5-26.

¹⁹³ Vgl. *Isaacs C. et al.*, New progn. factors for breast cancer recurrence. *Semin. Oncol.* 2001; 28:53-67.

¹⁹⁴ Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of FosB expression with a well-differentiated, receptor-pos. phenotype; *Int. J. Cancer*, 1999, 84:533-538.

Daraus wurden für die hier vorgelegte Arbeit folgende Fragestellungen abgeleitet:

1. Welche Auswirkung hat die Stimulation mit dem Tumorpromotor TPA auf die Expression von AP-1-Faktoren, auf andere Zielgene wie Zellzyklusregulatoren und Mitglieder der MMP- und uPA-Proteinasesysteme?
2. Welche Auswirkungen hat die transiente Transfektion von FosB auf die Expression von Zellzyklusproteinen (Cyclin B, Cyclin D1, Cyclin E, p21, Rb, Rb2) und von anderen möglichen Zielgenen (MMP-1, MMP-9, ER und PR, uPAR, PAI-1) in den Mammakarzinomzelllinien? Gibt es Unterschiede für die verschiedenen FosB-Expressionsplasmide (H1, FosB₂, H11)?
3. Kann durch transiente Transfektion mit FosB die Expression von ER und PR in einer hormonrezeptornegativen Mammakarzinom-Zelllinie induziert werden?
4. Welche Expression zeigen AP-1-Proteine in ER-negativen Brustkrebszelllinien nach transienter Transfektion mit ER und Stimulation mit E₂ (17- β -Östradiol)?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Alle Zelllinien sind bei der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) erworben worden.

2.1.1.1 MDA-MB-231 (ATCC® HTB 26™)

Adenokarzinom der Brust

Negativer Rezeptorstatus für Progesteron und Östrogen

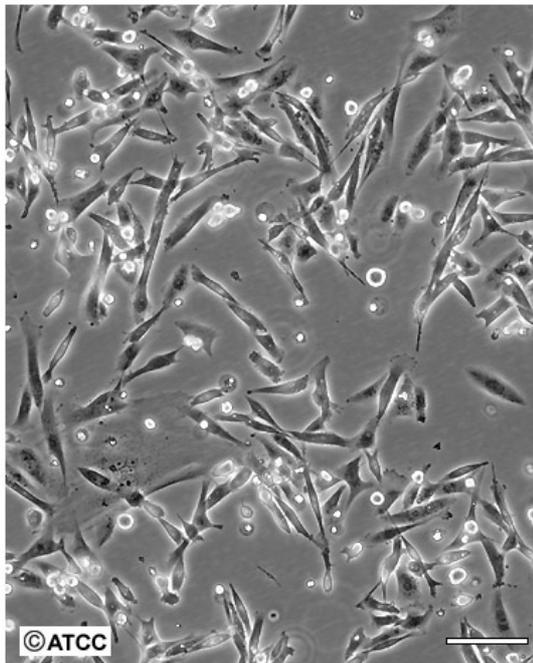
Patientendaten: weiblich, 51 Jahre, Kaukasierin, Blutgruppe 0 Rhesus negativ

Morphologie: mesenchymal; Wachstum: adhärent, Monolayer

Kulturmedium: L(Leibovitz)-15 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) mit 10 % FCS, 5 % L-Glutamin und 5 % Penicillin/Streptomycin

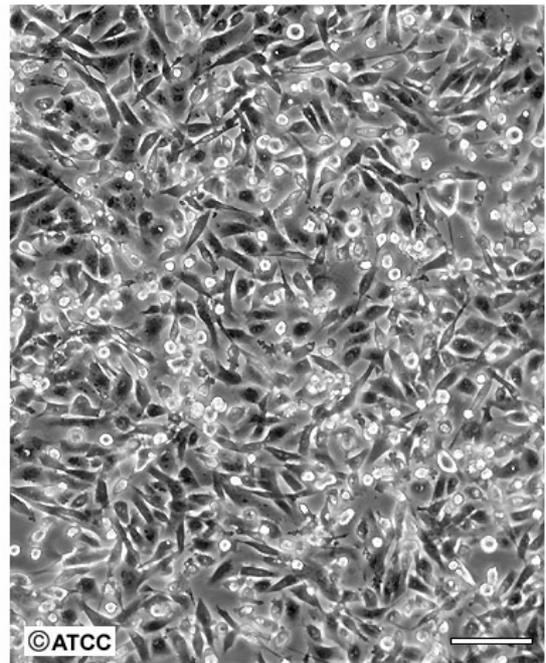
Abbildung 11: Wachstumsmuster der MDA-MB-231-Zelllinie

ATCC Number: **HTB-26**
Designation: **MDA-MB-231**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

2.1.1.2 MCF-7 (ATCC® HTB 22™)

Adenokarzinom der Brust

Positiver Rezeptorstatus für Östrogen und Progesteron

Patientendaten: weiblich, , 69 Jahre, Kaukasierin, Blutgruppe 0 Rhesus positiv

Morphologie: epithelial; Wachstum: adhärent

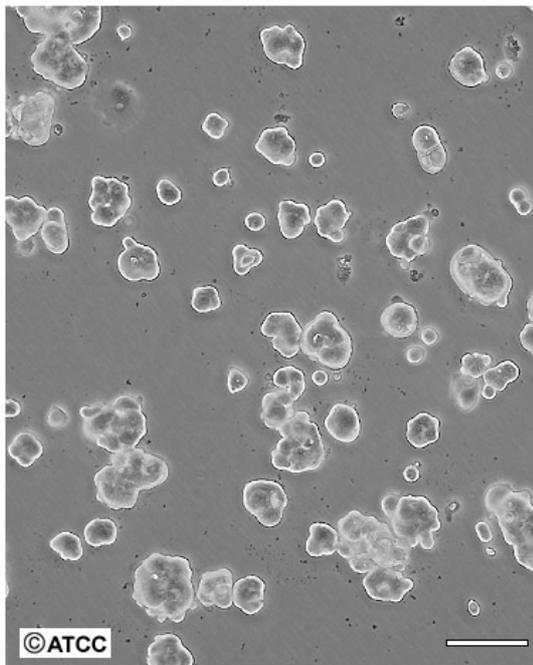
Verdopplungszeit: 29 Stunden

Zelluläre Produkte: insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) BP-2; -4; -5

Kulturmedium: L(Leibovitz)-15 (GIBCO, Gaithersburg, MD) mit 10 % FCS, 5 % L-Glutamin, 5 % Penicillin/Streptomycin, Insulin (10 mg/ml)

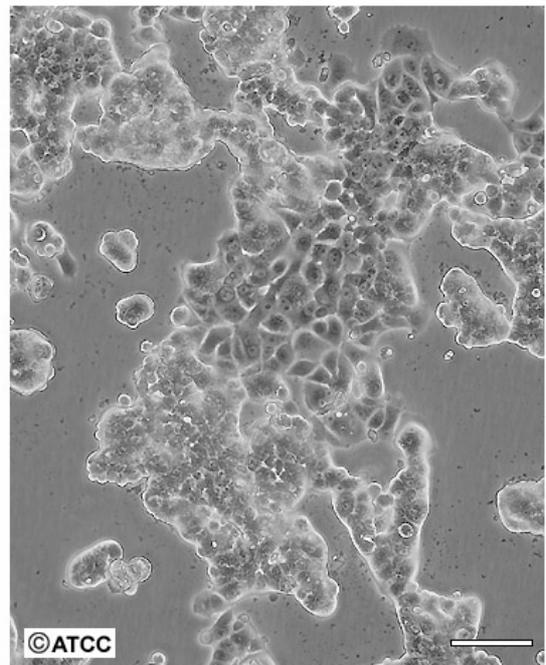
Abbildung 12: Wachstumsmuster der MCF-7-Zelllinie

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**



Low Density

Scale Bar = 100μm



High Density

Scale Bar = 100μm

2.1.2. Plasmide

Plasmide sind kleine, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich in der Bakterienzelle getrennt von dem grösseren Bakterienchromosom befinden. Sie können sich unabhängig vom bakteriellen Chromosom replizieren, da sie ihre eigenen Replikationsstartpunkte besitzen.¹⁹⁵ In den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zu AP-1-Faktoren wurde die genetische Information für FosB (H1 und H11), FosB₂, c-Fos, Fra-1, Fra-2 und ER in Form von Expressionsvektoren in die beiden Mammakarzinom-Zelllinien transient transfiziert. Nachfolgend wurde an den Proteinextrakten die Expression von Zellzyklusproteinen und AP-1-Proteinen im Westernblot untersucht. Die Plasmide waren von Milde/Bamberger konstruiert und sequenziert worden. Sie wurden bei +4°C in einer Konzentration von 1 µg/µl gelagert.

2.1.2.1 Konstruktion der Plasmide

Für die Konstruktion der Plasmide wurde die vollständige cDNA-Sequenz des gewünschten Gens (z.B. FosB) mittels PCR und entsprechenden Primern amplifiziert, d.h. es wurde eine grosse Anzahl von Kopien eben dieses Gens erstellt. Diese Gesamt-cDNA-Sequenz, d.h. die Fremd-DNA, wurde mit den Restriktionsnukleasen *HindIII* und *BamHI* im Bereich der Primer geschnitten. Um die Restriktionsfragmente in die Vektor-DNA einzubauen und einen optimalen Zusammenschluss durch gleiche Schnittstellen zu ermöglichen, wurde diese in der sog. Klonierungsstelle (engl. *cloning sites*) mit den gleichen Restriktionsnukleasen geschnitten.

Als Vektor-DNA diente pcDNA 3.1(+) (Herkunft: Invitrogen, San Diego, CA, USA). Nach der Öffnung (d.h. Linearisierung)¹⁹⁶ von pcDNA 3.1(+) wurden die Restriktionsfragmente der Fremd-DNA zugegeben. Beide DNAs wurden durch ein Ligase kovalent verknüpft. Auf diese Art sind DNA-Ringe mit Vektoranteilen und eingebauten Fremd-DNA-Stücken entstanden. Um eine Wiedervereinigung der geschnittenen Vektor-DNA zu verhindern und den Einbau von Fremd-DNA zu fördern, wurde die Fremd-DNA im Überschuss zugefügt. Um nun eine beliebig grosse Menge von dem gewünschten Plasmid zu erhalten, wurde das Plasmid in *E. coli*-Zellen (Stamm K12) eingeschleust. Dort vermehrte sich das Vektor-Genom-DNA-Molekül wie ein gewöhnliches Plasmid. Da jede Bakterienzelle nur ein DNA-Molekül aufnimmt, erhält man nach deren Wachstum durch Isolierung einzelner Bakterienkolonien homogene Zellpopulationen, die nur einen DNA-Inserttyp besitzen. Das Vektor-Genom-DNA-Konstrukt wurde somit kloniert.

¹⁹⁵ Vgl. B. Alberts et. al., Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, WILEY-VCH Verlag 2001.

¹⁹⁶ Vgl. Knippers, Rolf, Molekulare Genetik, Thieme 2001, S.290.

Die kompetenten Bakterienzellen nahmen das Plasmid nach Vorbehandlung mit Calcium-Salzen durch Transformation auf und wurden anschliessend auf Agar-Platten verteilt, um sich zu getrennten Kolonien zu entwickeln. Die Agar-Platten enthielten das Antibiotikum Ampicillin, so dass sich nur die *E. coli*-Zellen mit der Eigenschaft der Ampicillin-Resistenz, d.h. mit aufgenommenem und exprimiertem Plasmid, vermehren konnten. In einer Minipräparation wurden die Plasmide aus den *E. coli*-Zellen isoliert. Um sicherzustellen, dass die gewonnenen Plasmide aus einem Klon stammen und die genetische Information des gewünschten Transkriptionsfaktors trugen (z.B. FosB), wurde erstens mittels PCR-Technik das gewünschte Insert im Plasmid nachgewiesen und zweitens die DNA-Sequenz in ausgewählten Klonen durch direkte Sequenzierung bestimmt. Ein Klon mit korrekter Sequenz der einklonierten cDNA wurde in einem grösseren Ansatz vermehrt. Im Rahmen einer grösseren Plasmidpräparation (Maxiprep) wurden für folgende Versuche grössere Plasmidmengen isoliert.

2.1.2.2 Art und Aufbau der eingesetzten Plasmide

*** FosB-H1 (Wildtyp):**

Expressionsvektor für FosB (Milde/Bamberger 9/00)

PCR-Produkt für FosB-cDNA in pcDNA3.1+ (*HindIII* - *BamHI*)

Sequenzierung: Wildtyp (09/2000)

Insert: 1,1 kb

*** FosB-H11 (Mutante):**

Expressionsvektor für FosB-Mutante (Milde/Bamberger 9/00)

PCR-Produkt für FosB-cDNA aus HBL-100-DNA, kloniert in pcDNA3.1+ (*HindIII* - *BamHI*), Insert: 1,1 kb

Sequenzierung (09/2000): AS-Austausch an Stelle 309: Prolin gegen Leucin (transaktivierende Domäne)

*** FosB2-M7:**

Expressionsvektor für FosB2 (Milde/Bamberger 12/00)

PCR-Produkt für FosB2-cDNA in pcDNA3.1+ (*HindIII* - *BamHI*)

Insert: 0,97 kb (gegenüber FosB fehlen 140 bp in Exon 4)

Sequenzierung: FosB2-Wildtyp (12/2000)

*** c-Fos:**

Expressionsvektor für c-fos (zur Verfügung gestellt von Dr. Birgit Gellersen)

PCR-Produkt für c-fos-cDNA in pcDNA3.1+

*** Fra-1:**

Expressionsvektor für Fra-1 (Milde/Bamberger 12/01)

PCR-Produkt für Fra-1cDNA von MDA-MB-231 kloniert in pcDNA3.1+ (*HindIII* – *BamHI*); Insert: 0,88kb;

Sequenzierung: Fra-1 Wildtyp (01/02) entsprechend Genbank No. X16707

*** Fra-2 (Klon 9):**

Expressionsvektor für Fra-2 (Milde/Bamberger 02/02)

PCR-Produkt für Fra-2-cDNA von MDA-MB-231 kloniert in pcDNA3.1+ (*HindIII* – *BamHI*); Insert: 1,02 kb

Sequenzierung: Fra-2-Wildtyp (02/02) entsprechend Genbank No. X16706;

2 stille Mutationen in den Kodons 101(cct-ccc) und 326 (gct-gcg)

*** ER (#67, RSV-hER):**

Expressionsvektor für hER; unbekannter Vektor mit RSV-Promotor

Insert: *human estrogen receptor* cDNA (ca. 2 kb)

Diagnostische Schnittstellen *KpnI/SstI* bei 19, 4 kb

Leervektor: mock #38

*** pcDNA 3.1 (+):**

Leervektor, kein Insert

Grösse: 5,4 kb; Herkunft: Invitrogen, San Diego, CA, USA

2.1.3. Materialien für Zellkultur, Transfektion und Zellstimulation

- Penicillin/Streptomycin, GIBCO™, Paisley, UK
- Trypsin, GIBCO™, Paisley, UK
- PBS Dulbecco's, GIBCO™, Paisley, UK
- DMEM (Dolbecco's Modified Eagle's Medium), Bio Whittaker™, Cambrex Bio Sciences Verviers, Belgium
- Medium 199, GIBCO™, Paisley, UK
- Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma
- Cell Scraper (25 cm), Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany
- Zellkulturflaschen 80 cm² und 25 cm², NUNC™ Brand Products, Denmark
- 6-well-plate, Corning Incorporated, costar®
- Falcon®, 50 ml Polypropylene Conical Tube, steril, Becton Dickinson, USA
- Pipettenspitzen für Zellkultur 2, 5, 10, 25 ml, Falcon®, Becton Dickinson, USA
- Zellinkubator Heracell® 240, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany
- Mikroskop Wilovert S, hund, Wetzlar, Germany

2.1.4. Antikörper für Westernblotanalyse

Die Antikörper wurden je nach Herstellerempfehlung bei -20°C oder $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert und erforderten je nach Molekulargewicht den Einsatz eines 6 %igen-, 8 %igen- oder 10 %igen Trenngels im Westernblot.

Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnung

Primär-AK	Verdünnung	Sekundär-AK	Verdünnung	Hersteller
Actin (sc-1616)	1 : 10000	Anti-goat	1 : 4000	Santa-Cruz
c-Jun (sc-822)	1 : 200	Anti-mouse	1 : 2000	Santa-Cruz
JunB (sc-73)	1 : 100	Anti-rabbit	1 : 10000	Santa Cruz
JunD (sc-74)	1 : 5000	Anti-rabbit	1 : 5000	Santa Cruz
c-Fos (sc-52)	1 : 1000	Anti-rabbit	1 : 5000	Santa Cruz
FosB (sc-48)	1 : 200	Anti-rabbit	1 : 5000	Santa Cruz
Fra1 (sc-605)	1 : 400	Anti-rabbit	1 : 5000	Santa Cruz
Fra2 (sc-604)	1 : 800	Anti-rabbit	1 : 5000	Santa Cruz
Cyclin B1	1 : 2000	Anti-mouse	1 : 2000	Santa Cruz
Cyclin D1	1 : 400	Anti-mouse	1 : 4000	Santa Cruz
Cyclin E (13A3)	1 : 500	Anti-mouse	1 : 2000	Novocastra
p21	1 : 500	Anti-mouse	1 : 2000	Novocastra
Rb (G3-245)	1 : 800	Anti-mouse	1 : 4000	PharMingen
MMP-1 (Ab-6)	1 : 1000	Anti-mouse	1 : 2000	Oncogene™
MMP- 9 (Ab-3)	1 : 1000	Anti-mouse	1 : 2000	Oncogene™
ER	1 : 1000	Anti-mouse	1 : 2000	Novocastra
PR (1A6)	1 : 300	Anti-mouse	1 : 2000	Novocastra
PAI-1 (Ab-1)	1 : 100	Anti-mouse	1 : 2000	Oncogene™
UPAR (N-19)	1 : 250	Anti-goat	1 : 2000	Oncogene™

2.1.5. Materialien für Westernblot

2.1.5.1 Lösungen und Puffer

Anodenpuffer (pH 8.9):	200 mM TrisHCl 0.005 % Thimerosal
Kathodenpuffer (pH 8.25):	100 mM TrisHCl 100 mM Tricine 0,1 % SDS

3 x Gelpuffer (pH 8.45)	:	3 M TrisHCl 0,3 % SDS
0.5 M Tris (pH 6.8)	:	6.05 g TrisHCl ad 80 ml mit A.d. auffüllen
Tricine	:	Sigma, FW 179.2
5 % Thimerosal	:	2.5 g Thimerosal ad 50 ml mit sterilem A.d. auffüllen
pcsb 1 (Probenpuffer 1)	:	50 mM TrisHCl (pH 6.8) 1 % SDS 10 % Saccharose
pcsb 2 (Probenpuffer 2)	:	50 mM TrisHCl (pH 6.8) 10 % Saccharose 10 % β -Mercaptoethanol (Bio-Rad 161-0710) 3 % SDS 0.01 % Bromphenolblau (Sigma B-0126)
40 % AA/Bis-AA	:	40 % stock solution mixture (37:1 ratio) # A-6050, Sigma
Glycerin	:	87 % Glycerol reinst # 1.04091.1000 Merck
10 % APS	:	1 g Ammoniumpersulfat ad 10 ml mit A.d. auffüllen
TEMED	:	\approx N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamine # 35925.01 Serva
10 % SDS	:	10 g Dodecylsulfat Natriumsalz (# 71725, Sigma) ad 100 ml mit sterilem A.d. auffüllen
Transferpuffer	:	193 mM Glycin 100 mM Tris 0.005 % Thimerosal
Blockierungspuffer (pH 7.5)	:	150 mM Natriumchlorid 100 mM Maleinsäure 1 % Blocking reagent (# 1096176, Böhlinger)
TBS	:	137 mM Natriumchlorid 20 mM Tris
TBST (pH 7.6)	:	137 mM Natriumchlorid 20 mM Tris 0.05 % Tween 20

10 % Tween	:	5 g Tween 20 ad 50 ml mit A.d. auffüllen
AK-Verdünnungslösung	:	9 ml TBST 1 ml Blockierungspuffer
BSA (Albumin-Standard)	:	Pierce, Rockford, USA
Chemiluminescent Substrate:	:	SuperSignal® West Pico Pierce, Rockford, IL 61105
BCA Protein Assay Kit	:	Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin
Rainbow-Marker	:	MWM 14.3-220 kDalton, Amersham Pharmacia, Biotech, Freiburg

2.1.5.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- SE 600 and 660 Standard Dual Cooled Gel Electrophoresis Units, Amersham
- Elektrophoresis Power Supply EPS 601, Amersham Pharmacia, Biotech
- Glasplates (for Hoefer vertical slab gels) 18 x 16 cm with Hoefer SE 400/SE 600
- Slab gel units 80-6178-99, Amersham Pharmacia Biotech Inc., USA
- Käbme für Geltaschen: Comb, 12 wells, 1.5 mm, Hoefer No. SE 511-12-1.5, Amersham P. B., USA
- Spacer 2 cm x 16 cm x 1.5 mm, Hoefer No. SE 6119-1-1.5
- Clamp assy universal 16 cm, Hoefer No. SE 600 3U
- Foam Sponges, 1/8 thick, Hoefer No. TE 45F-1/8
- Immobilon™ Transfer Membranes, Millipore Corporation, MA 01730, USA
- Hyperfilm ECL Röntgenfilme, Amersham Pharmacia Biotech
- Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.6. Übrige Gerätschaften

- Densitometer GS 700, Bio-Rad Laboratories, München
- Rocky 3D Taumelschüttler, Fröbel Labortechnik, Lindau
- Kühlzentrifuge Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen, Osterode
- PCR-Gerät Trio Thermoblock TB1, Biometra biomed. Analytik, Göttingen
- Kryosafe, Schröder GmbH, Hamburg
- Biofuge 13, Heraeus Sepatech
- Safe Lock Tube (2.0 ml), Eppendorf AG, Hamburg, Germany
- Rüttler, Wilke Hamburg, Germany
- Autoklav

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Zellinkubator (Kendro, Hanau) bei 37°C und unter 5 % CO₂ in geeigneten Zellkulturflaschen (25 cm², NUNC™ Brand Products Nunclon™ Surface, Denmark) in Kultur gehalten. Durch tägliche Kontrolle der Wachstumskonfluenz unter dem Mikroskop (Hundt, Wetzlar) wurden die Zelllinien bei 80-100 %iger Wachstumsdichte gesplittet (im Durchschnitt zwei Mal pro Woche), d.h. in neue Zellkulturflaschen überführt. In der Regel wurden 0,5 bis 1,0 ml der Zellsuspension mit 5 ml des jeweiligen Kulturmediums in einer neuen Kulturflasche angesetzt. Zum Ausplattieren vor der Transfektion wurden zwei bis drei Tage vor geplanter Prozedur 2-3 ml Zellsuspension in 80 cm² Flaschen (NUNC™ Brand Products) mit 10 ml Medium überführt, um ausreichend Zellmaterial für die Transfektion zu gewährleisten.

Vorgang des Umsetzens der Zellen (d.h. Splitten) am Beispiel einer 25 cm² Zellkulturflasche:

1. Beurteilung der Wachstumskonfluenz unter dem Mikroskop (ab 80 % Konfluenz Splitten möglich und nötig).
2. Absaugen des Mediums über die Oberseite der Zellkulturflasche, an welcher keine Zellen anhaften.
3. Vorsichtiges Überspülen der Zellen mit 5 ml PBS zum Auswaschen des restlichen Mediums.
4. Absaugen der PBS-Lösung.
5. Enzymatische Ablösung der Zellen mit 1 ml Trypsinlösung für 2-3 Minuten bei 37°C im Inkubator.
6. 10fache Menge an Medium gemessen am vorher eingesetzten Trypsin dazupipettieren (hier: 10 ml) und gelöste Zellen durch mehrfaches Resuspendieren aufnehmen.
7. Abfüllen von 0,5-1,0 ml der Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen mit 5 ml frischem Kulturmedium.
8. Inkubation bei 37°C, 95 % Luft und 5 % CO₂.

2.2.2. Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen fremder DNA in eine Empfängerzelle. Daraufhin erfolgt die Expression der neu aufgenommenen Gene. Als Träger der Fremd-DNA dienen in den beschriebenen Versuchen Plasmidvektoren. Der jeweilige Vektor (z.B. das Plasmid pFosB) enthält die vollständige genetische Information für das Protein des Transkriptionsfaktors FosB (s.a. Kapitel *Plasmide*).

Es gibt mehrere Möglichkeiten der Transfektion: die stabile, die semistabile und die transiente Transfektion. Bei der transienten Transfektion besteht das Ziel in einem kurzfristigen Einbringen der Fremd-DNA in die Zelle im Gegensatz z.B. zur stabilen Transfektion, bei welcher die genetische Information dauerhaft in das Wirtsgenom integriert wird. Die transiente Transfektion hat den Vorteil, dass eine schnelle Weiterverarbeitung der Zellen möglich ist und dass hohe Transfektionsraten erreicht werden können.

Es gibt verschiedene Techniken der Transfektion. Weit verbreitet ist z.B. das Protokoll der Calciumphosphat-Copräzipitation.¹⁹⁷ Weitere Optionen sind die aufwendige, direkte Mikroinjektion des Vektors unterm Mikroskop oder die Elektroporation, bei welcher durch kurzfristiges Anbringen von Elektroden am Kulturgefäß die Zellmembran geöffnet wird. In den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen erfolgte die Transfektion mit der Lipofektions-Methode. Diese Methode erlaubt sowohl die transiente als auch die stabile Transfektion. Zudem ist sie für ein breites Spektrum von Zielzellen möglich. Dabei werden die Vektoren von Phospholipidvesikeln umhüllt. Diese werden dann unter Standardzellkulturbedingungen (37°C) den Zielzellen beigegeben. Nach dem Zufallsprinzip haften nun diese Phospholipidvesikel an den Zellmembranen an und verschmelzen mit diesen. Dabei wird der Vektor in der Zelle freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo er neben der zelleigenen DNA liegt. Es werden natürlich nicht alle Zellen mit dem Vektor transfiziert. Die Transfektionsrate liegt in der Regel bei 5-10 %.

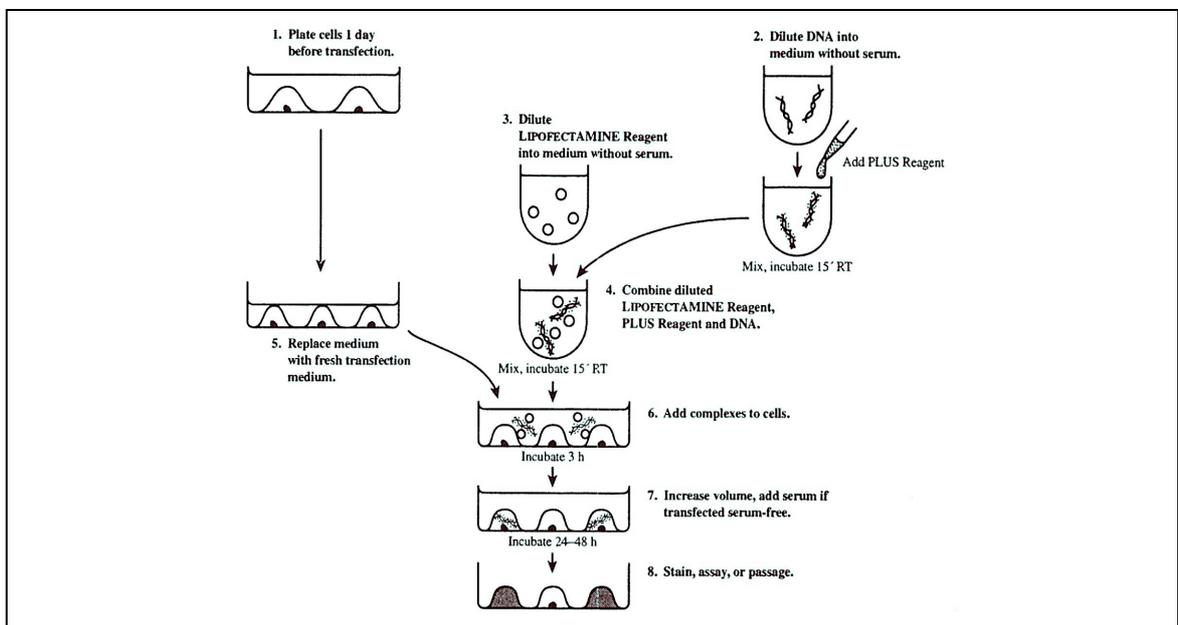
Zur Transfektion wurde das Lipofectamin-PLUS-Reagenz (Cat. No.: 10964-013, Invitrogen™ life technologies) verwendet. Das Reagenzpaket besteht aus dem Lipofectamin-Reagenz (0,5 ml) und dem PLUS-Reagenz (0,85 ml) für die Präkomplexierung der Plasmid-DNA. Die Transfektion wurde in einem *Six-Well-Plate* (einer speziellen sterilen Plastischale) durchgeführt, in welcher die Zellen in sechs voneinander getrennten kreisförmigen Mulden (engl. *wells*) adhärent wachsen konnten. In drei *Wells* wurden die Zellen mit dem jeweiligen Plasmid transfiziert. Die anderen drei *Wells* dienten als Negativkontrolle: in ihnen wurde lediglich der Leervektor transfiziert. Die aus

¹⁹⁷ Vgl. S. J. Morgan, Kultur tierischer Zellen, Spektrum Verlag 1994.

ihnen gewonnenen Proteinextrakte wurden im ersten Westernblot nach Transfektion zur Verifizierung der Transfektion eingesetzt.

Zwei bis drei Tage vor Transfektion wurden die Zellen ausplattiert. Dazu wurden sie bei 80-90 %iger Wachstumskonfluenz in 80 cm² Zellkulturflaschen mit je 10 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin pro Flasche trypsinisiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Dann wurde die Zellmenge in einer Rosenthal-Zählkammer bestimmt und in einer Suspension derart angesetzt, dass pro *Well* in *Six-Well-Plate* 500.000 Zellen in 2 ml abgelesen wurden. Nach 24 Stunden erreichten sie so eine Konfluenz von etwa 80-100 % in jedem *Well*. Während der Transfektion wurde Serum- und antibiotikumfreies Medium verwendet, um die kationische, Lipidreagens-vermittelte Transfektion nicht zu stören. Am Tag der Transfektion wurde pro *Well* und Plasmid bzw. Leervektor jeweils 1 µg Plasmid-/Leervektor-DNA in 100 µl Medium aufgenommen und mit 6 µl Plus-Reagenz präkomplexiert. Der Ansatz wurde gemixt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es ist wichtig, die DNA vor dem Hinzugeben des PLUS-Reagenz in Serum- und antibiotikumfreiem Medium aufzunehmen, da andernfalls die DNA mit dem PLUS-Reagenz auspräzipitiert.

Abbildung 13: Transfektion nach dem Lipofectamin-Protokoll¹⁹⁸



Im nächsten Schritt erfolgte in einem zweiten Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) der Ansatz von 4 µl Lipofectamin-Reagenz in 100 µl Medium pro Plasmid und *Well*. Dann wurde die präkomplexierte DNA mit dem gelösten Lipofectamin-Reagenz gemixt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Vorgangs wurde das Medi-

¹⁹⁸ Invitrogen™ life technologies, Lipofectamine Plus™ Reagent.

um der Zellen im *Six-Well-Plate* durch Serum- und antibiotikumfreies Transfektionsmedium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 211 µl DNA-PLUS-Lipofectamin-Reagenz pro *Well* auf die Zellen abgelassen und für drei Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von einem ml Medium mit 20 % FCS-Gehalt, um das Standardvolumen von 2 ml 10 %igen FCS-haltigem Medium pro *well* zu gewährleisten. Nach weiteren 24 Stunden im Inkubator konnte mit der Proteinextraktion begonnen werden.

2.2.3. Zellstimulation mit TPA und 17-β-Östradiol (E₂)

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231(+) wurde 24 Stunden nach der Transfektion mit FosB (H1) mit dem Phorbolestertumorpromotor TPA stimuliert. Tumorpromotoren sind chemische Substanzen, die allein nicht krebsauslösend sind, jedoch im Zusammenspiel mit krebsauslösenden Faktoren (sog. Tumorinitiatoren) krebsfördernd agieren können.¹⁹⁹

Tetradecanoyl-12,13-phorbolacetat (TPA) ist wirksamer Bestandteil des Crotonöls, das aus den Samen des Wolfsmilchgewächses *Croton tiglium* gewonnen wird. TPA greift direkt an der Proteinkinase C (PKC) (*Marks et Gschwendt*, 1995; *Hecker et al.*, 1985) an und führt im Gegensatz zu dem physiologischen Stimulus Diacylglycerol zu einer langandauernden, nur durch Abbau der PKC zu beendenden Aktivierung der Kinase.²⁰⁰ Von TPA ist bekannt, dass es die Transkription von AP-1-Proteine induziert²⁰¹, indem es den Transkriptionsfaktor SRF (engl. *serum response factor*) aktiviert, welcher an SREs (engl. *serum response elements*) der entsprechenden Gene bindet.²⁰² Zudem wird die DNA-Bindungsaktivität von AP-1-Komplexen an TREs verstärkt.²⁰³

Für den Versuch wurde 1 ml TPA (Fluka, # 79346, 1mg) pro *Well* in einer Konzentration von 10⁻⁷ mol/l auf die Zellen abgelassen und verblieb dort mit einer Einwirkzeit von 24 Stunden. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des Probenpuffers 1 isoliert. Die Verdünnung von TPA erfolgte in MDA-Medium (Ansatz s. im Kapitel 2.1.1. *Zelllinien*) mit dem Unterschied, dass hormonfreies FCS (DCC-FCS für engl. *dextran coated charcoal*) verwendet wurde, um unerwünschte Stimulationseffekte durch im Kälberserum enthaltende Hormone zu vermeiden. Da TPA nur 8 Stunden biologisch wirksam ist, wurde der Ansatz nach Stunde 8 und Stunde 16 nach Transfektion erneuert.

¹⁹⁹ Vgl. *Schwab M.*, Encyclopedic reference of Cancer. Springer Verlag 2001, p. 925.

²⁰⁰ Vgl. *Marks et Gschwendt*, 1995; *Hecker et al.*, 1985.

²⁰¹ Vgl. *Lamph W.W. et al.*, Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature*. 1988 Aug 18;334(6183):629-31.

²⁰² Vgl. *Chai J. et al.*, Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing *J Physiol Pharmacol*. 2002 Jun;53(2):147-57.

²⁰³ Vgl. *Angel P. et al.*, Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*. 1987 Jun 19;49(6):729-39.

Analog wurde bei der Stimulation von MDA-MB-231(+)-Zellen mit 17- β -Östradiol (E_2) (E-8875, Sigma®) nach Transfektion mit dem Plasmid mit der genetischen Information für den Östrogenrezeptor (ER) verfahren. E_2 wurde in der Konzentration von 10^{-9} mol/l auf die Zellen abgelassen. Da E_2 eine Haltbarkeit von 24 Stunden aufweist, war eine Erneuerung des Ansatzes nicht erforderlich.

2.2.4. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Proteine wurden nach 24 Stunden aus den adhären Zellen in einer semisterilen Methode mittels pcsb1-Puffer isoliert. In aufeinanderfolgenden Schritten wurde zuerst das Medium vorsichtig abgesaugt, jedes *Well* mit PBS gewaschen und mit 500 μ l der pcsb1-Puffer beschickt. Mit sterilen Zellschabern wurden die Zellen vom Boden abgelöst, mit einer Pipette durch mehrmaliges Auf- und Ablassen homogenisiert und in eine vorher beschriftete 2 ml Eppendorf-Tube überführt. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80 °C.

Nach der Proteinextraktion erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Extrakte durch Messung der spektroskopischen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm. Mit Hilfe einer BSA-Stammlösung (2000 μ g/ml) wurden Eichlösungen (A bis G) im Bereich von 25 μ g/ml bis 1000 μ g/ml angesetzt und hieraus eine Protein-Standard-Eichkurve erstellt. Die zellulären Proteine wurden mit pcsb1 in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und pro Probe mit 1 ml des BCA-Kits (Lösung A und B des Kits in einem Verhältnis von 50:1) 30 Min. lang bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anhand der Extinktionswerte konnte an der Standardeichkurve die Konzentration der jeweiligen Proteinprobe abgelesen werden.

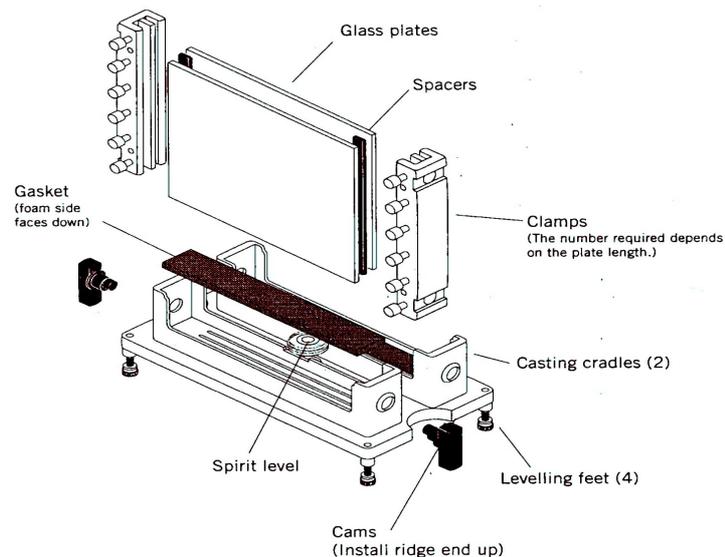
2.2.5. Western-Blot-Analyse

Die Bezeichnung *Western-Blotting* leitet sich im weitesten Sinn von dem Namen des Erfinders der Blottingtechnik, Edwin Southern, ab. Für das von ihm entwickelte Verfahren der Auftrennung von DNA-Fragmenten und deren nachfolgender Hybridisierung setzte sich der Name *Southern Blot* durch. In Anlehnung daran wurde ein vergleichbares Verfahren zum Nachweis von RNA später als *Northern Blot* bezeichnet und ein Verfahren zum Proteinblotting schließlich als *Western Blot*. *Blot* hat im Englischen die Bedeutung von Fleck.

Die Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen ist eine weit verbreitete Methode ihrer Charakterisierung. Bei der Methode des Westernblots handelt es sich um die

Übertragung von Proteinbanden aus einem Elektrophoresegel auf eine Trägermembran. Dem eigentlichen Blotten geht die Elektrophorese voraus, bei der die sich in einer Lösung befindlichen Proteinmoleküle im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe und Nettoladung in eine Richtung wandern. Die übliche Technik ist die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese). SDS umgibt die Proteine und überzieht sie proportional zu ihrer Länge mit einer negativen Ladung. Während der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel werden die Proteine anhand ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt. Das Gel übernimmt die Funktion eines Siebes: Je nach Ansatz verfügt es über eine unterschiedliche Porengröße für den Durchtritt der zu untersuchenden Proteine. Die gewonnenen Proteinextrakte wurden im Westernblot mit einer Konzentration von 20 µg oder 40 µg pro Geltasche eingesetzt.

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Westernblot-Gelkammer²⁰⁴



²⁰⁴ Hoefler SE 600 Series, Amersham Pharmacia Biotech

2.2.5.1 Zusammensetzung der Gele

Je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins wurden 6 %ige, 8 %ige oder 10 %ige Gele zur Auftrennung (Trenngel) gewählt.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenngels (30 ml)

Trenngel (unten)	6 % (100-160 KD)	8 % (80-100 KD)	10 % (40-90 KD)
Gelpuffer 3x	10 ml	10 ml	10 ml
Glycerin 87 %	4 g	4 g	4 g
Aqua dest. steril	11,5 ml	10 ml	8,5 ml
AA/BAA 40 %	4,5 ml	6 ml	7,5 ml

Zur Herstellung des Sammelgels wurden folgenden Lösungen im angegebenen Verhältnis gemischt:

Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammelgels (12,5 ml)

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

Die Polymerisation des Trenngel und des Sammelgels geschah unter Zugabe von 15 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 150 µl Ammoniumpersulfat (APS 10 %) unter fortwährendem Rührvorgang. Anschließend erfolgte die Überführung des zuerst gefertigten Trenngels in die vorbereitete Gelkammer. Das Trenngel wurde mit einer dünnen Wasserschicht bedeckt. Nach einer 30-minütigen Wartezeit zur Aushärtung des Trenngels konnte mit Zugabe des Sammelgels begonnen werden. Ein zuvor eingesetzter Kamm sorgte für die gleichmässige Formung von zwölf oder zwanzig Gel-taschen zur Probenfüllung. Nach weiteren 30 Minuten Wartezeit konnte mit der Füllung der Proben-taschen begonnen werden.

2.2.5.2 Vorbereitung der Proben

Die Proteinextrakte wurden mit einer Konzentration von 40 µg bzw. 20 µg eingesetzt. Dazu wurden die Proteine aus der Gefriertruhe (- 80 °C) auf Eis langsam aufgetaut, mit pcsb1 auf 50 µl aufgefüllt und im Verhältnis 1:1 mit pcsb2-Puffer auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Der in der ersten Tasche mitlaufende Rainbow-Marker (14.3 – 220 kDa, Firma Pierce®) wurde mit einem Volumen von 12 µl eingesetzt und wie oben

beschrieben mit pscb1- und pscb2-Puffer auf 100 µl aufgestockt. Unter der Einwirkung von β -Mercaptoethanol im pscb2-Puffer wurden die Proteine im Thermozykler bei 99°C für 5 Min. denaturiert und in ihre Primärstruktur überführt. Nach kurzem Anzentrifugieren der Proben konnte mit der Füllung der Probenaschen begonnen werden.

2.2.5.3 Elektrophorese

Die Elektrophoresekammer wurde mit vier Liter Anodenpuffer gefüllt. Nach Einsatz der Gelkammer konnte der Gelaufsatz mit 700 ml Kathodenpuffer beladen werden. Der Gellauf erfolgte bei 50-70 Volt für 16-20 Stunden. Die genauen Werte für Spannung und Laufdauer wurden den zu untersuchenden Proteinen angepasst und waren aus dem jeweiligen Antikörperprotokoll entnommen worden.

2.2.5.4 Blotten der Proteine und Blockierung

Für die Detektion mit dem jeweiligen Antikörper müssen die Proteine von dem unhandlichen Gel auf ein stabiles und langlebiges Trägermaterial überführt werden. Dazu dient der Vorgang des Blottens. Hierbei werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

Je nach Größe des Gels wurden eine Immobilon-P-Membran und sechs Whatman-Papier (Blottingpapier) zurechtgeschnitten. Zur Hydrophilisierung wurde die Membran in Methanol und A.d. geschwenkt und anschliessend in die Schale mit Transferpuffer gelegt. Das Blottingpapier wurde ebenfalls mit Transferpuffer durchtränkt. Mit Hilfe der Gittervorrichtung und der Schwämme wurde pro Gel ein Sandwich gefertigt, bestehend aus dem Gel mit luftblasenfrei anliegender Membran, welche von beiden Seiten mit jeweils 3 Lagen Blottingpapier umgeben war und durch zwei Schwämme in der Gitterhalterung gestützt wurde. Um den elektrischen Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran zu garantieren, musste die Membran an der Anodenseite (Pluspol) des Sandwiches angelegt sein. Bei einer Stromstärke von 400 mA wurde nun für 4 Std. geblottet.

Nach dem Blotten wurde die Membran vorsichtig aus dem Sandwich gelöst, kurz in Methanol abs. geschwenkt und 30 Min. bei Raumtemperatur getrocknet. Dieser Schritt unterstützte die Fixierung der Proteine auf der Membran. Nach erneutem Schwenken in Methanol und A.d. zur Hydrophilisierung wurde die Membran mit Blockierungspuffer überschichtet und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank belassen. Dies geschah zur Ab-sättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran, die später nach der Detek-

tion unangenehme *Background*-Effekte (Schwärzung des Hintergrundes) verursachen können. Zur Verifizierung des Blottvorgangs konnten die Proteinbanden auf der Membran über einer Leuchtplatte sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran in eine Lösung von 20 %igem Methanol getaucht (Methanol abs. und A.d. in einem Verhältnis von 1:5). Dieser Schritt war ebenfalls erforderlich, sollte die Membran mit zwei verschiedenen Antikörpern inkubiert werden (z.B. Banden 1 bis 6 mit FosB-AK und Banden 7 bis 12 mit Fra1-AK). Unter Sichtkontrolle konnte die Membran sicher zwischen zwei Banden zerschnitten werden.

2.2.5.5 Inkubation mit Primär- und Sekundär-Antikörper und Detektion

Nach Abgiessen des Blockierungspuffers wurde die Membran mit dem gewünschten Primär-AK für 1 Std. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der Primär-AK wurde in seiner entsprechenden Verdünnung (s. Kapitel *Antikörper*) in TBST und Blockierungspuffer in einem Verhältnis von 10:1 angesetzt. Danach wurde die Membran drei Mal für jeweils 10 Min. auf dem Schüttler mit TBST gewaschen, um möglichst alle nicht haftende Rückstände des Primär-AK von der Membran zu spülen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-AK, bei dem in Ansatz und Anwendung analog dem Primär-AK verfahren wurde. Es folgte ein weiterer Waschvorgang, bei dem die Membran 4 Mal für 10 Min. mit TBST überspült wurde.

Die Detektion, d.h. die Sichtbarmachung der auf die Membran geblotteten Proteinbanden, erfolgte mit dem chemilumineszierenden SuperSignal®-Substrat (Pierce, Rockford, IL, USA), bestehend aus der Luminol-Lösung und der stabilen Peroxid-Lösung. Die an den Sekundär-AK gebundenen Horseradish-Peroxidase (HRP) oxidiert das Luminolsubstrat. Das Reaktionsprodukt ist wenig stabil und fällt unter Abgabe von Lichtquanten mit einer Wellenlänge von 425 nm auf ein niedrigeres Energieniveau zurück. Diese Signale schwärzen einen anliegenden Röntgenfilm und ermöglichen eine Detektion von Antigenmengen bis in den Picogrammbereich.

Die Membran wurde mit 20 ml der Chemilumineszens-Lösung (Luminol und Peroxid in einem Verhältnis von 1:1) für 5 Min. inkubiert und dann in zügigen Arbeitsschritten luftblasenfrei in eine Klarsichthülle eingebettet, in eine Röntgenkassette überführt und in die Dunkelkammer gebracht. Nach Expositionszeiten eines Röntgenfilmes gegenüber der Membran zwischen einer Sekunde bis 12 Min. (je nach Qualität und Schwärze der erwünschten Proteinbande und störender Hintergrundeffekte) wurde dieser in der Entwicklungsmaschine (Protec, Oberstenfeld) entwickelt und nachfolgend beschriftet.

2.2.5.6 Qualitätssicherung im Westernblot

Um sicherzustellen, dass nicht unterschiedliche Proteinkonzentrationen im Westernblot in die einzelnen Taschen des Gels pipettiert worden waren und somit Pippetierfehler unterlaufen waren, wurden die Westernblots, die Unterschiede in der Expression zeigten, mit dem Antikörper für Aktin detektiert. Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen in etwa der gleichen Konzentration vorkommt. Das Protein hat eine globuläre Form und ein Molekulargewicht von ca. 42 kD.

Wenn sich nach der Detektion mit Aktin für alle eingesetzten Proben eine gleichmäßige Bande auf der Höhe von 42 kD fand, konnte davon ausgegangen werden, dass die Expressionsunterschiede des vorher detektierten Antikörpers nicht durch eine fehlerhafte Proteinbestimmung oder Pippetierfehler verursacht sind, sondern einer verstärkten Expression des untersuchten Proteins entsprachen.

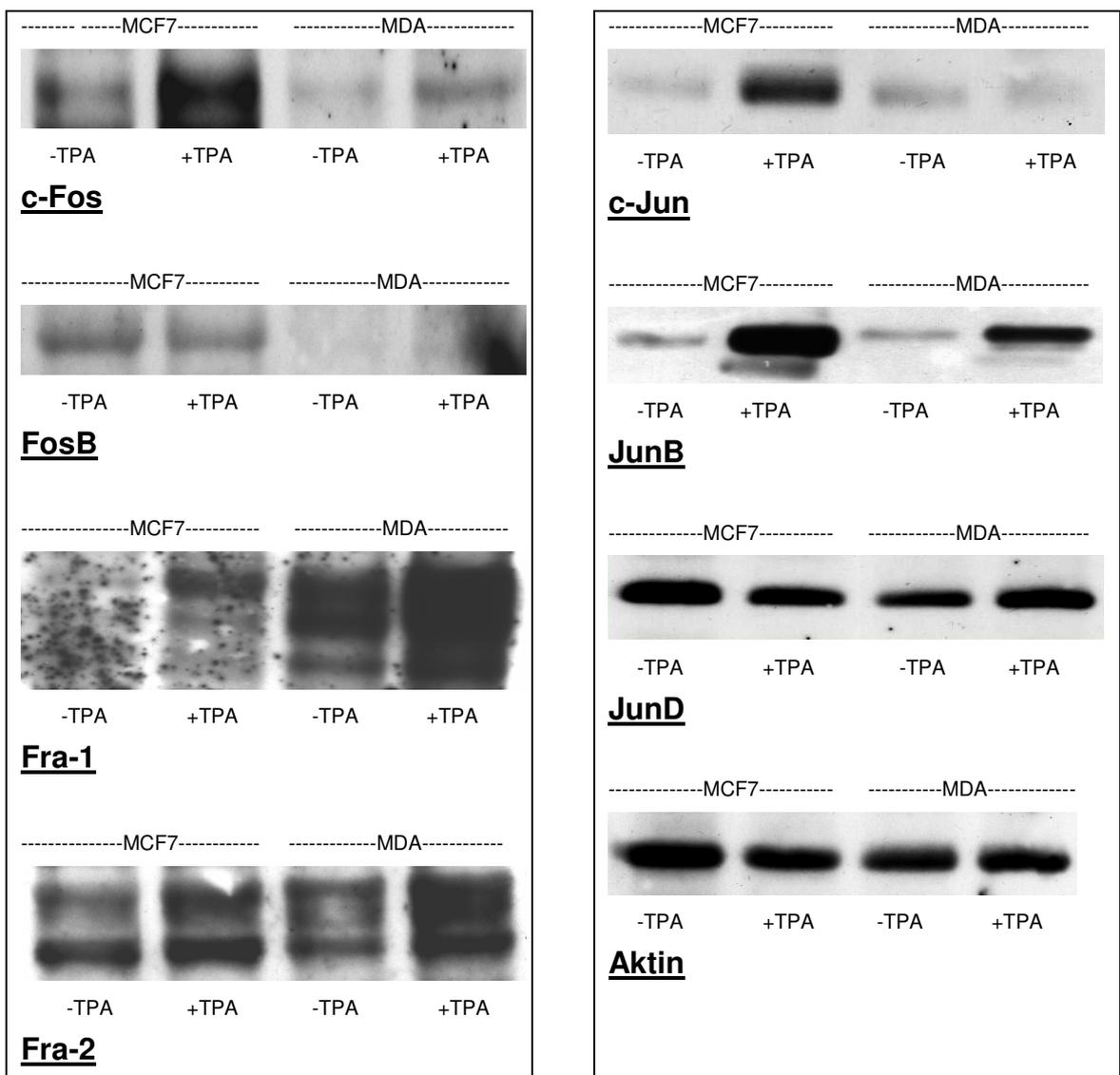
3. ERGEBNISSE

3.1. Stimulation MCF7 und MDA-MB-231 mit TPA

Die Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MCF7 wurden in der Zellkultur für 24 Std. mit dem Tumorpromoter TPA in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l stimuliert und neben unstimulierten Proteinextrakten im Westernblot mit Antikörpern für AP-1-Faktoren, Zellzyklusproteine (Cyclin D, Cyclin E, p21, Rb), Matrix-Metallproteinasen (MMP-1, MMP-9) und Proteinasen (PAI-1, uPAR) eingesetzt.

3.1.1. AP-1-Faktoren unter Stimulation mit TPA in MCF7/MDA

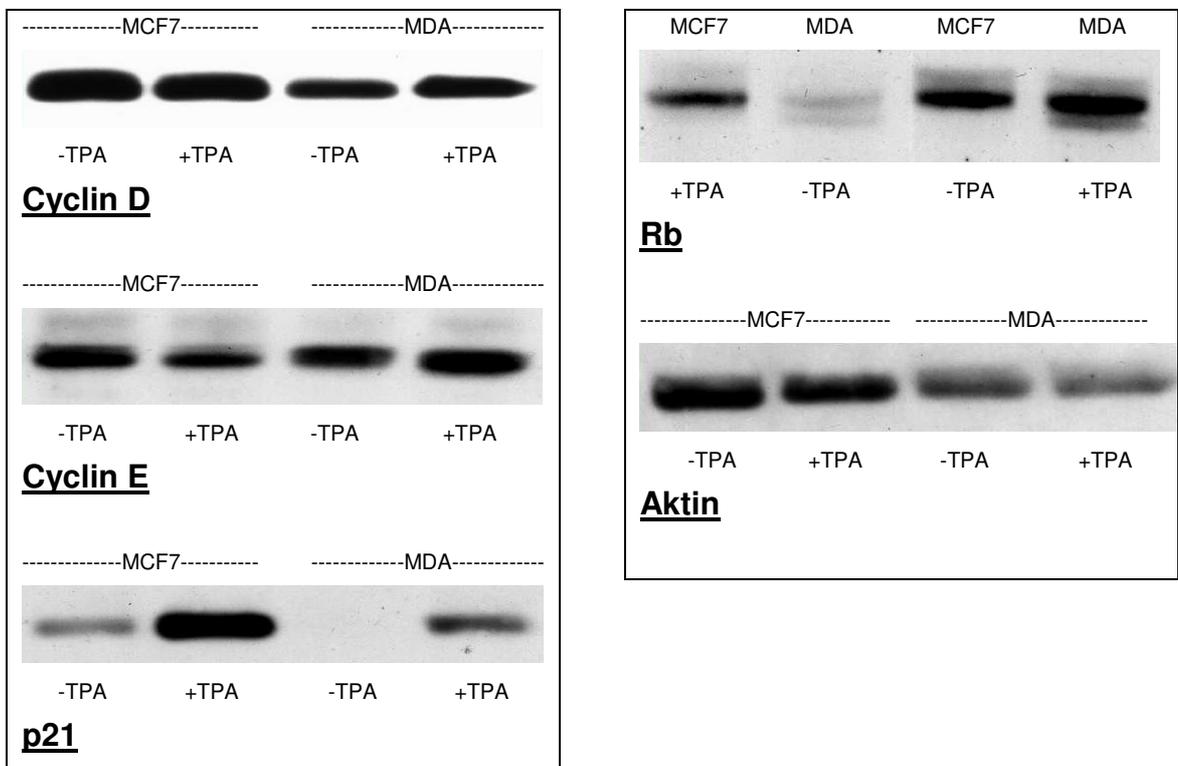
Abbildung 15: AP-1-Faktoren unter TPA-Stimulation in MCF7/MDA



Eine verstärkte Expression unter Stimulation mit TPA zeigte sich geringfügig für c-Jun, mittelstark für c-Fos und Fra-2 und sehr stark für JunB sowohl in den MCF7- als auch in den MDA-MB-231-Zellen. In den Fra-1-negativen MCF7-Zellen führte die TPA-Behandlung zu einer Expression einer 42 kDa-Bande, die dem phosphorylierten Fra-1 entspricht. TPA bewirkte keine Änderung der Expression für FosB, weder in den FosB-positiven MCF7-Zellen noch in den FosB-negativen MDA-MB-231-Zellen. Die JunD-Expression war kaum verändert.

3.1.2. Zellzyklusproteine unter Stimulation mit TPA in MCF7/MDA

Abbildung 16: Zellzyklusproteine unter TPA-Stimulation in MCF7/MDA

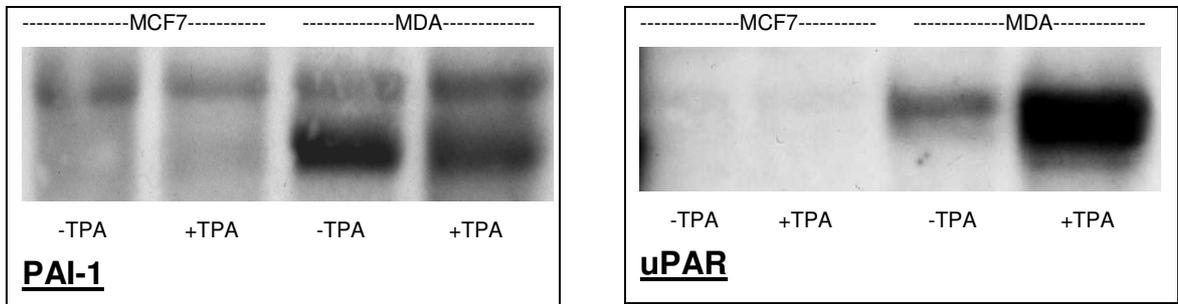


Für den Zellzyklusinhibitor p21 zeigte sich unter TPA-Stimulation in beiden Zelllinien eine deutlich verstärkte Bande im Westernblot, wobei ohne TPA-Zugabe in den MDA-MB-231 keine p21-Expression nachweisbar war. Die Expression von Rb war unter TPA-Stimulation in den MDA-MB-231 erhöht, in den MCF7-Zellen zeigte sie sich nicht wesentlich verändert.

Für Cyclin D und Cyclin E ergaben sich keine eindeutigen Veränderungen; am ehesten konnte für Cyclin E eine gegensätzliche Expressionsveränderung angenommen werden: eine diskret verstärkte Bande unter TPA-Stimulation in MDA-MB-231 und eine abgeschwächte in den MCF7-Zellen.

3.1.3. PAI-1/uPAR unter Stimulation mit TPA in MCF7/MDA

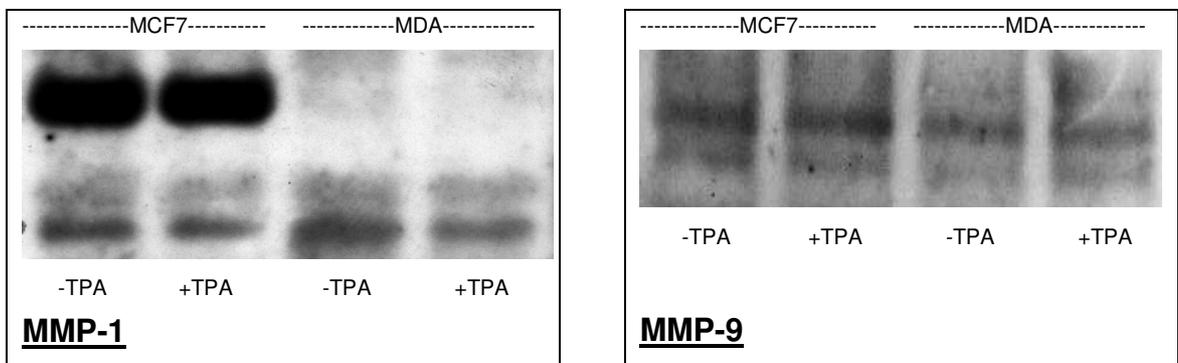
Abbildung 17: PAI-1/uPAR unter TPA-Stimulation in MCF7/MDA



Die PAI-1-Expression war in den MDA-MB-231 unter TPA-Stimulation leicht erhöht, uPAR zeigte eine starke Zunahme der Expression. In den MCF7-Zellen konnte keine Veränderung beobachtet werden.

3.1.4. MMPs unter Stimulation mit TPA in MCF7/MDA

Abbildung 18: MMPs unter TPA-Stimulation in MCF7/MDA



Die Expression von MMP-1 blieb unverändert unter TPA-Stimulation. Für MMP-9 konnte eine leichte Expressionsverstärkung nach TPA-Stimulation in den MDA-MB-Zellen beobachtet werden. Die obere Bande von MMP-9 liegt bei 92 kD und entspricht der inaktiv sezernierten Form; die untere Bande bei 83 kD entspricht der aus proteolytischer Spaltung gewonnen aktiven Form.

3.1.5. Ergebnisse zur Stimulation mit TPA im Überblick

Tabelle 9: Expressionsveränderung unter TPA-Stimulation

	MCF-7		MDA-MB-231	
	ohne TPA	mit TPA	ohne TPA	mit TPA
c-Fos	+	↑↑	+	↑↑
FosB	+	+	-	-
Fra-1	+	↑↑	-	↑↑
Fra-2	+	↑	+	↑
c-Jun	+	↑↑	+	+
JunB	+	↑↑	+	↑↑
JunD	+	+	+	+
Cyclin D	+	+	+	+
Cyclin E	+	+	+	+
P21	+	↑↑	-	↑↑
Rb	+	+	+	↑↑
PAI-1	+	+	+	↑
uPAR	+	+	+	↑↑
MMP-1	+	+	+	+
MMP-9	+	+	+	↑

Zeichenerklärung:

- + : vorhandene Proteinexpression im Westernblot
- : keine Proteinexpression im Westernblot
- ↑ : leicht erhöhte Expression nach TPA-Behandlung
- ↑↑ : stark erhöhte Expression nach TPA-Behandlung

3.2. Untersuchung von FosB in MDA-MB-Zellen

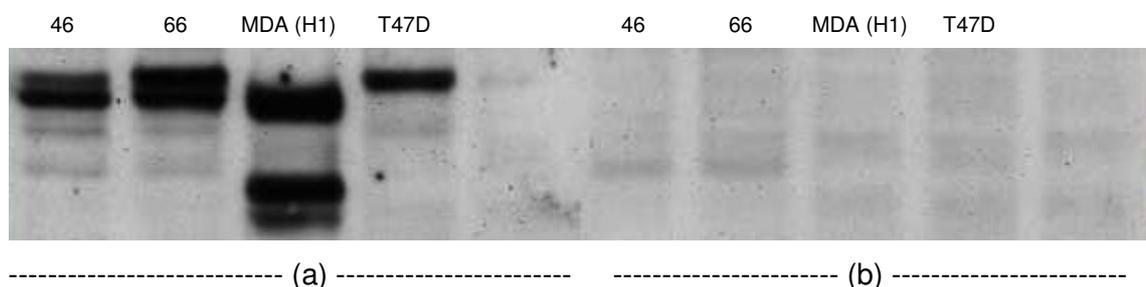
Zur Identifikation möglicher Zielgene von FosB wurde die genetische Information von FosB (H1-Wildtyp), FosB (H11-Mutante), FosB₂ und c-Fos mit Hilfe von Plasmidvektoren transient in die stark invasiv wachsende, hormonrezeptor- und FosB-negative Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 transfiziert. Die Proteinextrakte wurden im Westernblot eingesetzt und mit Antikörpern für mögliche Zielgene wie Zellzyklusregulatoren (Cyclin B, Cyclin D, Cyclin E, p21, RB, RB2), MMPs (MMP-1, MMP-9), Hormonrezeptoren (ER, PR), PAI-1, uPAR und AP-1-Proteine (c-Fos, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, JunD) überprüft.

Zuerst wurde gezeigt, dass die transiente Transfektion zur Transkription des jeweiligen Inserts in das entsprechende Protein (z.B. FosB) geführt hatte. Dieser Nachweis erfolgte im Westernblot (s. Abb. 20). Nach erfolgreicher Transfektion wurden diese Proteinextrakte in weiteren Westernblots auf die gewünschten Zielgene untersucht. Das Augenmerk wurde hierbei auf mögliche Expressionsunterschiede des untersuchten Zielproteins gerichtet, die als Effekt auf die Transfektion und damit verbundener Expression von FosB ausgelöst worden sind.

3.2.1. FosB-Banden im Westernblot

Um die spezifischen Banden von FosB in Abgrenzung zu unspezifischen Banden im Westernblot darzustellen, wurden Proteine von FosB-exprimierenden Mammakarzinomen (46, 66), einer FosB-positiven Zelllinie (T47D) und von mit FosB (H1) transient transfizierten MDA-MB-231-Zellen im Westernblot eingesetzt (s. Abb. 19).

Abbildung 19: Spezifische FosB-Banden (Blocking-Peptid-Versuch)



In einem Ansatz erfolgte die Detektion ganz klassisch unter Zugabe von FosB-AK (s. Abb. 19 a), in dem anderen Ansatz (s. Abb. 19 b) wurden vor Detektion die spezifischen Bindungsstellen für FosB mit einem Blocking-Peptid abgesättigt, so dass sich bei der nachfolgenden Detektion mit FosB-Antikörpern lediglich die unspezifischen Banden darstellten.

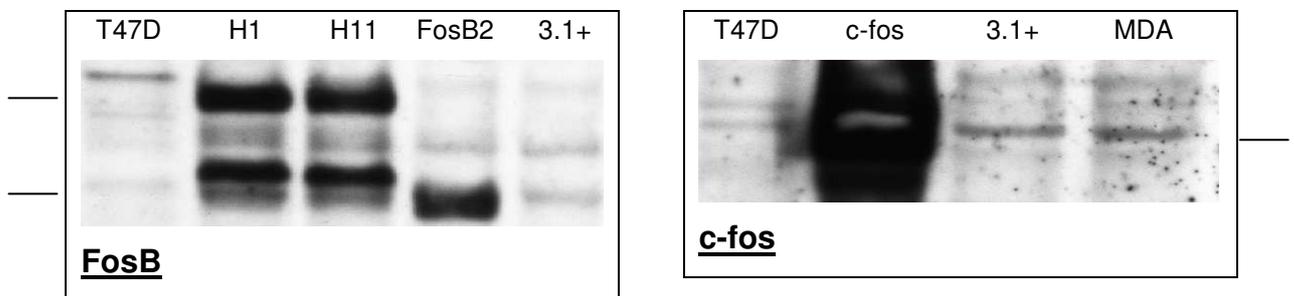
Die Mammakarzinome 46 und 66 zeigen zwei eng nebeneinander liegende Banden für FosB. Die FosB-positive Zelllinie T47D exprimiert nur eine Bande.

Die mit H1 transfizierten MDA-MB-231-Zellen zeigen zwei Banden auf Höhe von 47 und 38 kD. Die obere Bande entspricht der langen FosB-Form. Im Vergleich mit den beiden Mammakarzinomgeweben (46 und 66) und der hormonrezeptorpositiven Zelllinie T47D sind die Proteine im Polyacrylamidgel etwas weiter migriert, was auf einen weniger phosphorylierten Status zurückgeführt werden könnte. Die untere Bande zeigt das alternative Spleissprodukt FosB₂, welches sich nur bei den transfizierten MDA-MB-231-Zellen nachweisen lässt.

3.2.2. Transfektion MDA-MB-231 mit FosB-Formen und c-fos

Abb. 20 zeigt die gelungene transiente Transfektion der MDA-MB-231-Zelllinie mit den Plasmiden FosB (H1 - Wildtyp), FosB (H11 - Mutante), FosB₂ (alternatives Spleissprodukt) und c-Fos. T47D diente als Positivkontrolle und der Vektor 3.1+ als Negativkontrolle.

Abbildung 20: Transfektion MDA-MB mit FosB-Formen und c-fos



In der Proteinexpression im Westernblot ist kein Unterschied zwischen H1 und der um eine Aminosäure in der TAD veränderten Mutante H11 erkennbar. Die obere Bande liegt etwa bei 47 kD und entspricht dem eigentlichen FosB-Protein. Die untere liegt bei 38 kD und zeigt wahrscheinlich das alternative, um 110 bp verkürzte Spleissprodukt FosB₂ an. Nach Transfektion mit FosB₂ bandiert dieses Produkt jedoch tiefer bei etwa 36 kD, so dass hier wahrscheinlich unterschiedliche Phosphorylierungsstadien des Spleissproduktes vorliegen. C-Fos lässt sich nach Transfektion auf der Höhe von 48 kD detektieren. In den nicht oder mit dem Leervektor transfizierten Zellen zeigt c-Fos eine mässig stark ausgeprägte Bande.

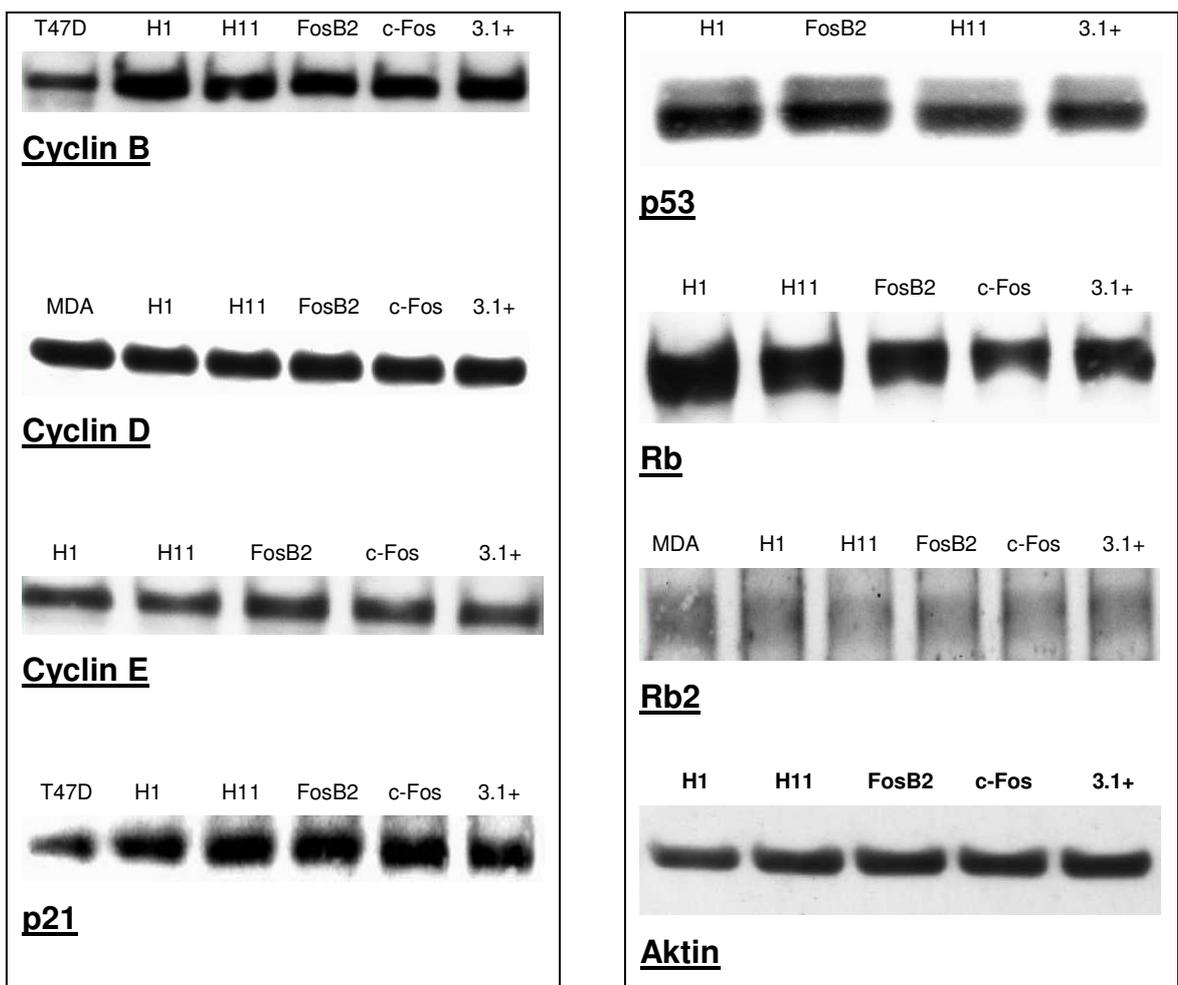
Nachdem mit diesem Westernblot die Transfektion mit den Plasmiden bestätigt werden konnte, dienten in der Folge die gewonnenen Proteine zum Einsatz bei weiteren Westernblot und der Korrelation mit möglichen Zielgenen von FosB. Sowohl die Trans-

fektion, als auch die Überprüfung der Zielproteine im Westernblot wurden in weiteren zwei Versuchen reproduziert. Dargestellt sind die Ergebnisse bzw. Expressionsveränderungen, welche sich bei allen drei Versuchen ergaben.

3.2.2.1 FosB und Zellzyklusregulatoren

Nach erfolgreicher Transfektion mit den FosB-Plasmiden (H1, H11, FosB₂) und c-Fos (s. Abb. 20) wurden diese Proteinextrakte im Westernblot mit Antikörper für Zellzyklusregulatoren überprüft. Dabei sollte untersucht werden, ob sich durch die transiente Transfektion mit den unterschiedlichen FosB-Plasmiden und dem c-Fos-Plasmid die Expression des jeweiligen Zellzyklusproteins (Cyclin B, Cyclin D, Cyclin E, p21, Rb, Rb2) verändert hatte.

Abbildung 21: FosB und Zellzyklusregulatoren in MDA-MB-231



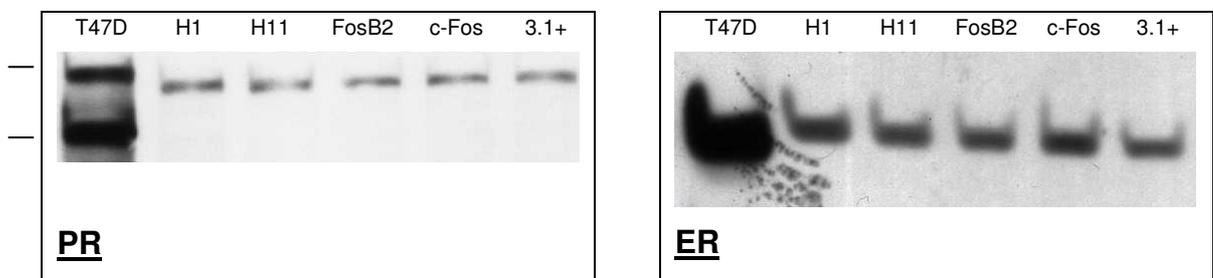
Bei den untersuchten Zellzyklusregulatoren wurde nach transienter Transfektion mit H1, H11, FosB₂ und c-Fos keine eindeutige Expressionsveränderung festgestellt. Die

verstärkte und wegen der weiteren Migration im Gel eventuell weniger phosphorylierte Rb-Bande nach Transfektion mit H1 war in den anschliessenden zwei Versuchen nicht konstant reproduzierbar und kann somit nicht als gesichert gelten. Zudem fanden sich keine Unterschiede in der Expression der untersuchten Zellzyklusregulatoren im Hinblick auf die unterschiedlichen FosB-Plasmide H1, H11 und FosB₂.

3.2.2.2 FosB und Hormonrezeptoren (PR und ER)

Die nach Transfektion mit H1-, H11-, FosB₂- und c-Fos-Plasmiden gewonnenen Proteinextrakte der MDA-Zellen wurden im Westernblot auf die Expression von Progesteron- und Östrogenrezeptor (PR und ER) untersucht.

Abbildung 22: FosB und Hormonrezeptoren in MDA-MB-231

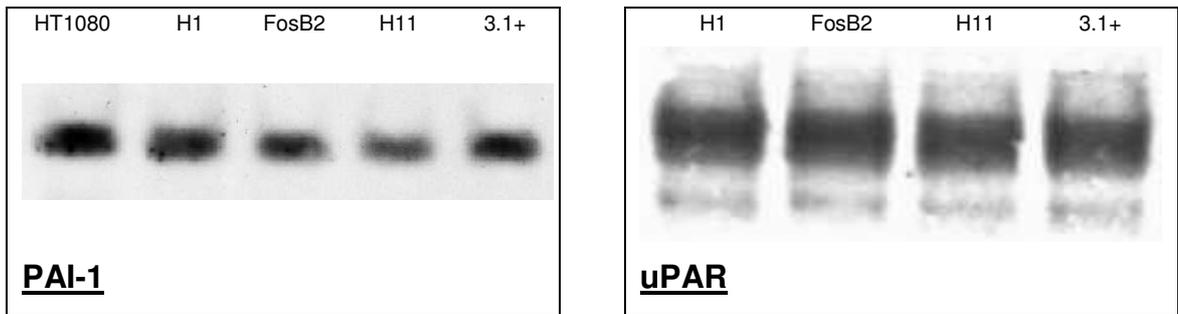


Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die transiente Transfektion mit FosB und c-Fos zu keiner Induktion von PR und ER in der hormonrezeptornegativen MDA-MB-231-Zelllinie geführt hat. Die rezeptorpositive Zelllinie T47D diente als Positivkontrolle und zeigt für PR zwei Banden, von welchen die obere der Isoform PR-B bei 116 kD und die untere PR-A bei 94 kD entspricht. In beiden Blots wird eine unspezifische Bande detektiert, welche nicht dem eigentlichen PR-A/-B und ER gleichkommt.

3.2.2.3 FosB und PAI-1/uPAR

Die nach Transfektion mit H1-, H11- und FosB₂-Plasmiden gewonnenen Proteinextrakte der MDA-Zellen wurden im Westernblot mit den Antikörper für PAI-1 und uPAR eingesetzt.

Abbildung 23: FosB und PAI-1/uPAR in MDA-MB-231

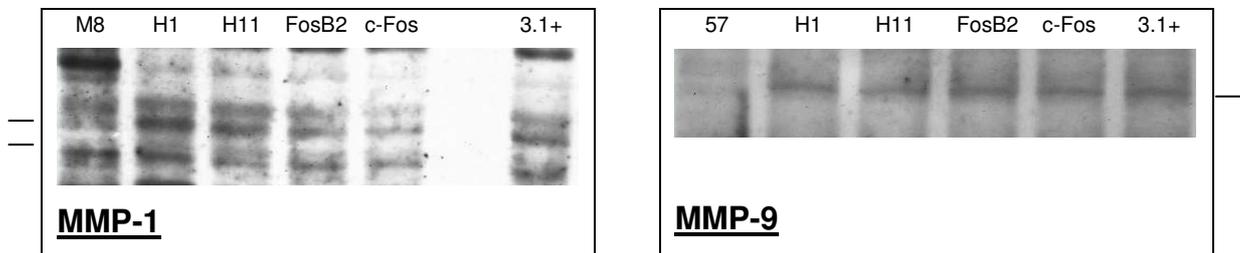


Für PAI-1 zeigte sich bei den verschiedenen FosB-Plasmiden eine diskret schwächere Expression unter Transfektion mit der Mutante H11. Die Expression von uPAR war nach Transfektion mit allen FosB-Plasmiden gleichmässig vorhanden. Die Proteinextrakte nach transientser Transfektion mit c-Fos waren in diesem Versuch nicht eingesetzt worden.

3.2.2.4 FosB und Matrix-Metalloproteinasen

Die nach Transfektion mit H1-, H11-, FosB₂- und c-Fos-Plasmiden gewonnenen Proteinextrakte der MDA-Zellen wurden im Westernblot mit Antikörper für die Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1 und MMP-9) eingesetzt.

Abbildung 24: FosB und Matrix-Metalloproteinasen in MDA-MB-231

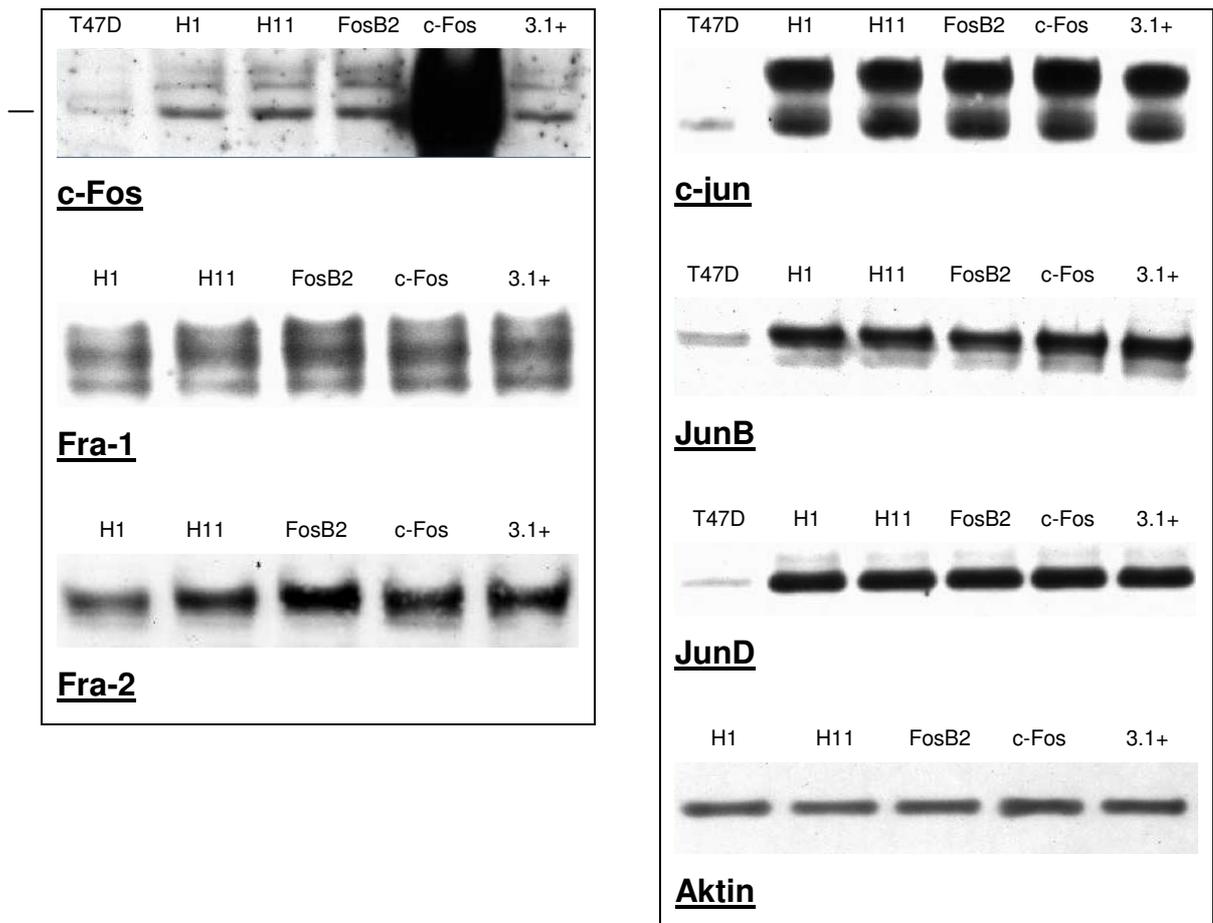


Für MMP-1 und MMP-9 waren nach Transfektion keine Expressionsveränderungen ersichtlich. Bei MMP-1 entsprechen die beiden markierten Banden den aktiven Formen: die obere liegt bei 46 kD, die untere bei 42 kD. Bei MMP-9 ist die Bande bei 92 kD gekennzeichnet.

3.2.2.5 FosB und AP-1-Faktoren

Analog zur Überprüfung von Zellzyklusregulatoren, Hormonrezeptorstatus und MMPs wurden die Proteinextrakte im Westernblot mit Antikörper für die übrigen AP-1-Faktoren (c-Fos, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, JunD) eingesetzt, um die Auswirkungen einer forcierten Überexpression von FosB und c-Fos auf die Expression der anderen AP-1-Faktoren zu untersuchen.

Abbildung 25: FosB und AP-1-Faktoren in MDA-MB-231



Die übrigen AP-1-Proteine zeigten im Westernblot keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Expression. Eine vermeintlich stärkere Bande für Fra-2 nach Transfektion mit FosB₂ konnte in den Wiederholungen nicht nachgewiesen werden.

Zu beachten ist, dass die Proteinexpression von c-Fos sehr stark ausfällt, weil in diesem Fall mit c-Fos transfiziert worden war.

3.2.3. Transfektion MDA-MB mit FosB (H1) und Stimulation mit TPA

MDA-MB-231-Zellen wurden mit FosB (H1) transfiziert, nachfolgend für 24 Std. mit dem Tumorpromotor TPA in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l stimuliert und neben unstimulierten, transient transfizierten Zellextrakten im Westernblot eingesetzt. Der Leervektor 3.1+ diente als Negativkontrolle.

Abbildung 26: Transfektion MDA mit FosB und Stimulation mit TPA

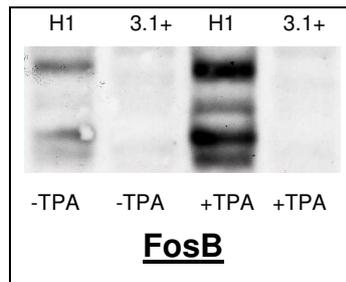
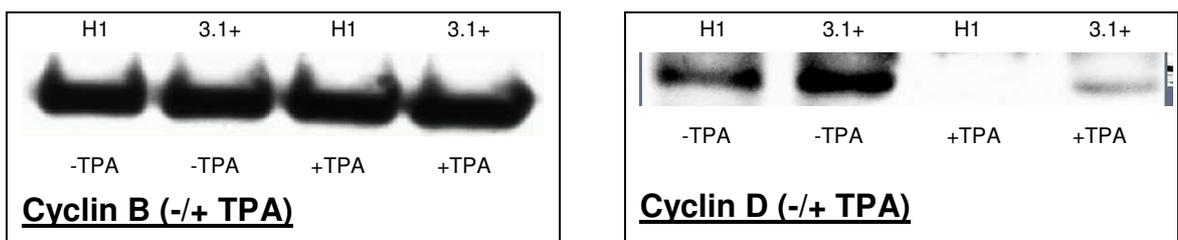


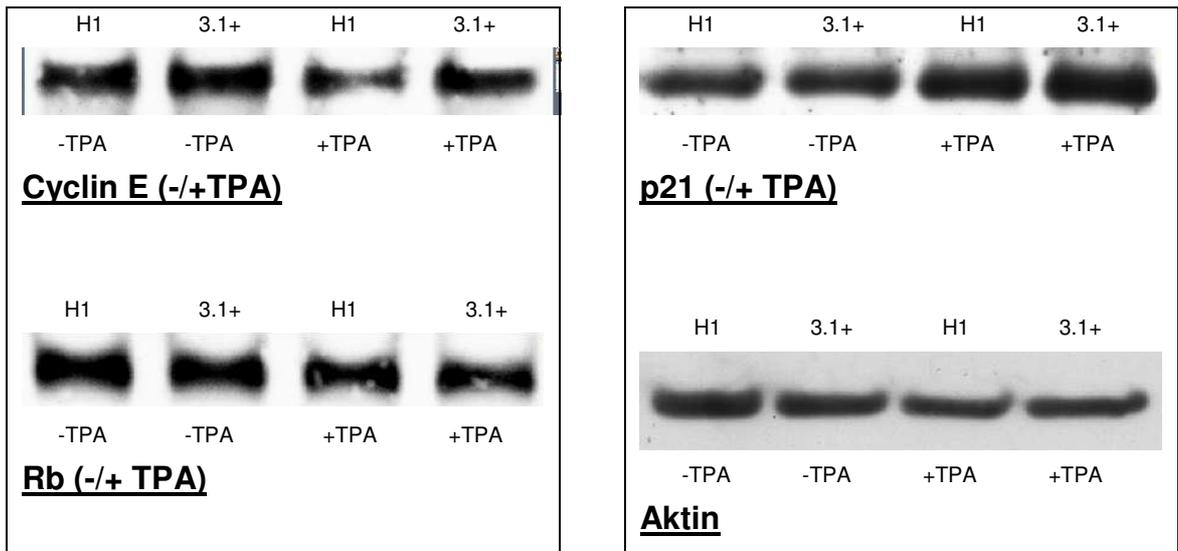
Abb. 26 zeigt die erfolgreiche Transfektion mit dem FosB-Wildtyp H1. Die Expression von FosB ist nach Stimulation mit dem Tumorpromotor TPA im Vergleich zu den unstimulierten, transfizierten Zellen verstärkt. Der Leervektor 3.1+ diente als Negativkontrolle und zeigte folglich ohne und mit TPA-Stimulation keine Bande für FosB.

Die nach transienter Transfektion mit H1 und nachfolgender 24-stündiger Stimulation mit TPA gewonnenen Proteinextrakte wurden in weiteren Westernblots mit den Antikörpern für Zellzyklusregulatoren, Hormonrezeptoren (PR und ER), PAI-1, uPAR, den Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-9 und den anderen AP-1-Faktoren eingesetzt, um zu zeigen, welchen Effekt die Stimulation mit dem Tumorpromotor und die Transfektion mit H1 auf die Expression der jeweiligen Zielgene hat.

3.2.3.1 FosB und Zellzyklusregulatoren (Stimulation mit TPA)

Abbildung 27: FosB und Zellzyklusregulatoren (Stimulation mit TPA)

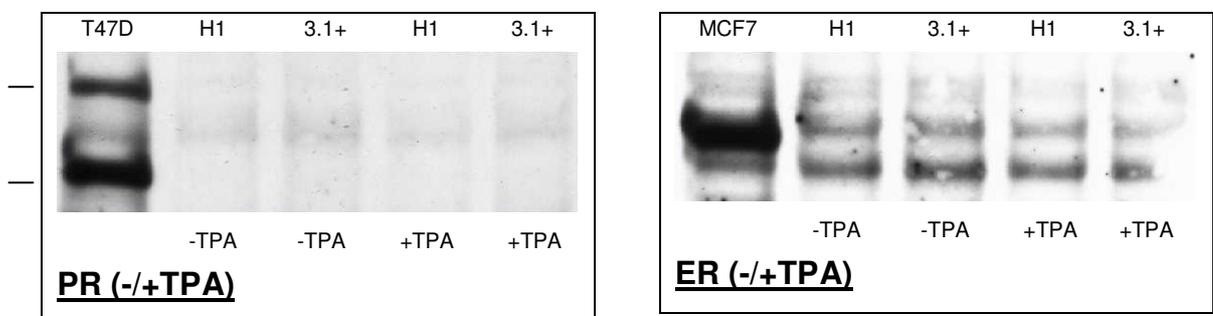




Für Cyclin E und deutlicher für Cyclin D konnte eine verminderte Expression unter TPA-Stimulation sowohl für die mit H1 als auch mit dem Leervektor 3.1+ transfizierten Zellen beobachtet werden, wobei die Expression v.a. für Cyclin D nach Transfektion mit H1 im Gegensatz zum Leervektor 3.1+ unabhängig von der Zugabe von TPA vermindert war. P21 zeigte eine verstärkte Expression unter TPA-Stimulation. Dieses Verhalten ist aus den in Kapitel 3.1.2 dargestellten Ergebnissen (vgl. Abb. 16) bereits bekannt. Nach Transfektion mit den Plasmiden H1 und 3.1+ konnten für p21 keine Expressionsunterschiede beobachtet werden. Für Cyclin B und Rb ergaben sich keine Unterschiede in der Expression im Westernblot.

3.2.3.2 FosB und Hormonrezeptoren (Stimulation mit TPA)

Abbildung 28: FosB und Hormonrezeptoren (Stimulation mit TPA)



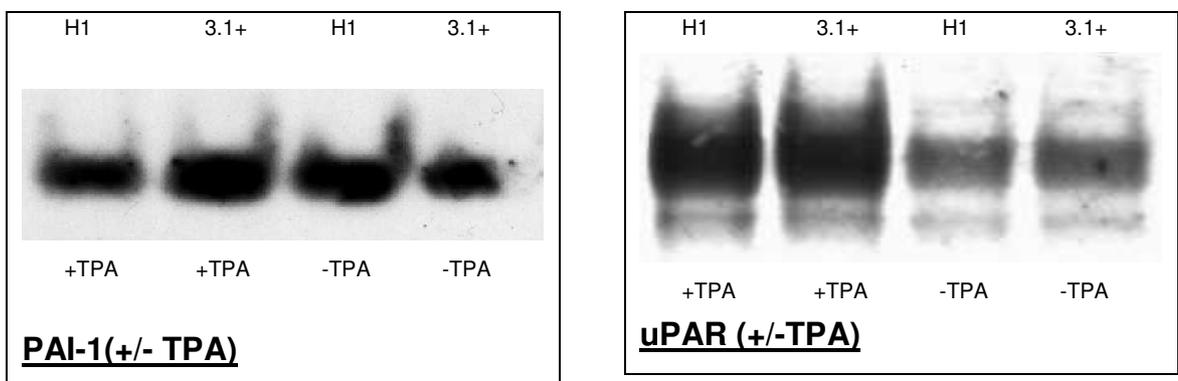
Für die Expression von den PR-Isoformen A und B und ER ergaben sich nach Stimulation mit TPA in den mit H1 transfizierten, hormonrezeptornegativen MDA-MB-231 keine im Westernblot detektierbaren Banden (s. im Vergleich zu den Positivkontrollen T47D

und MCF7). Die abgebildete Doppelbande unter Detektion mit ER ist als unspezifisch einzuordnen.

Analog zu den Ergebnissen in Kapitel 3.2.1.3 zeigte sich nach Transfektion mit den Plasmiden H1 und 3.1+ kein Unterschied in der bekannten fehlenden Expression von PR und ER.

3.2.3.3 FosB und PAI-1/uPAR

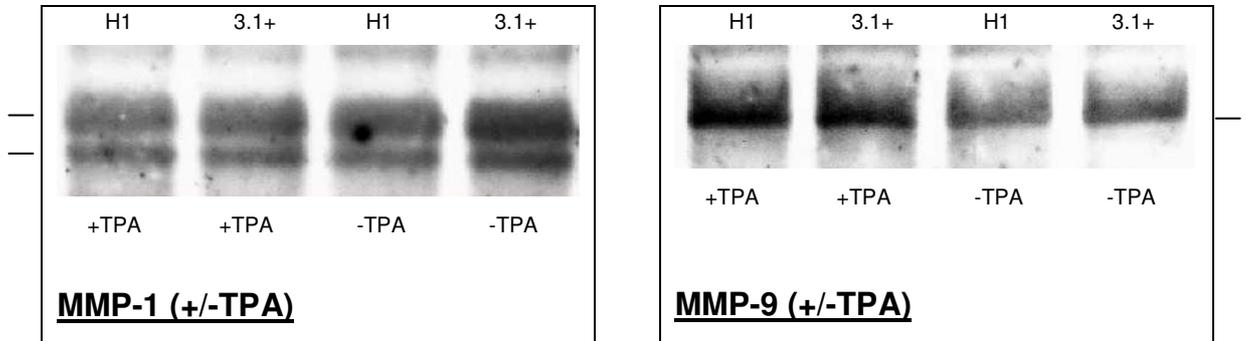
Abbildung 29: FosB und PAI-1/uPAR (Stimulation mit TPA)



Für uPAR zeigte sich eine verstärkte Expression unter TPA-Stimulation, sowohl in den mit H1 als auch in den mit 3.1+ transfizierten Zellen; somit konnte das Ergebnis aus Kapitel 3.1.3 bestätigt werden, wo in den Proteinextrakten der MDA-MB-Zelllinie unter TPA-Stimulation für uPAR ebenfalls eine stärker geschwärmte Bande beobachtet werden konnte. Kein Unterschied in der Expression ergab sich im Vergleich der mit H1 zu den mit 3.1+ transfizierten Zellen, weder in den unstimulierten noch in den stimulierten Zellen. Für PAI-1 waren keine eindeutigen Expressionsunterschiede ersichtlich.

3.2.3.4 FosB und MMPs (Stimulation mit TPA)

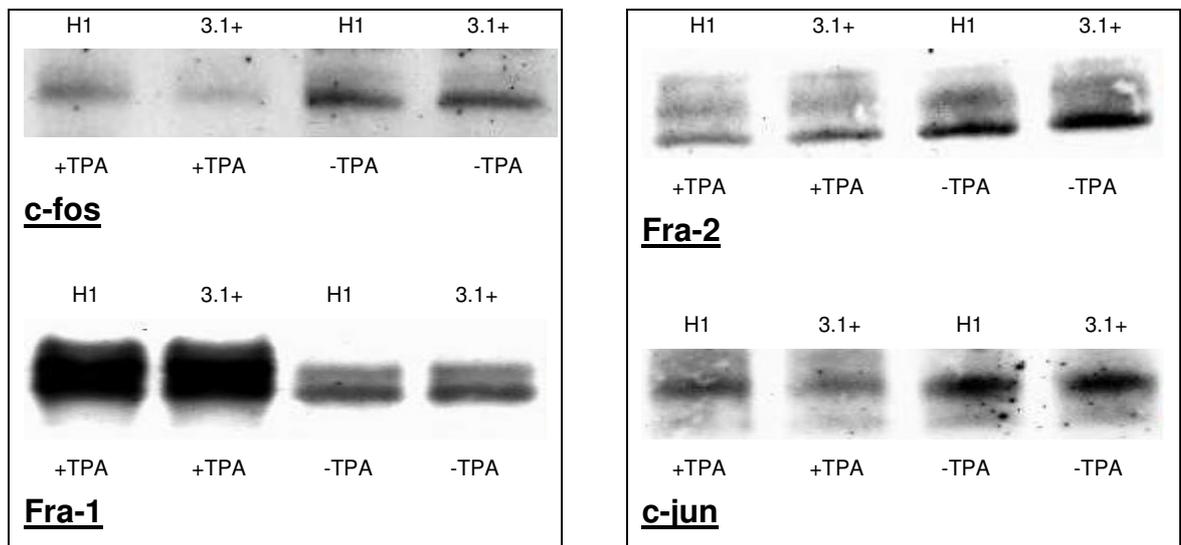
Abbildung 30: FosB und MMPs (Stimulation mit TPA)

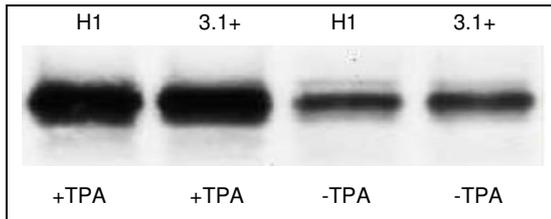
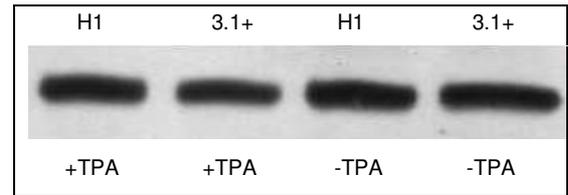
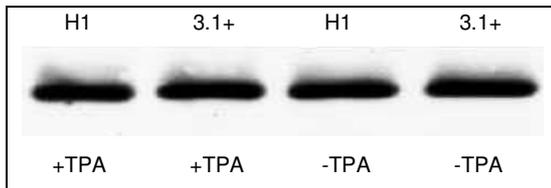


MMP-1 zeigte keine Änderung der Expression nach Stimulation mit TPA. Die beiden aktiven Formen bei 46 und 42 kD sind in der Abbildung randständig markiert. Für MMP-9 konnte eine Expressionverstärkung nach Stimulation mit TPA gesehen werden. Die Bande liegt bei 92 kD.

3.2.3.5 FosB und AP-1-Faktoren (Stimulation mit TPA)

Abbildung 31: FosB und AP-1-Faktoren (Stimulation mit TPA)



**JunB****Aktin****JunD**

C-fos zeigte unter TPA-Stimulation eher eine Abnahme der Expression für H1 und 3.1+. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in Kapitel 3.1.1, wo unter TPA-Stimulation in den MDA-MB-Zellen ein leicht verstärkte Expression gesehen werden konnte. Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse ergaben sich für Fra-2 und c-Jun; dort zeichnete sich ohne TPA-Stimulation eine verstärkte Bande ab. Die Plasmide H1 und 3.1+ zeigten keine deutlichen Unterschiede in der Expression.

Eine verstärkte Expression unter TPA-Stimulation (analog Kapitel 3.1.1) konnte für Fra-1 und JunB reproduzierbar beobachtet werden, welche jedoch für H1 wie auch 3.1+ gleich stark war.

Für JunD konnte eine gleichmässige Expression ohne Unterschiede mit oder ohne Stimulation und auch unabhängig von dem transfizierten Plasmid (H1 und 3.1+) nachgewiesen werden.

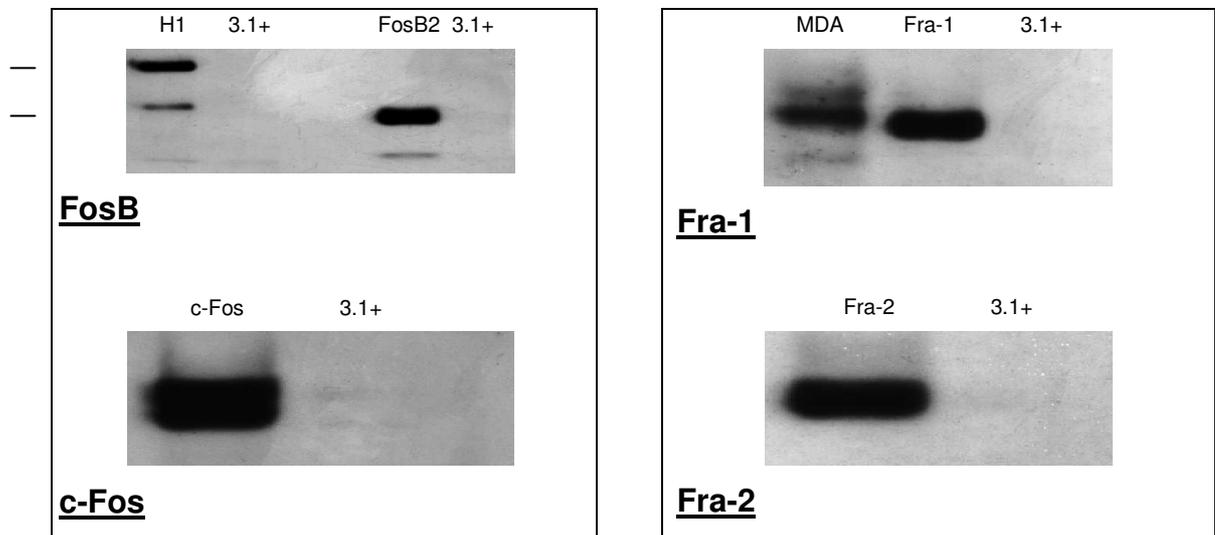
3.3. Untersuchung von Fos-Proteinen in MCF7-Zellen

Analog Kapitel 3.2.2 erfolgte in diesem Versuch die Untersuchung von Fos-Proteinen (FosB – H1, FosB₂, c-Fos, Fra-1, Fra-2) in der hormonrezeptorpositiven, schwach invasiv wachsenden Mammakarzinom-Zelllinie MCF7.

3.3.1. Transfektion MCF7 mit Plasmiden für Fos-Proteine

Die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 wurde transient mit FosB (H1), FosB₂, c-Fos, Fra-1 und Fra-2 transfiziert.

Abbildung 32: Transfektion MCF7 mit Fos-Proteinen

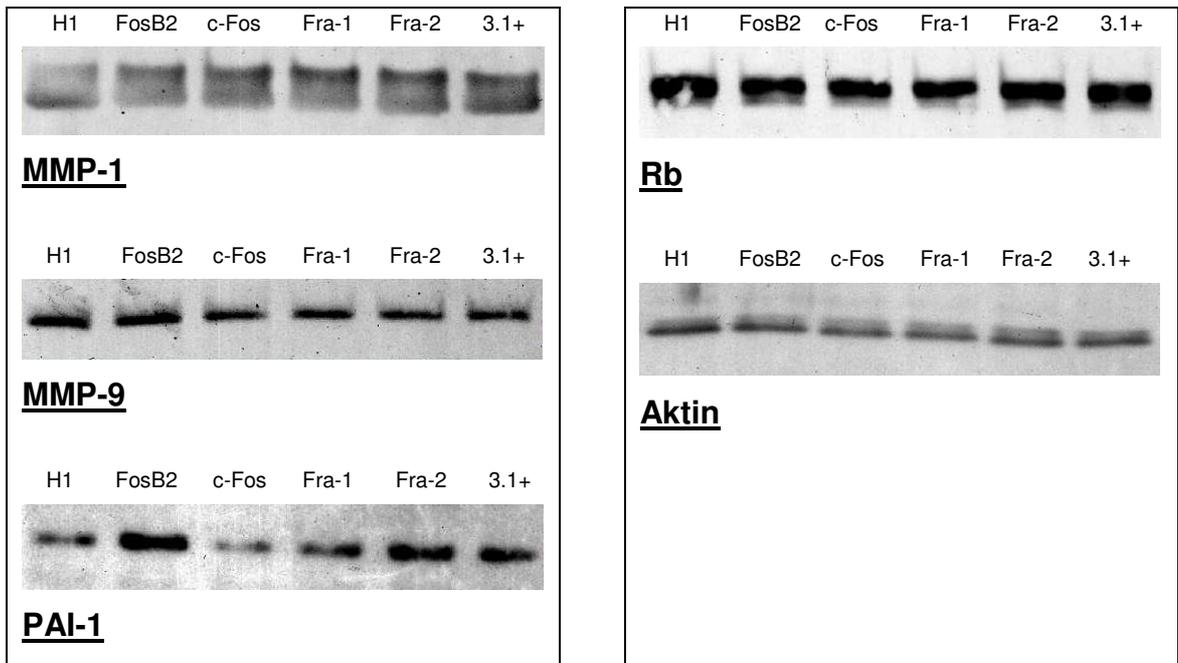


Die Abbildungen zeigen jeweils die erfolgreiche Transfektion mit den einzelnen Plasmiden aus der Gruppe der Fos-Proteine. In allen Beispielen war die Expression nach transienter Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid im Westernblot deutlich vorhanden im Gegensatz zu dem Leervektor 3.1+.

3.3.1.1 Fos-Proteine und MMPs, PAI-1 und Rb in MCF7-Zelllinie

Die Proteinextrakte aus der Transfektion der MCF7-Zelllinie mit FosB (H1), FosB₂, c-Fos, Fra-1 und Fra-2 (s. Abb. 32) wurden im Westernblot mit den Antikörpern für MMP-1/-9, Rb und PAI-1 detektiert.

Abbildung 33: Fos-Proteinen und MMPs, PAI-1, Rb in MCF7-Zelllinien



In der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 ergaben sich nach transientscher Transfektion mit Plasmiden für FosB (H1), FosB₂, c-Fos, Fra-1 und Fra-2 im Westernblot keine reproduzierbaren Expressionsunterschiede für die vier o.g. Zielproteine.

3.4. Untersuchungen zu ER und AP-1-Faktoren in MDA-MB

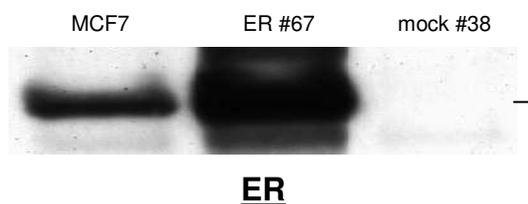
Um zu untersuchen, welche Auswirkung die Expression des Östrogen-Rezeptors (ER) auf die Proteinexpression von AP-1-Faktoren in einer hormonrezeptornegativen Mammakarzinom-Zelllinie hat, wurden die hormonrezeptornegativen MDA-MB-231-Zellen mit einem Expressionsvektor für ER transient transfiziert. Im Anschluss daran wurden die gewonnenen Proteinextrakte im Westernblot eingesetzt und auf die Proteinexpression jedes einzelnen AP-1-Faktors überprüft.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die MDA-MB-231-Zellen nach transients Transfektion mit ER für 24 Std. mit 17- β -Östradiol (E_2) in physiologischer Konzentration von 10^{-9} mol/l inkubiert. Danach wurde die Expression von AP-1-Faktoren in den transfizierten/stimulierten und den transfizierten/nicht-stimulierten Zellen verglichen.

3.4.1. Transfektion MDA-MB mit ER

Der folgende Westernblot zeigt die Transfektion der hormonrezeptornegativen MDA-MB-231-Zelllinie mit dem Plasmid ER (#67). Die hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen MCF7 diente als Positiv-, der Leervektor (mock #38) als Negativkontrolle.

Abbildung 34: Transfektion MDA mit ER

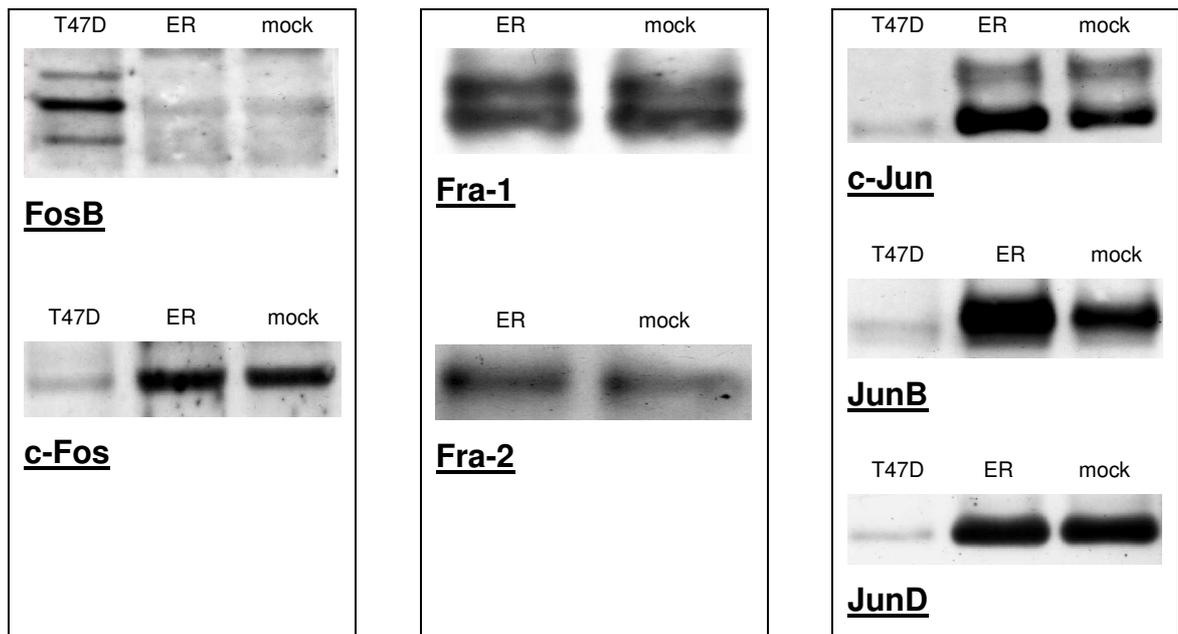


Die Abb. 34 zeigt das Westernblotergebnis für den Antikörper ER nach erfolgreicher Transfektion der Zelllinie MDA-MB mit dem Plasmid ER #67. Die eigentlich hormonrezeptornegative Zelllinie exprimiert nun ER im Vergleich zu den Proteinextrakten aus der Transfektion mit dem Leervektor (mock #38), welcher kein Insert für ER trägt. Die markierte Bande befindet sich bei 66 kD.

3.4.1.1 ER und AP-1-Faktoren

Die Proteinextrakte aus der Transfektion mit ER (s. Abb. 34) wurden im Westernblot auf Proteinexpression von AP-1-Faktoren überprüft (FosB, c-Fos, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, JunD). In einigen Westernblots ist die Mammakarzinom-Zelllinie T47D als Positivkontrolle abgebildet.

Abbildung 35: ER und AP-1-Faktoren

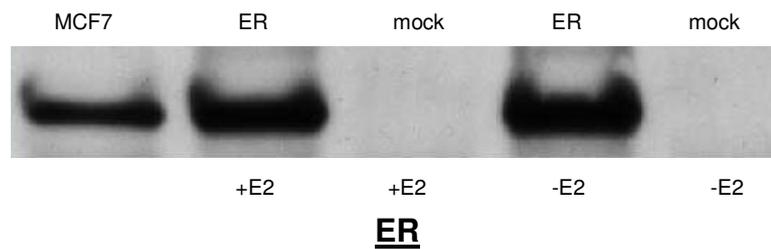


Für c-Jun und JunB war eine verstärkte Expression nach Transfektion mit ER erkennbar. Für FosB, c-Fos, Fra-1, Fra-2 und JunD ergaben sich keine Expressionsunterschiede.

3.4.2. Transfektion MDA-MB mit ER und Stimulation mit E₂

Die folgende Abbildung zeigt die Transfektion der hormonrezeptornegativen MDA-MB-231-Zelllinie mit dem Plasmid ER (#67). Die Mammakarzinomzelllinie MCF7 dient als Positiv- der Leervektor (mock #38) als Negativkontrolle. Nach der Transfektion wurden die Zellen 24 Std. mit E₂ stimuliert, bevor die Proteinextrakte für den Westernblot gewonnen wurden.

Abbildung 36: Transfektion MDA mit ER und Stimulation mit E₂

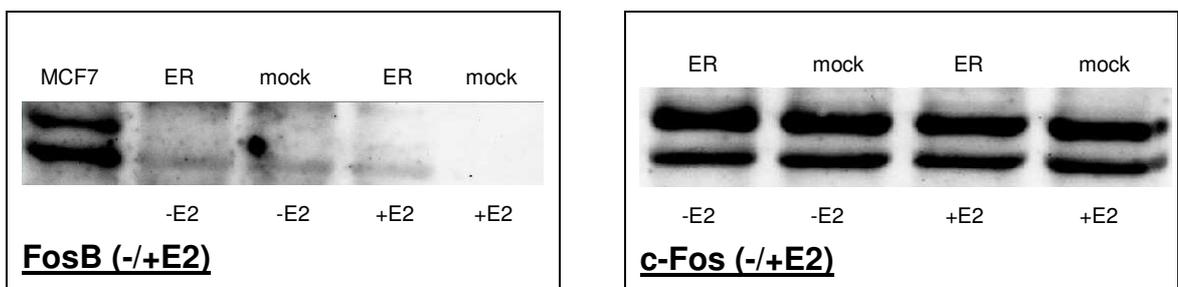


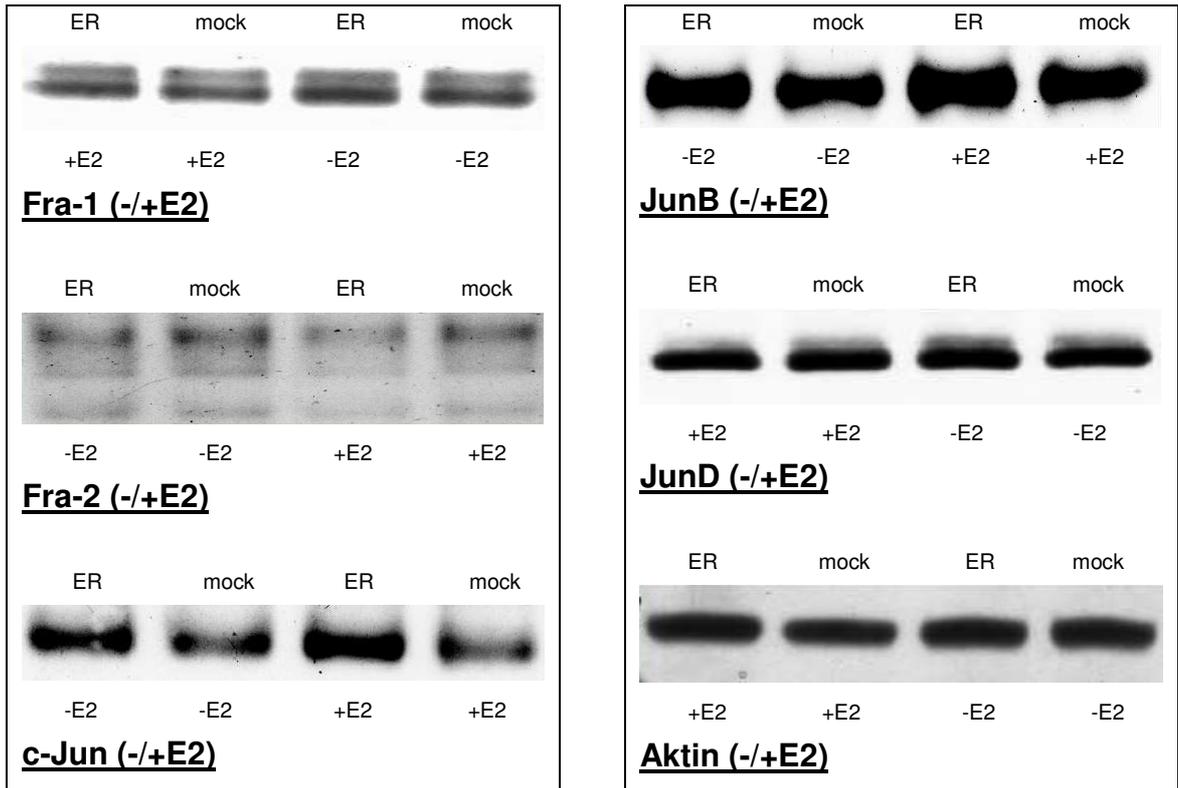
Unter Stimulation mit E₂ sind keine Expressionsunterschiede in den Banden für ER in den stimulierten und nicht-stimulierten MDA-MB-Zellen erkennbar. Die Stimulation mit E₂ erbrachte keine im Westernblot nachweisbare verstärkte Expression von ER im Vergleich mit der Transfektion von ER ohne Stimulation. Die Transfektion mit ER als solche konnte sicher reproduziert werden (vgl. Abb. 34).

3.4.2.1 ER und AP-1-Faktoren (Stimulation mit E₂)

Die folgenden Abbildungen zeigen den Einsatz der Proteine aus der Transfektion von MDA-MB mit ER im Westernblot und nachfolgender Stimulation mit 17- β -Östradiol (E₂) (s. Abb. 36). Die Proteinextrakten wurden mit den Antikörpern für AP-1-Faktoren (FosB, c-Fos, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, JunD) detektiert.

Abbildung 37: ER und AP-1-Faktoren (Stimulation mit E₂)





Für die Fos-Proteine ergaben sich keine Veränderungen in der Expression nach Stimulation mit E_2 . Bei der Untersuchung von Jun-Proteinen zeigte sich die zuvor (s. Abb. 35) beobachtete Expressionszunahme von c-Jun und JunB nach Transfektion mit ER, welche unter Stimulation mit E_2 noch leicht verstärkt wurde.

4. DISKUSSION

FosB ist ein Mitglied des AP-1-Komplexes, welcher sich aus sieben nukleären Transkriptionsfaktoren der Fos- und der Jun-Gruppe zusammensetzt. Diese Proteine binden als Antwort auf extrazelluläre Stimuli in Form von Dimeren an regulatorische DNA-Sequenzen von Zielgenen und üben so ihre Wirkung bei fundamentalen Prozessen der Zelle aus wie z.B. bei der Zellzykluskontrolle,²⁰⁵ Apoptose,²⁰⁶ Differenzierung,²⁰⁷ onkogenen Transformation²⁰⁸ und Tumorprogression.²⁰⁹

Verschiedene Untersuchungen an Brusttumorgewebe und Mammakarzinom-Zelllinien haben in den vergangenen Jahren gezeigt, dass den AP-1-Faktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese entarteter Brustzellen zukommt: In Mammakarzinomen fanden sich erhöhte Werte für verschiedene AP-1-Faktoren im Vergleich zu gesundem angrenzenden Gewebe,²¹⁰ während *Smith L.M. et al.* eine erhöhte c-Fos- und c-Jun-Expression in gesunden Mammazellen im Vergleich zu Mammakarzinom-Zelllinien finden konnten.²¹¹ *Chen T.K. et al.* beschrieben eine beeinträchtigte, wachstumsfaktorvermittelte Proliferation in Mammakarzinomzellen durch Hemmung von AP-1-Aktivität.²¹² Auf der anderen Seite folgte auf die Behandlung von Mammakarzinom-Zelllinien mit EGF (engl. *epidermal growth factor*) eine zeitlich gestaffelte Induktion von mRNA-Expression verschiedener AP-1-Faktoren, welche in die Apoptose der Zellen mündete.²¹³ C-Jun-Überexpression resultierte in MCF7-Zellen in einem ER-resistenten Phänotyp, der eine erhöhte Invasionsrate, Aggressivität und MMP-9-Expression aufwies.^{214,215} In einigen Mammakarzinom-Zelllinien konnte das Zellwachstum und AP-1-Aktivität über eine dominant negative c-Jun-Mutante (TAM67) gehemmt werden; dieses traf auf MCF7-Zellen und auf normale Mammazellen zu, jedoch nicht auf MDA-MB-231 und T47D.²¹⁶ TAM67 fehlt die transaktivierende Domäne von c-Jun, ist aber noch in der Lage, mit Fos- und Jun-Proteinen zu dimerisieren und an DNA-Sequenzen mit

²⁰⁵ Vgl. *Kovary K. et al.*, Jun and fos are both required for cell cycle progression in fibroblast. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 4466-4472.

²⁰⁶ Vgl. *Preston G. et al.*, Induction of apoptosis by c-fos protein. *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 211-218.

²⁰⁷ Vgl. *Lord K. et al.*, Protooncogenes fos/jun are positiv regulators of myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 841-851.

²⁰⁸ Vgl. *Angel P. et al.*, The role of AP-1-complex in cell-proliferation and transformation. *Bio. Acta* 1071 (1991) 129-157.

²⁰⁹ Vgl. *Saez E. et al.*, C-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 82 (1995) 721-734.

²¹⁰ Vgl. *Linardopoulos S. et al.*, Elevated expression of AP-1 activity in human breast tumors as compared to normal adjacent tissue. *Anticancer Res.* 1990 Nov-Dec;10(6):1711-3.

²¹¹ Vgl. *Smith L.M. et al.*, Breast cancer cells have lower activating protein 1 transcription factor activity than normal mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1997 Jul 15;57(14):3046-54.

²¹² Vgl. *Chen T.K. et al.*, Activation and inhibition AP-1 in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 1996 Mar; 15(3):215-26.

²¹³ Vgl. *Schaerli P. et al.*, EGF-induced programmed cell death of human mammary carcinoma MDA-MB-468 cells is preceded by activation AP-1. *Cell Mol Life Sci.* 1998 Feb;54(2):129-38.

²¹⁴ Vgl. *Smith L.M. et al.*, cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene.* 1999 Oct 28;18(44):6063-70.

²¹⁵ Vgl. *Rinehart-Kim J. et al.*, Alterations in the gene expression profile of MCF-7 breast tumor cells in response to c-Jun. *Int J Cancer.* 2000 Oct 15;88(2):180-90.

²¹⁶ Vgl. *Ludes-Meyer J.H. et al.*, AP-1 blockade inhibits the growth of normal and malignant breast cells. *Oncogene.* 2001 May 17;20(22):2771-80.

dem AP-1-Motiv zu binden.²¹⁷ Durch TAM67 konnte zudem in MCF7-Zellen über AP-1-Blockade, über eine verminderte Expression von D- und E-Cyclinen und eine verstärkte Expression vom CDK-Inhibitor p27 ein Zellzyklusarrest bei G1 erreicht werden.²¹⁸ Es gibt Hinweise darauf, dass die AP-1-Blockade durch TAM67 v.a. über eine Interaktion von TAM67 mit Fos-Proteinen (in diesem Beispiel mit c-Fos) und nicht mit Jun-Proteinen geschieht²¹⁹.

Für Fra-1 konnte eine Östrogen-vermittelte Hemmung der Zellproliferation von Mammakarzinom-Zelllinien gezeigt werden, die mit einem ER α -Expressionvektor transfiziert worden waren.²²⁰ In stabil transfizierten MDA-MB-231- und MCF7-Zellen war Fra-1 dagegen positiv assoziiert mit erhöhter Zellproliferation, Zellmobilität und Invasivität.²²¹ C-Fos und phosphoryliertes Fra-1 korrelierte in Mammakarzinomgewebe positiv mit MMP-9. Eine starke Fra-2-Expression war mit erhöhten Werten für MMP-9, PAI-1 und uPA-PAI-1-Komplex sowie mit einem frühen Rezidiv assoziiert.²²²

Die Tatsache der zahlreichen, z.T. scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse deutet darauf hin, dass über die Bedeutung und die komplexe Regulation dieses Transkriptionskomplexes, jedes einzelnen seiner Mitglieder und deren Effektorgene im Mammakarzinom noch keine allgemeingültige Aussage getroffen werden kann und dass die Notwendigkeit besteht, sich der Aufklärung schrittweise zu nähern.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit resultierte aus den Untersuchungen von AP-1-Faktoren an Geweben von 53 Mammakarzinomen und zwei Mammakarzinom-Zelllinien im Zusammenhang mit klinischen Parametern, in denen die Expression von FosB eine positive Korrelation zu einem hormonrezeptorpositiven, gut-differenzierten Phänotyp zeigte.²²³ FosB korrelierte im Mammakarzinomgewebe ausserdem positiv mit den beiden Isoformen des Progesteronrezeptors (PR-A und PR-B), wobei die Beziehung zu PR-B stärker war im Vergleich zu PR-A. Die Prädominanz von PR-B zu PR-A war mit einem niedrigeren Grading assoziiert.²²⁴ Für eine FosB-Überexpression fand

²¹⁷ Vgl. *Brown P.H. et al.*, 1996 Dominant-negative mutants of cJun inhibit AP-1 activity through multiple mechanisms and with different potencies. *Cell Growth Differ* 7:1013–1021.

²¹⁸ Vgl. *Liu Y. et al.*, AP-1 blockade in breast cancer cells causes cell cycle arrest by suppressing G1 cyclin expression and reducing cyclin-dependent kinase activity. *Oncogene*. 2004 Oct 28;23(50):8238-46.

²¹⁹ Vgl. *Lu C. et al.*, cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. *Onc*. 2005 Sep 29, 14:6516-24.

²²⁰ Vgl. *Philips A. et al.*, FRA-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 1998 Jul;12(7):973-85.

²²¹ Vgl. *Belguise K. et al.*, FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene*. 2005 Feb 17;24(8):1434-44.

²²² Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Jul;86(2):139-52.

²²³ Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, 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*. 1999 Oct 22;84(5):533-8.

²²⁴ Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, Progesterone receptor isoforms in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm Res*. 2000;54(1):32-7.

sich im Brusttumorgewebe auch eine Korrelation zu einer starken Rb- und einer schwachen p16-Expression.²²⁵

Stimulation mit dem Phorbolster TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)

TPA ist ein Tumorpromotor und beeinflusst Zellwachstum und Proliferation durch irreversible Aktivierung der Proteinkinase C (PKC).²²⁶ Die Proteinkinase C existiert in Form einer grossen Isoenzym-Familie, von denen jeder Isoform eine individuelle Rolle in der Signaltransduktion zugeschrieben wird. Die Aktivierung der PKC mündet in einer Phosphorylierungskaskade, welche über den ERK1/2-Signalweg (Ras → Raf → MEK1/2 → ERK1/2) zur Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Fos, c-Jun und JunD führen kann.²²⁷ Von TPA ist bekannt, dass es den Transkriptionsfaktor SRF (engl. *serum response factor*) aktiviert, welcher an SREs (engl. *serum response elements*) bindet. Über diesen Weg kann die Expression von frühen Antwortgenen (engl. *immediate early genes*) wie c-Fos, FosB und JunB reguliert werden.²²⁸

Erhöhte Proteinkinase-C-Aktivität in maligne verändertem Brustgewebe sowie in den meisten Mammakarzinom-Zelllinien und die inverse Korrelation von PKC zu einem negativen ER-Status²²⁹ haben die Vermutung nahegelegt, dass PKC eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese und Tumorprogression von Mammakarzinomen spielt. Nach Stimulation mit TPA zeigten ER-positive MCF7-Zellen eine drastische Zunahme der Invasivität *in vitro*; diese Beobachtung war nach Behandlung mit einem PKC-Inhibitor komplett rückläufig. Die ER-negativen MDA-MB-231-Zellen zeigten im Gegensatz dazu eine Abnahme der Invasivität nach TPA-Stimulation. Der PKC-Inhibitor hatte einen gleichsinnigen Effekt. Dieser gegensätzliche Effekt von TPA in ER-positiven und ER-negativen Zelllinien wurde mit einer abnormen Regulation der PKC α , einer Isoform von PKC, in den ER-negativen Zellen erklärt.²³⁰ Nachdem in der Promotorregion von mehreren TPA-induzierbaren Genen (z.B. Kollagenase, Stromelysin, hMT IIA und SV40) AP-1-Bindungsmotive (TREs mit dem Motiv TGACTCA) identifiziert worden waren, lag die Annahme nahe, dass AP-1 am Ende einer komplexen Signalstrecke als Antwort auf TPA-Einwirkung Gentranskription induziert.²³¹

²²⁵ Vgl. Milde-Langosch K. et al., 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 AP-1 family members. *Int J Cancer*. 2000 Aug 15;87(4):468-72.

²²⁶ Vgl. Blobel G.C. et al., Regulation of PKC and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev*. 1994 Dec;13(3-4):411-31.

²²⁷ Vgl. Schonwasser D.C. et al., (1998) Activation of the MAPK/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell Biol*. 18, 790-798.

²²⁸ Vgl. Chai J. et al., Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol*. 2002 Jun;53(2):147-57.

²²⁹ Vgl. Tonetti D.A. et al., Stable transfection of protein kinase C alpha cDNA in hormone-dependent breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2000 Sep;83(6):782-91.

²³⁰ Vgl. Platet N. et al., Breast cancer cell invasiveness: correlation with PKC activity and differential regulation by phorbol ester in ER-positive and -negative cells. *Int J Cancer*. 1998 Mar 2;75(5):750-6.

²³¹ Vgl. Angel P. et al., Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*. 1987 Jun 19;49(6):729-39.

Um die Auswirkung von TPA auf die Proteinexpression von AP-1-Faktoren, Zellzyklusregulatoren, MMPs und Mitglieder des Proteinasesystems uPA zu untersuchen, wurden die beiden Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 für 24 Std. mit TPA in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l inkubiert. Die Proteinextrakte wurden dann im Westernblot mit den jeweiligen Antikörpern detektiert.

Für AP-1-Faktoren war die Expression von c-Fos, c-Jun und JunB nach TPA-Stimulation im Vergleich mit unstimulierten Zellextrakten in beiden Zelllinien verstärkt. Die Expressionserhöhung war besonders deutlich für JunB und c-Jun in der weniger invasiven, hormonrezeptorpositiven MCF7-Zelllinie.

Für c-Jun konnte in Mäusen eine erhöhte Gentranskription unter TPA-Stimulation gefunden werden.²³² Eine Erhöhung von c-Jun-RNA nach TPA-Einwirkung *in vitro* erfolgte sowohl über transkriptionelle wie auch posttranskriptionelle Mechanismen.²³³ Der transkriptionelle Weg wird u.a. über eine Proteinkinase-C-vermittelte positive Autoregulation erreicht, bei welcher c-Jun-Transkription über eine AP-1-Bindungsstelle in seinem Promotor durch sein eigenes Genprodukt stimuliert wird.²³⁴ In MCF7-Zellen führte TPA-Einwirkung zu einer langandauernden Aktivierung von Erk-2 (einer MAP-Kinase), die eine Erhöhung von c-Jun- und JunB-mRNA zur Folge hatte, wobei JunB länger als c-Jun nachzuweisen war. Die Hemmung von Erk-2 führte zu einem Verlust von JunB, nicht aber von dem parallel durch Insulin induzierten c-Jun.²³⁵ JunB zeigte auch in Hautzellen eine verstärkte Expression nach TPA-Behandlung.²³⁶ Im Gegensatz dazu führte eine TPA-Stimulation in Maus-Lymphomzellen zu erhöhten mRNA-Levels von FosB und JunB, wohingegen keine erhöhte Transkription von c-Fos und c-Jun gefunden wurde.²³⁷

Die Tatsache, dass die schwächer invasiven, hormonrezeptorpositiven MCF7-Zellen keine Expression von Fra-1 und die stark invasiven, hormonrezeptornegativen MDA-MB-231-Zellen keine Expression für FosB zeigen, war bereits aus früheren Untersuchungen bekannt.²³⁸ In den Fra-1-negativen MCF7 führte TPA zur Expression einer 42 kD-Bande, die dem phosphorylierten Fra-1 entspricht. Es stellt sich die Frage, ob Fra-1 nach TPA-Stimulation das vorherrschende Fos-Protein in der Heterodimerkonfiguration mit c-Jun und JunB in den Mammakarzinomzelllinien ist. Demgegenüber steht die Be-

²³² Vgl. Lamph W.W. *et al.*, Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature*. 1988 Aug 18;334(6183):629-31.

²³³ Vgl. Shermann M.L. *et al.*, Transcriptional and post-transcriptional regulation of c-jun expression during differentiation of human myeloid leukemic cells. *J Biol Chem*. 1990 Feb 25;265(6):3320-3.

²³⁴ Vgl. Angel P. *et al.*, The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*. 1988 Dec 2;55(5):875-85.

²³⁵ Vgl. Albas J. *et al.*, MAPK in TPA-mediated cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Oncogene*. 1998 Jan 8;16(1):131-9.

²³⁶ Vgl. Schlingemann J. *et al.*, Profile of gene expression induced by the tumour promoter TPA in murine epithelial cells. *Int J Cancer*. 2003 May 10;104(6):699-708.

²³⁷ Vgl. Boessen J.J. *et al.*, Concomitant induction of signal transduction pathways and genetic instability by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*. 1991 Mar;12(3):487-92.

²³⁸ Vgl. Milde-Langosch K. *et al.*, 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*. 1999 Oct 22;84(5):533-8.

obachtung von *Yoshioka K. et al.*, die nach Hemmung von TPA durch BHQ (einem phenolischen Antioxidans) in HeLa- Zellen eine Veränderung der AP-1-Komplexbildung von Jun/Fos-Dimeren zugunsten von Jun/Fra-Dimeren beschrieben. Diese Jun/Fra-Dimere hemmten die TPA-vermittelte Aktivität der Jun/Fos-Dimere und übten so einen hemmenden Effekt auf AP-1-Aktivität aus.²³⁹ Für Fra-1 konnte von *Adisshaiah P. et al.* gezeigt werden, dass die Stimulation durch TPA nicht allein über das TRE-Motiv erfolgt, sondern dass das Serum-Antwort-Element (SRE) im Promotor für die Induktion durch TPA essenziell ist.²⁴⁰ Unverändert blieb in der hier vorgelegten Arbeit die Expression von FosB, Fra-2 und JunD, obwohl auch die Expression von FosB durch den SRF (engl. *serum response factor*) induziert werden kann.²⁴¹ Dies kann daran liegen, dass die Zellextrakte nach 24-stündiger TPA-Stimulation gewonnen wurden und somit eine frühe, vorübergehende Expression von FosB nicht erfasst wurde.

Unter den Zellzyklusproteinen zeigte p21 nach TPA-Behandlung eine deutliche Expressionszunahme, sowohl in den MCF7- als auch in den MDA-MB-231-Zellen, wobei in den unstimulierten MDA-MB-231-Zellen p21 schwach bis kaum nachweisbar war. Cyclin D und Cyclin E zeigten keine eindeutigen Veränderungen. Sie waren in beiden Zelllinien unabhängig von der TPA-Stimulation etwa gleich stark exprimiert.

Der Effekt von TPA auf die Expression von p21 ist aus anderen Untersuchungen bekannt: Die Proteinkinase-C-vermittelte Aktivierung von p21 durch TPA erfolgte in menschlichen T-Zellen über eine von sechs Sp1-Bindungsstellen im Promotor von p21.²⁴² In Darmkrebszellen führte eine Überexpression von Proteinkinase C zu einem G1-Arrest; dieser wurde erklärt durch eine erhöhte Protein- und mRNA-Expression des Zellzyklusinhibitors p21, durch eine vermehrte Bindung des CDK-Inhibitors p27 an CDK4 und eine Herunterregulierung von Cyclin D und Cyclin E, wobei deren mRNA-Level unverändert blieben.²⁴³ In drei Leukämie-Zelllinien hatte die Behandlung mit TPA ebenfalls eine erhöhte p21-Genexpression zur Folge. Es zeigte sich jedoch gleichzeitig eine Cyclin-D-Überexpression. Daraus wurde gefolgert, dass beide Proteine in einer Korrelation zueinander stehen und dass eine erhöhte Cyclin-D-Expression durch p21 kompensiert wird.²⁴⁴

²³⁹ Vgl. *Yoshioka K. et al.*, Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression.. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 23;92(11):4972-6.

²⁴⁰ Vgl. *Adisshaiah P. et al.*, Mitogen regulated induction of FRA-1 proto-oncogene is controlled by the transcription factors binding to both serum and TREs.Oncogene. 2005 Jun 16;24(26):4193-205.

²⁴¹ Vgl. *Chai J. et al.*, Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. J Physiol Pharmacol. 2002 Jun;53(2):147-57. Review.

²⁴² Vgl. *Aboud M. et al.*, PA activates p21WAF-1 promoter in human T-cells through its second most up-stream Sp1 site. Biochem Biophys Res Commun. 2003 May 16;304(4):696-700.

²⁴³ Vgl. *Cerda S.R. et al.*, Protein kinase C delta inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. Oncogene. 2006 Jan 23; [Epub ahead of print.

²⁴⁴ Vgl. *Ullmannova V. et al.*, Relationship between cyclin D1 and p21(Waf1/Cip1) during differentiation of human myeloid leukemia cell lines. Leuk Res. 2003 Dec;27(12):1115-23.

Rb zeigte in den stark-invasiven, hormonrezeptorpositiven MDA-MB-231-Zellen eine verstärkte Expression nach TPA-Behandlung. In den MCF7-Zellen war die Expression von Rb gleich stark (unabhängig von der Behandlung mit TPA). Generell war in den nicht-stimulierten hormonrezeptorpositiven MCF7-Zellen die Rb-Expression stärker im Vergleich zu den nicht-stimulierten hormonrezeptornegativen MDA-MB-Zellen. Deutliche Unterschiede im Phosphorylierungsstadium von Rb war anhand der gleichen Höhe der Banden nicht zu erkennen. Eine erhöhte Expression von Rb nach Stimulation mit TPA kann wie folgt erklärt werden: In HL60-Zellen führte eine TPA-Stimulation zu einem Zellzyklusarrest bei G1 durch p21-Akkumulation. P21 kann im Komplex mit CDK2/4 die Phosphorylierung von Rb blockieren und in seinem aktiven Zustand halten. Daher resultierte in diesem Versuch die TPA-Stimulation in einer vermehrten Komplexbildung von Rb mit einem seiner Effektorproteine, dem Transkriptionsfaktor E2F1.²⁴⁵ In MCF7-Zellen hatte eine TPA-Behandlung einen G0/G1-Arrest und eine erhöhte Expression von p21 und von hypophosphoryliertem Rb zur Folge.²⁴⁶ In einer Lymphom-Zelllinie führte TPA-Stimulation zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen, wobei sich eine Herunterregulierung von c-Fos und eine Hochregulierung von Rb zeigte. Daraus ergab sich die Vermutung, dass eine hohe Rb-Expression eine wichtige Rolle beim Aufrechterhalten eines differenzierten Phänotyps spielt, während ein mit Proliferation assoziierter Transkriptionsfaktor wie c-Fos supprimiert wird.²⁴⁷

Für PAI-1 konnte in den MDA-MB-Zellen eine leichte Expressionszunahme unter TPA-Behandlung beobachtet werden. In den MCF7-Zellen war keine Veränderung feststellbar, wobei PAI-1 wenig bis kaum nachweisbar war. Dagegen zeigte uPAR eine sehr starke Zunahme der Expression nach TPA-Stimulation in den MDA-MB-231-Zellen. In den MCF7-Zellen war uPAR unabhängig von der Inkubation mit TPA kaum exprimiert. Bei Versuchen mit den ER-positiven MCF7-Zellen und einer ER-negativen, aggressiven MCF7-Subgruppe konnten *Ree A.H. et al.* nach TPA-Stimulation eine 10- bis 15-fach erhöhte mRNA-Menge für PAI-1 und MMP-9 in der ER-unabhängigen Zelllinie im Gegensatz zu den normalen MCF7-Zellen feststellen. Beide Zelllinien zeigten nach der TPA-Behandlung eine verstärkte Migration.²⁴⁸ uPAR- und uPA-Expression konnte in Mammakarzinom-Zelllinien über den PKC-ERK1/2-Signalweg erhöht werden.²⁴⁹ In

²⁴⁵ Vgl. *Cho J.W. et al.*, p21(WAF1) is associated with CDK2 and CDK4 protein during HL-60 cell differentiation by TPA treatment. *Cell Prolif.* 2001 Oct;34(5):267-74.

²⁴⁶ Vgl. *Narvaez C.J. et al.*, Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and TPA on cell cycle and apoptosis of MCF-7 cells and a D3-resistant variant. *Endocrinology.* 1997 Nov;138(11):4690-8.

²⁴⁷ Vgl. *Yen A. et al.*, 1,25-Dihydroxy vitamin D3 and TPA synergistically induce monocytic cell differentiation: Fos and Rb expression. *J Cell Physiol.* 1993 Jul;156(1):198-203.

²⁴⁸ Vgl. *Ree A.H. et al.*, Regulation of tissue-degrading factors and in vitro invasiveness in progression of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 1998 Apr;16(3):205-15.

²⁴⁹ Vgl. *Aguirre Ghiso J.A. et al.*, Dereglulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur J Biochem.* 1999 Jul;263(2):295-304.

MCF7-Zellen führte eine TPA-Behandlung zu einer 7- bis 8-fachen Expressionserhöhung von uPAR und uPA. Die Invasivität der MCF7-Zellen zeigte sich unter TPA-Inkubation um das 18-fache erhöht.²⁵⁰

Bei Untersuchung der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-9 zeigte MMP-1 eine unveränderte Expression in stimulierten und unstimulierten Proteinextrakten. Für MMP-9 war eine leichte Zunahme der Expression nach TPA-Stimulation in den MDA-MB-Zellen zu sehen, während die Expression in den MCF7-Zellen nicht verändert war. Dieses Ergebnis stimmt nur teilweise mit früheren Untersuchungen zur MMP-Expression in Mammakarzinomzelllinien überein: So beschrieben *Bachmeier B.E. et al.*²⁵¹ eine verstärkte zytoplasmatische Anreicherung von MMP-1 und MMP-9 in den höher-invasiven MDA-MB-231- und MDA-MB-435-Zellen im Gegensatz zu den niedrig-malignen MCF7-Zellen; auf Proteinebene konnten in dieser Arbeit keine Expressionsunterschiede für MMP-1 und MMP-9 zwischen den beiden Zelllinien MDA-MB-231 und MCF7 nachgewiesen werden. *Rutter G. A. et al.* konnten nach TPA-Stimulation in den Zelllinien MDA-MB-231, MCF7 und T47D eine Expressionsverstärkung von MMP-1, -2, -9 und -10 finden. Die Überexpression verschiedener PKC-Isoformen führte dort zu einer Aktivitätssteigerung des MMP-1-Promotors.²⁵² Für MMP-9 konnte die TPA-induzierte Überexpression in MDA-MB-231 und MCF7 durch einen MAP-Kinase-Inhibitor reduziert werden.²⁵³ *Barrett J.M. et al.* beschrieben eine Induzierung von MMP-9-Aktivität in MCF7-Zellen und eine Erhöhung der MMP-9-Aktivität in MDA-MB-231-Zellen nach TPA-Stimulation.²⁵⁴ *Mackay A.R. et al.* hingegen konnten in MDA-MB-231-Zellen eine starke Expression von MMP-9 nachweisen, die sich durch TPA-Stimulation nicht veränderte.²⁵⁵

Transiente Transfektion mit FosB und Stimulation mit TPA

Der Transkriptionsfaktor FosB wurde an zwei Mammakarzinom-Zelllinien untersucht, die sich bezüglich ihres Hormonrezeptorstatus' und ihrer Fähigkeit zur Invasion *in vitro*²⁵⁶ unterscheiden: die schwach invasiven, hormonrezeptorpositiven MCF7-Zellen

²⁵⁰ Vgl. *Johnson M.D. et al.*, Regulation of motility and protease expression in PKC-mediated induction of MCF-7 breast cancer cell invasiveness. *Exp Cell Res.* 1999 Feb 25;247(1):105-13.

²⁵¹ Vgl. *Bachmeier B.E. et al.*, MMPs in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Res.* 2001 Dec; 21 (6A) 3821-8.

²⁵² Vgl. *Rutter G. A. et al.*, (1995) Involvement of MAP kinase in insulin signalling revealed by noninvasive imaging of luciferase gene expression in single living cells. *Curr. Biol.* 5,890-899.

²⁵³ Vgl. *Bartsch J.E. et al.*, MMPs expression in breast cancer. *J Surg Res.* 2003 Apr;110(2):383-92.

²⁵⁴ Vgl. *Barrett J.M. et al.*, Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Apr;72(3):227-32.

²⁵⁵ Vgl. *Mackay A.R. et al.*, Effect of phorbol ester and cytokines on MMPs and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion Metastasis.* 1992;12(3-4):168-84.

²⁵⁶ Vgl. *Sommers C.L. et al.*, Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1994; 31(2-3):325-35.

und die stark invasiven, hormonrezeptornegativen MDA-MB-231-Zellen. Die MDA-MB-231-Zelllinie zeigte eine schwache bis fehlende Expression von FosB.

Durch die Methode der transienten Transfektion mit einem FosB-Expressionsvektor wurde in den MDA-MB-231-Zellen eine forcierte Überexpression von FosB-Protein erreicht. Zusätzlich zum FosB-Wildtyp H1 wurden auch die FosB-Mutante H11, das alternative Spleissprodukt FosB₂ und c-Fos transfiziert. In die MCF7-Zelllinie wurden alle Fos-Proteine (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) als Vektoren transfiziert. Die gewonnenen Proteinextrakte wurden im Westernblot auf die Expression von den übrigen AP-1-Faktoren, Zellzyklusproteinen, Hormonrezeptoren, Matrix-Metalloproteinasen, uPAR und PAI-1 überprüft.

Im Blocking-Peptid-Versuch waren zuvor die spezifischen FosB-Banden verifiziert worden. Interessanterweise zeigte die FosB-negative MDA-MB-231-Zelllinie (nach Transfektion mit H1) im Gegensatz zu zwei ausgewählten Mammatumoren und zur hormonrezeptorpositiven T47D-Mammakarzinom-Zelllinie die zusätzliche Expression des alternativen Spleissprodukts FosB₂. Zudem lag die Bande für FosB₂ in den MDA-MB-231 etwas niedriger, was ein Hinweis auf ein weniger phosphoryliertes FosB-Protein sein kann.

Vor dem Hintergrund, dass der Phorbolester TPA eine Phosphorylierungskaskade induziert, an deren Ende die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 gesteigert werden kann, wurden in einem weiteren Versuch die mit dem FosB-Expressionsvektor transfizierten MDA-MB-Zellen zusätzlich für 24 Std. mit TPA in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l inkubiert. Obwohl TPA in den FosB-negativen MDA-MB-231-Zellen keine Auswirkungen auf die fehlende Expression von FosB-Protein hatte, war nach Transfektion mit H1 und anschließender TPA-Zugabe die Bande für FosB im Vergleich zur Transfektion mit H1 ohne TPA-Stimulation verstärkt. Im Anschluss daran wurde im Westernblot überprüft, welche Auswirkungen die erhöhte oder Überexpression von FosB nach Transfektion und zusätzlicher TPA-Stimulation auf die Expression von etwaigen Zielproteinen hat.

Die transiente Transfektion ermöglicht das kurzfristige Einbringen fremder DNA in eine grosse Anzahl von Zielzellen (im Gegensatz zur stabilen Transfektion, bei welcher eine Etablierung von Zellklonen mit dauerhafter Integration ins Wirtsgenom erfolgt). Vorteilhaft ist, dass eine funktionelle Untersuchung nach 1-3 Tagen möglich ist und dass relativ wenig Zellen und DNA erforderlich sind. Die Nachteile liegen in der fehlenden Etablierung länger verwendbarer, gut charakterisierter Klone, einer Proteinexpression, die

lediglich dem Mittelwert aller Zellen entspricht, und in der erhöhten Variabilität bei Wiederholungen der Transfektion. Wenn 20-40 % der Zellen den Vektor aufnehmen, ist die Transfektionseffizienz relativ hoch. Durch immunhistochemische Darstellungen konnte später gezeigt werden, dass mit der Lipofektions-Methode im Schnitt nur etwa 5 % der Zellen transient transfiziert wurden.

Zur Bestimmung der Proteinexpression wurden die Proteinextrakte der Zellen im Westernblot eingesetzt. Ein Westernblot ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Proteinexpression und eignet sich gut zur Darstellung verschiedener Isoformen oder unterschiedlicher Phosphorylierungsstadien von Proteinen. Mit dieser Methode kann jedoch keine Aussage über die Lokalisation der Proteinexpression in den einzelnen Zellkompartimenten (Nukleus, Zytoplasma u.ä.) getroffen werden, welches Rückschlüsse über die Funktion des Proteins zulassen könnte.

FosB und AP-1-Faktoren

Die Transfektion mit FosB (H1), FosB (H11), FosB₂ und c-Fos führte in den MDA-MB-231-Zellen zu keiner Expressionsveränderung von Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB und JunD. Insbesondere zeigte sich keine Herabregulierung der Fra-1-Expression. Die inverse Korrelation von FosB mit Fra-1, die bei der Untersuchung im Mammakarzinomgewebe aufgefallen war, ist somit wohl nicht über eine direkte Hemmung des Fra-1-Promotors durch FosB-haltige Dimere erklärbar.²⁵⁷

FosB und Zellzyklusregulatoren

Die Transfektion von FosB (H1), FosB-Mutante (H11), FosB₂ und c-Fos hatte für die Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin B, Cyclin D, Cyclin E, p21, p53, Rb und Rb2 in den ER-negativen, stark invasiven MDA-MB-Zellen keine Veränderung zur Folge. Insbesondere konnten kein unterschiedlicher Effekte für die verschiedenen FosB-Formen festgestellt werden. Die Rb-Expression war in den MCF7-Zellen nach Transfektion mit den Fos-Expressionsvektoren (H1, FosB₂, Fra-1, Fra-2) gleichmässig vorhanden.

Eine erhöhte Rb-Expression mit Nachweis einer möglicherweise hypophosphorylierten Bande nach Transfektion mit H1 in den MDA-MB-Zellen zeigte sich in einem Westernblot. Dieses Ergebnis konnte später jedoch nur inkonstant reproduziert werden, so dass sich im Gegensatz zu den Untersuchungen am Brusttumorgewebe²⁵⁸ in

²⁵⁷Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, 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*. 1999 Oct 22;84(5):533-8.

²⁵⁸Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, 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 AP-1 family members. *Int J Cancer*. 2000 Aug 15;87(4):468-72.

den Mammakarzinomzelllinien keine positive Assoziation zwischen FosB und Rb ergab. Eine eindeutige Aussage kann jedoch nicht getroffen werden, da geringe Expressionsveränderungen im Westernblot bei 5 % transient transfizierter Zellen nicht erkennbar sind.

Pai S. R. et al. beschrieben in einer HeLa-Zelllinie eine positive Korrelation von überexprimiertem c-Fos mit einer hohen Rb-Expression, wobei die hohe Rb-Konzentration als Antwortreaktion des Tumorsuppressorgens auf erhöhte Aktivität von Transkriptionsfaktoren gedeutet wurde.²⁵⁹ Eine Untersuchung zur Entstehung von Arteriosklerose als proliferativen Prozess in glatten Muskelzellen zeigte nach cholesterinreicher Diät eine drei- bis vierfach erhöhte mRNA-Menge für c-Fos und c-Jun in den arteriosklerotischen Plaques, während der mRNA-Level von Rb im Vergleich mit den normalen Arterien erniedrigt war.²⁶⁰ *Yen A. et al.* vermuteten anhand des Verhältnisses von Rb- zu c-Fos-Protein während des Zellzyklus in Leukämiezellen einen negativ regulatorischen Effekt von Rb auf c-Fos.²⁶¹ Diese negative Regulation kann über eine cis-Sequenz im c-Fos-Promotor erfolgen, welche auch als RCE (engl. *retinoblastoma control element*) bezeichnet wird.²⁶²

Die Cyclin-Expression nach Transfektion mit H1, H11, FosB₂ und c-Fos zeigte sich in den MDA-MB-231-Zellen nicht verändert. Insbesondere konnte eine positive Korrelation von c-Fos und Cyclin E (wie für die Mammatumoren beschrieben²⁶³) in den Zelllinien nicht gefunden werden. Nach Transfektion und anschließender Stimulation mit TPA wird für Cyclin D und Cyclin E eine verminderte Expression unter TPA-Stimulation (sowohl für den H1- als auch den Leervektor) angenommen. Dieser Effekt nach TPA-Gabe hatte sich in den untransfizierten MDA-MB-/MFC7-Zellen nicht gezeigt (s. Stimulation mit TPA). Eine verminderte Expression von Cyclinen nach TPA-Behandlung ist aber für mehrere Tumorzelllinien beschrieben worden.²⁶⁴ Für Cyclin D zeigte sich zusätzlich eine verminderte Expression nach Stimulation mit TPA und Transfektion mit H1 im Vergleich zum Leervektor, was in diesem Fall auf eine negative Regulation von Cyclin D durch forcierte Überexpression von H1 mit anschließender TPA-Behandlung hindeutet. Dies ist eine interessante Beobachtung vor dem Hintergrund, dass FosB im Mammakarzinomgewebe mit einem rezeptorpositiven, gut differenzierten Phänotyp

²⁵⁹ Vgl. *Pai S.R. et al.*, Interaction of the Rb tumor suppressor protein with the c-fos promoter in c-fos transfected cells overexpressing c-fos and Rb. *Anticancer Res.* 1997 Sep-Oct;17(5A):3265-72.

²⁶⁰ Vgl. *Wang H. et al.*, Transcriptional expression of oncogenes and Rb antioncogene in experimental atherosclerotic lesions *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 1996 Jun;27(2):117-21. Chinese.

²⁶¹ Vgl. *Yen A. et al.*, The ratio of retinoblastoma (RB) to fos and RB to myc expression during the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995 Dec;210(3):205-12.

²⁶² Vgl. *Robbins P.D. et al.*, Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. *Nature.* 1990 Aug 16;346(6285):668-71. Erratum in: *Nature* 1991 May 30;351(6325):419.

²⁶³ Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, 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 AP-1 family members. *Int J Cancer.* 2000 Aug 15;87(4):468-72.

²⁶⁴ Vgl. *Cerda S.R. et al.*, PKC inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. *Oncogene.* 2006 Jan 23.

assoziiert war.²⁶⁵ Hier könnte also eine Interaktion von FosB mit dem Zellzyklus vorliegen, welche über eine verminderte Expression von Cyclin D zu einem verspäteten Eintritt der Zellen in die S-Phase führen kann. Frühere Untersuchungen an den ER-positiven MCF7-Zellen hatten jedenfalls gezeigt, dass die Injektion von Anti-Cyclin-D-Antikörpern oder die Gabe von Anti-Sense-Oligonukleotiden einen verspäteten Übergang in die S-Phase zur Folge hatten.²⁶⁶ Auf der anderen Seite trägt Cyclin D zu einer epithelialen Zellproliferation in Brustzellen bei, sowohl über eine ER-vermittelte Transkription als auch ER-unabhängig über erhöhte CDK-Aktivität.²⁶⁷

P21 und p53 zeigten keine Expressionsveränderung nach Transfektion mit H1, H11, FosB₂ und c-Fos in den MDA-MB-231-Zellen. Nach Transfektion mit H1 und anschließender Stimulation mit TPA war die Expression von p21 erhöht, jedoch unabhängig vom H1-Expressionsvektor. Dieses Ergebnis hatte sich bereits nach Stimulation mit TPA in den untransfizierten Zelllinien gezeigt.

FosB und Hormonrezeptoren

Die forcierte Überexpression von H1, FosB₂ und c-Fos in den hormonrezeptornegativen MDA-MB-231-Zellen führte zu keiner Expression von ER- oder PR-Proteinen. Die Proteinexpression von ER und PR konnte somit durch Transfektion mit den Expressionsvektoren H1, FosB₂ und c-Fos nicht induziert werden. Auch die Stimulation mit TPA nach Transfektion erbrachte keine detektierbare Proteinbande für ER und PR.

Während FosB in den Mammakarzinomen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus und einem gut-differenzierten Phänotyp assoziiert war²⁶⁸ und eine positive Korrelation zu beiden PR-Isoformen zeigte,²⁶⁹ fand sich auf Proteinebene in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 keine Auswirkung einer Überexpression von FosB auf die ER- oder PR-Expression.

FosB und PAI-1/uPAR

Nach Transfektion mit H1, FosB₂ und H11 in den MDA-MB-231-Zellen war keine wesentliche Expressionsänderung für PAI-1 und uPAR erkennbar. Nach Transfektion mit H1 und anschließender TPA-Stimulation zeigte sich eine Expressionsverstärkung von uPAR, diese war jedoch unabhängig vom Expressionsvektor H1 auch bei dem Leervektor 3.1+ zu beobachten und bestätigt die Beobachtung, dass sich die Proteinexpressi-

²⁶⁵ Vgl. Milde-Langosch K. et al., 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*. 1999 Oct 22;84(5):533-8.

²⁶⁶ Vgl. Bartkova J. et al., Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int. J. Can.* 1994; 57:353-361.

²⁶⁷ Vgl. Lukas J. et al., Cyclin D1 is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* 1994; 9:707-718.

²⁶⁸ Vgl. Milde-Langosch K. et al., 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*. 1999 Oct 22;84(5):533-8.

²⁶⁹ Vgl. Bamberger A.M. et al., PR isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm Res*. 2000;54(1):32-7.

on von uPAR in der MDA-MB-231-Zelllinie durch TPA erhöhen lässt. Eine Überexpression von FosB (H1), seinem alternativen Spleissprodukt FosB₂ und von der Mutante H11 hatte somit in den MDA-MB-231-Zellen keine Auswirkungen auf die Proteinexpression von PAI-1 und uPAR.

Verschiedene Untersuchungen haben einen Zusammenhang von AP-1-Aktivität und PAI-1-Expression beschrieben: Die Regulation von PAI-1 kann über mehrere AP-1-Bindungsstellen im PAI-1-Promotor erfolgen, an welche AP-1-Faktoren oder AP-1-ähnliche Proteine binden.²⁷⁰ Für die anderen Fos-Proteine (c-Fos, Fra-1, Fra-2) hatte eine Überexpression durch transiente Transfektion in Mammakarzinom-Zelllinien eine Hochregulierung von PAI-1 gezeigt.²⁷¹ In menschlichen Astrozyten erfolgte eine IL-1 vermittelte Regulation von PAI-1 über eine erhöhte Expression von c-Fos und eine vermehrte Bindung c-Fos/c-Jun-Heterodimeren an eine proximale Sequenz im PAI-Reporter-Konstrukt.²⁷² Ebenso konnte PAI-1-mRNA-Expression in menschlichen Mesangiumzellen über einen AP-1-abhängigen Signalweg durch Thrombin stimuliert werden.²⁷³ Die o.g. Zusammenhänge von PAI-1-Expression und AP-1-Faktoren waren v.a. für c-Fos und c-Jun beschrieben worden. Eine Beteiligung von FosB konnte bisher nicht gezeigt werden.

Der uPAR-Promotor besitzt ebenfalls eine AP-1-Bindungsstelle. Mutationen in dieser Region führten zu einer reduzierten Promotoraktivität. In Kolonkarzinomzellen wird die Wirkung von Phorbolestern über dieses AP-1-Motiv vermittelt. Die Kotransfektion mit c-Fos und c-Jun resultierte in einer fünffach erhöhten uPAR-Promotor-Aktivität, wobei c-Fos und c-Jun alleine nur eine geringfügig gesteigerte Promotoraktivität erreichten.²⁷⁴ Obwohl über diesen Weg eine Regulation von uPAR durch AP-1-Faktoren prinzipiell möglich ist, liessen Untersuchungen von AP-1-Faktoren an Mammakarzinomen und in Prostatatumoren keine Korrelation zur Expression von uPAR erkennen.^{275,276}

²⁷⁰ Vgl. Keeton M.R. *et al.*, Identification of regulatory sequences in the type 1 PAI gene responsive to transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 266: 23048-23052, 1991.

²⁷¹ Vgl. Milde-Langosch K. *et al.*, The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Jul;86(2):139-52.

²⁷² Vgl. Kasza A. *et al.*, Mechanism of plasminogen activator inhibitor-1 regulation by oncostatin M and interleukin-1 in human astrocytes. *J Neurochem.* 2002 Nov;83(3):696-703.

²⁷³ Vgl. Chen X. *et al.*, AP-1 mediated signal transduction in thrombin-induced regulation of PAL-1 expression in human mesangial cells. *Chin Med J (Engl).* 2000 Jun;113(6):514-9. Chinese.

²⁷⁴ Vgl. Dang J. *et al.*, A region between -141 and -61 bp containing a proximal AP-1 is essential for constitutive expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Eur J Biochem.* 1999 Aug;264(1):92-9.

²⁷⁵ Vgl. Milde-Langosch K. *et al.*, The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Jul;86(2):139-52.

²⁷⁶ Vgl. Gavrilov D. *et al.*, Expression of urokinase plasminogen activator and receptor in conjunction with the ets family and AP-1 complex transcription factors in high grade prostate cancers. *Eur J Cancer.* 2001 May;37(8):1033-40.

FosB und MMP-1/-9

Die Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-9 zeigte sich nach Transfektion mit H1, FosB₂ und c-Fos in den MDA-MB-Zellen nicht verändert. Die Zellkultur hat jedoch den Nachteil, dass sie keine Aussage über das Verhalten von tumorangrenzendem Stromagewebe zulässt. *Haupt L.M. et al.*²⁷⁷ konnten z.B. an MDA-MB-231-Zellen nach Stimulation mit Concanavalin A keine Expressionsveränderung von MMP-1 nachweisen, nach Einbettung in Maus-Xenograft-Gewebe beeinflusste die Zelllinie aber die Genexpression von MMPs in angrenzenden Stromazellen.

Für andere AP-1-Faktoren konnte ein Zusammenhang mit der Expression von MMPs nachgewiesen werden: Mehrere Versuche mit Kotransfektionen hatten bei Überexpression von Fos- und Jun-Proteinen eine gesteigerte MMP-1-Promotoraktivität zur Folge. Die Zugabe von c-Jun-Anti-Sense-mRNA konnte diesen Effekt antagonisieren. Zudem ging einer Induktion von MMP-1-mRNA durch verschiedene Stimuli eine Induktion von c-Jun- und JunB-mRNA voraus.^{278,279} Im Mammakarzinomgewebe korrelierte eine hohe FosB-Expression positiv mit der Expression von MMP-1.²⁸⁰ In MDA-MB-231-Zellen führte eine Überexpression von c-Jun und c-Fos zu einer verstärkten Expression von MMP-2, -3 und -9, zu einer Herabregulierung von TIMP-1 und zu einer vermehrten Invasivität; dieser Effekt war abhängig von der Zelldichte.²⁸¹ Untersuchungen an c-Fos-Knock-Out-Mäusen ergaben, dass die Anwesenheit von c-Fos erforderlich ist für die Progression von Hautpapillomen und für die Induktion von MMP-3 und MMP-13-Genexpression.²⁸² Die Tatsache, dass weder MMP-9- noch MMP-2- oder MMP-10-Expression durch eine Überexpression von c-Fos beeinflusst waren, lässt die Annahme zu, dass c-Fos zellspezifisch auf unterschiedliche Weise die Expression bestimmter MMPs reguliert²⁸³ und dass allein das Vorhandensein des AP-1-Elements im Promotor von MMPs keine Aussage über die Regulierung durch AP-1-Faktoren *in vivo* zulässt.

Nach Transfektion mit H1 und anschließender Stimulation mit TPA war die Expression von MMP-9 unabhängig von dem H1-Vektor in den stimulierten Zellextrakten verstärkt. Diese Expressionserhöhung von MMP-9 nach TPA-Inkubation war auch von anderen

²⁷⁷ Vgl. *Haupt L.M. et al.*, In vitro and in vivo MMP gene expression localisation by In Situ-RT-PCR in cell culture and paraffin embedded human breast cancer cell line xenografts. *BMC Cancer*. 2006 Jan 24;6(1):18 [Epub ahead of print].

²⁷⁸ Vgl. *Vincenti M. P. et al.*, (1996) Regulating expression of the gene for MMP-1: mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.* 6,391-411.

²⁷⁹ Vgl. *Benbow U. et al.*, (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the Fuss about?. *Matrix Biol* 15,519-526

²⁸⁰ Vgl. *Milde-Langosch K. et al.*, The role of AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Can. Res.* 00 (2004): 1-14.

²⁸¹ Vgl. *Bachmeier B.E. et al.*, Cell density-dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in differently tumorigenic breast cancer cell lines. *Exp Cell Res.* 2005 Apr 15;305(1):83-98.

²⁸² Vgl. *Saez E. et al.*, (1995) c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 82,721-732.

²⁸³ Vgl. *Gack S. et al.*, (1994) Phenotypic alterations in fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type I expression. Regulation of mouse MMPs by carcinogens, tumor promoters, cAMP, and Fos oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 269,10363-10369.

Arbeitsgruppen in Mammakarzinom-Zelllinien gesehen worden und wird wohl u.a. über den ERK1/2-Signalweg vermittelt.²⁸⁴

Transiente Transfektion mit ER und Stimulation mit 17- β -Östradiol

Um die Auswirkungen einer forcierten Überexpression von ER auf die Expression von AP-1-Faktoren zu untersuchen, wurde die ER-negative MDA-MB-231-Zelllinie mit einem Expressionsvektor für den menschlichen ER transient transfiziert und die Proteinexpression der AP-1-Faktoren an den gewonnenen Proteinextrakten untersucht. In einem zweiten Schritt wurde die Zelllinie nach Transfektion mit ER für 24 Std. mit 17- β -Östradiol (E_2) in einer Konzentration von 10^{-9} mol/l inkubiert.

ER und AP-1-Faktoren

Die Fos-Proteine (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) und JunD zeigten nach Transfektion mit ER und nach zusätzlicher Stimulation mit E_2 keine Veränderung in ihrer Expression, wobei FosB in den MDA-MB-231-Zellen schwach bis kaum exprimiert war. Die Expression von c-Jun und JunB war nach Transfektion mit ER erhöht. Nach Transfektion und zusätzlicher Stimulation mit E_2 konnte die Expression noch verstärkt werden.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Fos-Proteine und JunD in den Mammakarzinom-Zellen MDA-MB-231 keiner unmittelbaren Regulation durch ER unterliegen; c-Jun und JunB zeigen jedoch ein abweichendes Verhalten. Interessant ist, dass JunB in den MDA-MB-231-Zellen sowohl nach Transfektion mit ER als auch nach Stimulation mit TPA eine Expressionszunahme zeigt. Diese Beobachtung könnte Ausdruck einer zellspezifischen Reaktion der MDA-MB-231-Zelllinie bezüglich der Komposition von AP-1-Faktoren in Richtung einer JunB-Mehrexpression sein.

Es ist allgemein anerkannt, dass Östrogene die Expression von AP-1-Faktoren über EREs in den Promotoren von AP-1 regulieren können.²⁸⁵ Darüber hinaus kann über einen nichtgenomischen Signalweg zytoplasmatisch lokalisierter ER nach Stimulation mit E_2 über nachgeschaltete MAP-Kinasen AP-1-Faktoren phosphorylieren und damit aktivieren: Für c-Jun konnte das über den ERK-Weg erreicht werden.²⁸⁶ So kann die Mehrexpression von c-Jun in den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen direkt über diesen Signalweg oder indirekt über eine positive Regulation im c-Jun-Promotor durch andere AP-1-Faktoren erreicht worden sein. Dass nicht alle AP-1-Faktoren gleichsinnig

²⁸⁴ Vgl. *Bartsch J.E. et al.*, MMPs expression in breast cancer. *J Surg Res.* 2003 Apr;110(2):383-92.

²⁸⁵ Vgl. *Weisz A et al.*, 1993 Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Critical Reviews in Oncogenesis* 4: 361–388. *Rauscher F.J. et al.*, 1988 Common DNA binding site for fos protein complexes and AP-1. *Cell* 52: 471–480. *Schuchard M. et al.*, 1993 Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocrine Reviews* 14: 659–669. *Okada A. et al.*, Epithelial c-jun and c-fos are temporally and spatially regulated by estradiol during neonatal rat oviduct differentiation. *J Endocrinol.* 2004 Aug;182(2):219-27.

²⁸⁶ Vgl. *Morton S. et al.*, 2003 A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J* 22:3876–3886.

reguliert werden, zeigte sich in Harnleiterepithelzellen von Mäusen, wo es nach Stimulation mit E₂ zu einer vermehrten c-Fos- und einer verminderten c-Jun-Expression gekommen war.²⁸⁷ Dazu kann E₂ AP-1-Aktivität auch unabhängig von einer gesteigerten c-Fos- und c-Jun-Expression induzieren.²⁸⁸

ER α konnte c-Fos-Expression auf einem E₂-vermittelten Weg induzieren.²⁸⁹ Die Region für die E₂-vermittelte Induktion liegt in einer 240 bp umfassenden Stelle im menschlichen c-Fos-Promotor (-1300 bis -1060) und enthält eine unvollständige palindromische ERE-Sequenz, so dass ER α dort binden, aber keine Transkription aktivieren kann. Dies geschieht vielmehr über die Bildung eines ER α /Sp1-Komplexes, welcher an eine GC-reiche Stelle abwärts des ERE bindet.²⁹⁰

Eine verminderte Aussagekraft besteht für die dargelegten Ergebnisse in der möglicherweise gegensinnigen Wirkung von ER α und ER β auf die Aktivität von AP-1-Faktoren. Zudem trifft die Proteinexpression im Westernblot keine Aussage über Expression von zytoplasmatisch oder nukleär lokalisiertem Rezeptor. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Regulation von Zielgenen, welche in ihrem Promotor AP-1-Bindungsstellen aufweisen, abhängig ist vom Zelltyp und vom Rezeptortyp des ER (ER α oder ER β)²⁹¹. Und ein zytoplasmatisch lokalisierter ER kann im Komplex mit E₂ über nicht-genomische Signalwege AP-1-Aktivität steigern, wohingegen ein nukleär präsentierter ER diese Wirkung supprimiert.²⁹² Interessant wären daher weiterführende Versuche mit ER α und ER β stabil transfizierten MDA-MD-231-Zellen, um die Auswirkungen nach Stimulation mit Östrogen oder selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren auf AP-1-Expression darzustellen. Für ER β konnte in der MDA-MB-231-Zelllinie gezeigt werden, dass Antiöstrogene zu keiner gesteigerten AP-1-Aktivität führten.²⁹³

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich bei der Untersuchung von FosB an den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MCF7 keine eindeutige Expressionsveränderungen von möglichen Zielgenen wie Zellzyklusregulatoren und Mitgliedern der Proteinasesysteme MMP und uPA zeigte. Die transiente Transfektion von FosB

²⁸⁷ Vgl. Yamashita S. *et al.*, 2001 Effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on c-fos and c-jun protooncogene expression in the mouse uterus. *Histology and Histopathology* 16: 131–140. Yamashita S. *et al.*, 2003 Expression of c-fos and c-jun protooncogenes in the uteri of immature mice neonatally exposed to diethylstilbestrol. *Histology and Histopathology* 18: 83–92.

²⁸⁸ Vgl. Hyder S. M. *et al.*, (1995) The Protooncogene c- jun contains an unusual Estrogen-inducible enhancer within the coding sequence *J. Biol. Chem.* 270, 8506-8513.

²⁸⁹ Vgl. Weisz A. *et al.*, 1990 Identification of an ERE upstream of the human c-fos gene that binds the ER and AP-1. *Nucleic Acids Res* 18:5097-106. Hyder S.M. *et al.*, 1991 Presence of an ERE in the mouse c-fos oncogene. *Steroids* 56:498-504.

²⁹⁰ Vgl. Duan R. *et al.*, 1998 Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of ER/Sp1 complex. formation. *Endocrinology* 139:1981-90.

²⁹¹ Vgl. Paech K. *et al.*, Differential ligand activation of ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 1997, 277:1508-10. Webb P. *et al.*, The ER enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 1999, 13:1672-85. Jakacka M. *et al.*, ER binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *J Biol Chem* 2001, 276:13615-21.

²⁹² Vgl. Bjornstom L. *et al.*, ER-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Recept.* 2004 Jun 14;2(1):3.

²⁹³ Vgl. Tonetti D.A. *et al.*, Stable transfection of an ER beta cDNA isoform into MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Oct;87(1):47-55.

führte zu keiner Induktion der Hormonrezeptoren ER und PR. An der MDA-MB-231-Zelllinie ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede nach transienter Transfektion mit den Expressionsplamiden für die FosB-Mutante (H11), die alternative Spleissvariante FosB₂ und für c-Fos. Dazu ist anzumerken, dass die Untersuchungen an der Zellkultur lediglich den *in-vivo*-Bedingungen entsprechen und dass somit keine Aussage über die *in-vitro*-Verhältnisse getroffen werden kann. Die Zellkultur ist ein artifizielles System und somit anfällig für Milieuveränderungen und Kontaminationen. Die Nachteile der transiente Transfektion sind bereits erwähnt worden, so dass sicherlich eine Wiederholung der Versuchsreihe und ein Vergleich der Ergebnisse mit stabil transfizierten Klonen aufschlussreich wäre.

Auf der anderen Seite ist zu erwägen, ob die forcierte Überexpression von Proteinen wirklich zu einem besseren Verständnis von *in-vitro*-Regulationen durch Proteine führt oder ob nicht vielmehr unbekannte, hemmende oder aktivierende Mechanismen eine unphysiologische Abbildung der Vorgänge in einer Zelle zur Folge haben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorgelegten Arbeit wurde die Expression der nukleären Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, JunD) an zwei Mammakarzinom-Zelllinien untersucht, von denen eine Zelllinie einen positiven Rezeptorstatus für ER und PR aufwies (MCF-7) und die andere einen negativen Rezeptorstatus (MDA-MB-231). Nach transienter Transfektion mit den jeweiligen Plasmiden der für die AP-1-Proteine kodierenden DNA wurde an den Zelllinien die Expression von Zellzyklusproteinen, Proteinen der Proteinasesystem MMP und uPAR sowie von den Hormonrezeptoren ER und PR untersucht. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die mit FosB transfizierte und untransfizierte Zelllinie MDA-MB-231 jeweils mit dem Tumorpromotor TPA inkubiert und auf Expressionsänderungen möglicher Zielproteine des Zellzyklus untersucht. Um die Auswirkungen eines exprimierten Östrogen-Rezeptors auf die Proteinexpression von AP-1-Faktoren zu untersuchen, wurde die ER-negative Zelllinie MDA-MB-231 mit dem Expressionsvektor für ER transient transfiziert und anschließend mit 17- β -Östradiol inkubiert; die Proteinextrakte wurden dann im Westernblot auf die Expression der einzelnen AP-1-Proteine überprüft. Besonderer Augenmerk wurde bei der Arbeit auf die Expression von FosB gelegt, nachdem für FosB in einer vorausgegangenen Arbeit an Geweben von 53 Mammakarzinomen eine positive Korrelation zu einem hormonrezeptorpositiven, gut-differenzierten Phänotyp gezeigt werden konnte. Dieser Zusammenhang liess sich so im Zellkultursystem auf Proteinebene nicht nachweisen: die forcierte Überexpression von FosB bzw. ER in der hormonrezeptornegative Zelllinie MDA-MB-231 ergab im Westernblotnachweis keine Expressionsinduktion von ER bzw. Mehrexpression von FosB. Die transiente Transfektion mit den FosB-Plasmiden H1, FosB2 und der Mutante H11 sowie mit c-Fos führte in den MDA-MB-231-Zellen zu keiner sicher reproduzierbaren Expressionsveränderung der übrigen AP-1-Faktoren sowie der untersuchten Zielproteine des Zellzyklus und der Proteinasesysteme. Insbesondere zeigte sich keine inverse Korrelation von FosB mit Fra-1, wie sie bei der Untersuchung an dem Mammakarzinomgewebe aufgefallen war. Die Stimulation mit dem Tumorpromotor TPA mündete für c-Fos, c-Jun, JunB und p21 in beiden Zelllinien, für Fra-1 in den MCF-7-Zellen und für Rb, PAI-1 und uPAR in den MDA-MB-231-Zellen in einer verstärkten Proteinexpression. Unter TPA-Zugabe war die Expression von Cyclin E und deutlicher noch von Cyclin D in den MDA-MB-231-Zellen vermindert. Die Transfektion von ER mit nachfolgender Stimulation mit E_2 an den MDA-MB-231-Zellen hatte bei den Fos-Proteinen und bei JunD keine Expressionsveränderung zur Folge, so dass diese wohl keiner unmittelbaren Regulation durch ER unterliegen. Die Expression von c-Jun und JunB hingegen war erhöht und konnte durch Zugabe von E_2 noch verstärkt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aboud M. et al.**, PA activates p21WAF-1 promoter in human T-cells through its second most up-stream Sp1 site. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 16;304(4):696-700.
- Admakiewicz J. et al.**, Mapping of functional domains in Fos and Jun proteins using epitopespecific antibodies. *Oncogene.* 1990 Apr;5(4):525-33.
- Adiseshaiah P. et al.**, Mitogen regulated induction of FRA-1 proto-oncogene is controlled by the transcription factors binding to both serum and TREs. *Oncogene.* 2005 Jun 16;24(26):4193-205.
- Aguirre-Ghiso J.A. et al.**, Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur J Biochem.* 1999 Jul;263(2):295-304.
- Albas J. et al.**, MAPK in TPA-mediated cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Oncogene.* 1998 Jan 8;16 (1):131-9.
- Amadori D.**, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 15: 110 (104a), 1996.
- Angel P. et al.**, Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell.* 1987 Jun 19;49(6):729-39.
- Angel P. et al.**, The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell.* 1988 Dec 2;55(5):875-85.
- Angel P. et al.**, The role of AP-1 in cell-proliferation and transformation. *Bio. Acta* 1071 (1991) 129-157.
- Angel P. et al.**, The fos and jun families of transcription factors. CRC press 1994; pp. 1-310.
- Bachmeier B.E. et al.**, MMPs in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Res.* 2001 Dec; 21 (6A) 3821-8.
- Bachmeier B.E. et al.**, Cell density-dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in differently tumorigenic breast cancer cell lines. *Exp Cell Res.* 2005 Apr 15;305(1):83-98.
- Bakiri L. et al.**, Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.* 2000 May 2;19(9):2056-68.
- Balbin M. et al.**, Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *AP-MIS.* 1999 Jan;107(1):45-53. Review.
- Balsalobre A., Jolicoeur P.**, Fos proteins can act as negative regulators of cell growth independently of the fos transforming pathway. *Oncogene.* 1995 Aug 3;11(3):455-65. 1995.
- Bamberger A.M. et al.**, PR isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm Res.* 2000;54(1):32-7.
- Barrett J.M. et al.**, Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Apr;72(3):227-32.
- Bartkova J. et al.**, Cyclin D1 protein expression in human breast cancer. *Int. J. Can.* 1994; 57:353-361.
- Bartsch J.E. et al.**, MMPs expression in breast cancer. *J Surg Res.* 2003 Apr; 110(2):383-92.
- Baset-Séguin et al.**, 1994.
- Belguise K. et al.**, FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene.* 2005 Feb 17;24(8):1434-44.
- Benbow U. et al.**, (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the Fuss about?. *Matrix Biol* 15,519-526
- Bengal E. et al.**, Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell.* 1992 Feb 7;68(3):507-19.
- Bernards R.**, CDK-independent activities of D type cyclins. *Biochim Acta*, 1999, 1424: 17-22.
- Böcker**, Pathologie, Urban & Schwarzenberg 1997, S. 865 ff.

- Bjornstom L. et al.**, ER-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. Nucl Recept. 2004 Jun 14;2(1):3.
- Blobe G.C. et al.**, Regulation of PKC and role in cancer biology. Cancer Metastasis Rev. 1994 Dec;13(3-4):411-31.
- Boessen J.J. et al.**, Concomitant induction of signal transduction pathways and genetic instability by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Carcinogenesis. 1991 Mar;12(3):487-92.
- Bolon I. et al.**, (1996) Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets-1 during progression of precancerous bronchial lesions. Lab. Invest. 75,1-13.
- Bortner D.M. et al.**, Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. (1997) Mol. Cell Biol. 17: 453-459.
- Boudreau M.E. et al.**, Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. Science 267 (1995) 891.
- Boyle W.J. et al.**, Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. Cell. 1991 Feb 8;64(3):573-84.
- Brenner D.A. et al.**, Prolonged activation of jun and collagenase genes by TNF α . Nature. 1989 Feb 16;337(6208):661-3.
- Brown P.H. et al.**, 1996 Dominant-negative mutants of cJun inhibit AP-1 activity through multiple mechanisms and with different potencies. Cell Growth Differ 7:1013–1021.
- Brown J. et al.**, Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. Mol. Cell. Biol. 1998, 18: 5609-5619.
- Bui T.D. et al.**, Expression of Wnt5a is downregulated by extracellular matrix and mutated c-Ha-ras in the mammary epithelial cell line MCF-10A. Bio. Res. Commun. 1997; 239:911-917.
- Carlomagno C. et al.**, C-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early stage breast cancer without axillary lymph node metastasis. J. Cli. Oncol. 1996; 14: 2702-2708.
- Carter C.L. et al.**, Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer. 1989 Jan 1;63(1):181-7. 989
- Cerda S.R. et al.**, PKC inhibits Caco-2 cell proliferation by selective changes in cell cycle and cell death regulators. Oncogene. 2006 Jan 23.
- Chai J. et al.**, Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. J Physiol Pharmacol. 2002 Jun;53(2):147-57.
- Chen T.K. et al.**, Activation and inhibition AP-1 in human breast cancer cells. Mol Carcinog. 1996 Mar; 15(3):215-26.
- Chen X. et al.**, AP-1 mediated signal transduction in thrombin-induced regulation of PAL-1 expression in human mesangial cells. Chin Med J (Engl). 2000 Jun;113(6):514-9. Chinese.
- Chinenov Y. et al.**, (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. Oncogene. 20:2438-52.
- Chiu R. et al.**, Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. Cell. 1989 Dec 22;59(6):979-86.
- Cho J.W. et al.**, p21(WAF1) is associated with CDK2 and CDK4 protein during HL-60 cell differentiation by TPA treatment. Cell Prolif. 2001 Oct;34(5):267-74.
- Clark G.M. et al.**, Steroid receptors and other prognostic factors in breast cancer; Semin. Oncol. 15 (1988) 15: 20
- Clarke G.M. et al.**, Breast cancer incidence and mortality trends in an affluent population. Breast Cancer Res. 4: R13, 2002.
- Cooper G.M.**, The Cell. A molecular approach. ASM Press, Washington, 1997.

- Cottam D.W. et al.**, Int. J. Oncol., 1993; 2:861-872.
- Cowley S.M., Hoare S**, ER alpha and beta form heterodimers on DNA. J. Biolog. Chemie, 1997; 272:19858-19862.
- Dang J. et al.**, A region between -141 and -61 bp containing a proximal AP-1 is essential for constitutive expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. Eur J Biochem. 1999 Aug;264(1):92-9.
- Darnell et al.**, 1994.
- Davidoff A.M.**, J. Surg. Oncol. 48: 260-267, 1991.
- Davies B. et al.**, A synthetic MMP-Inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice. Can. Res. 53 (1993) 2087.
- Dowdy S.F. et al.**, Physical interaction of the RB-protein with human cyclins. Cell 1994, 73:499.
- Duan R. et al.**, 1998 Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of ER/Sp1 complex. formation. Endocrinology 139:1981-90.
- Dubik D. et al.**, Oncogene 1992.
- Duffy M.J.**, The uPA activator system: Role in malignancy, Current-Pharma-ceutical-Design; 10(1): 39-49, 2004.
- Durko M.J. et al.**, The metalloproteinases and their inhibitors. Springer, 1996.
- Dyson N. et al.**, The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. Science 1989, 243:934-937.
- Elledge S.J. et al.**, Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science, 1996: 274:1664.
- Evans T. et al.**, Cyclin: a protein that is specified by maternal mRNA in sea urchin eggs. Cell 1983 33:389-396.
- Ferno M. et al.**, ER and PR analyses in more than 4000 human breast cancer samples, Acta Oncology 1990; 29: 129-135.
- Franks L.M. et al.**, Introduction to cellular and molec. biolog. of canc.; Oxf. Univers. Press, 1997.
- Freudenheim et al.**, Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits and related nutrients. J. Natl. Cancer Inst. 88: 340-348, 1996.
- Furmanski P. et al.**, The prognostic value of estrogen receptor determinations in patients with primary breast cancer, Cancer 1980; 46: 2794-2796.
- Gack S. et al.**, (1994) Phenotypic alterations in fos-transgenic mice correlate with changes in Fos/Jun-dependent collagenase type I expression. Regulation of mouse MMPs by carcinogens, tumor promoters, cAMP, and Fos oncoprotein. J. Biol. Chem. 269,10363-10369.
- Gavrilov D. et al.**, Expression of uPA and receptor in conjunction with the ets family and AP-1 complex transcription factors in high grade prostate cancers. Eur J Cancer. 2001 May;37(8):1033-40.
- Gaub M.P. et al.**, Activation of the ovalbumin gene by the ER involves the Fos-Jun complex. Cell 1990; 63:1267-1276.
- Goldgaber et al.**, Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Oct;86(19):7606-10.
- Gottlicher M. et al.**, Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. J Mol Med. 1998 Jun;76(7):480-9.
- Grana X. et al.**, Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, CDKs and CKIs; Oncogene 1995; 11:211-219.
- Green S. et al.**, The N-terminal DBD 'zinc finger' of the ER determines target gene specificity. EMBO J. 1988; 7:3037-3044.
- Grigoriadis et al.**, 1994.

- Gruda M.C. et al.**, Expression of FosB during mouse development: normal development of FosB knockout mice. *Oncogene*. 1996 May 16;12(10):2177-85.
- Gusterson B.A.**, *Journal Clinical Oncology* 10: 1049-1056, 1992.
- Halazonetis T.D. et al.**, c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*. 1988 Dec 2;55(5):917-24.
- Harbeck N. et al.**, Clinical utility of uPA and PAI-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts. *Clin Breast Cancer*. 2002 Aug;3(3):196-200.
- Hartmann L.C. et al.**, Prognostic value of c-erbB-2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. *Cancer* 1994; 74:2956-2963.
- Haupt L.M. et al.**, In vitro and in vivo MMP gene expression localisation by In Situ-RT-PCR in cell culture and paraffin embedded human breast cancer cell line xenografts. *BMC Cancer*. 2006 Jan 24;6(1):18.
- Hedley D.W.**, *Cytometry* 14: 482-485, 1993.
- Heiss M.M. et al.**, uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat. Med.* (1995) 1035.
- Heppner K. J. et al.**, (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am. J. Pathol.* 149,273-282.
- Horwitz K.B. et al.**, Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 1978; 253:2223-2228.
- Hyder S.M. et al.**, 1991 Presence of an ERE in the mouse c-fos oncogene. *Steroids* 56:498-504.
- Hyder S. M. et al.**, (1995) The Protooncogene c- jun contains an unusual Estrogen-inducible enhancer within the coding sequence *J. Biol. Chem.* 270, 8506-8513.
- Isaacs C. et al.**, New progn. factors for breast cancer recurrence. *Semin. Oncol.* 2001; 28:53-67.
- Ivrtton S. et al.**, 2003 A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J* 22:3876–3886.
- Iwata H. et al.**, Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 1996 Jun;87(6):602-11.
- Jänicke F. et al.**, uPA and its inhibitor PAI-1 are strong independent prognostic factors in node-negative breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 24, 1993.
- Jakacka M. et al.**, ER binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *J Biol Chem* 2001, 276:13615-21.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ;** American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004 Jan-Feb;54(1):8-29. Review.
- Johansson N. et al.**, (1997) Expression of MMP-13 in SCC of the head and neck. *Am. J. Pathol.* 151,499-508.
- Johnson M.D. et al.**, Regulation of motility and protease expression in PKC-mediated induction of MCF-7 breast cancer cell invasiveness. *Exp Cell Res.* 1999 Feb 25;247(1):105-13.
- Johnson P.F.**, Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1989: 58.
- Johnston S.D. et al.**, *Mol. Endocrinology* 1997.
- Kang J.H. et al.**, Weakening of the repressive YY-1 site on the thrombospondin-1 promoter via c-Jun/YY-1 interaction. *Exp Mol Med.* 2004 Aug 31;36(4):300-10.
- Kariko K. et al.**, Overexpression of uPAR increases invasion in human osteosarcoma cell line. *Cancer Res.* 53 (1993) 3109.
- Kastner P. et al.**, Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990; 9:1603-1614

- Kasza A. et al.**, Mechanism of plasminogen activator inhibitor-1 regulation by oncostatin M and interleukin-1 in human astrocytes. *J Neurochem.* 2002 Nov;83(3):696-703.
- Keeton M.R. et al.**, Identification of regulatory sequences in the type 1 PAI gene responsive to transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 266: 23048-23052, 1991.
- Keyomarsi K. et al.**, Cyclin E and survival in patients with breast cancer; *N. Eng. J. Med.* 347: 1566-1575.
- King C.R. et al.**, Amplification of a novel v-erbB-2-related gene in human mammary carcinomas. *Scienc* (1985) 229: 974-976.
- Khokha R. et al.**, Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of melanoma cells in vivo by the overexpression of TIMP-1. *J. Can. Inst.* 86 (1994) 299.
- Knippers R.**, *Molekulare Genetik*, Thieme 2001, S. 369.
- Kovary K. et al.**, Jun and fos are both required for cell cycle progression in fibroblast. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 4466-4472.
- Kovari K. et al.**, Existence of Fos/Jun complexes during the G0-to-G1 transition and during growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins. *Mol Cell Biol.* 1992 Nov;12(11):5015-23.
- Kraus W.L. et al.**, Identification of multiple EREs in the rat PR gene; *Molecul. Endocrinology* 1994; 8:952-969.
- Krust A. et al.**, The chicken ER sequence: homology with v-erbA and the human ER und GR. *EMBO J.* 1986,5:891-897
- Kumar V. et al.**, Localisation of the E2-binding and putative DNA-bindg. domains of the hum. ER. *EMBO J.* 1986,5:2231-36
- Kushner P.J. et al.**, 2000 ER pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:311–317.
- Kustikova O. et al.**, Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol.Cell. Biol.* 1998, 18:7095-7105.
- Lamph W.W. et al.**, Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature.* 1988 Aug 18;334(6183):629-31.
- Lazo P.S. et al.**, Structure and mapping of the fosB gene. FosB downregulates the activity of the fosB promoter. *Nuclei Acids Res.* (1992) 20:343-50.
- Lee W. et al.**, AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 1987; 49:741-752.
- Lessey B.A. et al.**, The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors. *Endocrinology* 1983; 112:1267-1274.
- Levine A.J.**, The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1993, 62:623.
- Levin E.R.**, 1999 Cellular functions of the plasma membrane ER. *Trends Endo. Metab* 10:374–377.
- Lewis T.S. et al.**, Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74 (1998).
- Liebermann D.A. et al.**, *Int. Journal Oncology*, 1998; 12:685-700.
- Linardopoulos S. et al.**, Elevated expression of AP-1 activity in human breast tumors as compared to normal adjacent tissue. *Anticancer Res.* 1990 Nov-Dec;10(6):1711-3.
- Liotta L.A. et al.**, In seminars in cancer biology. M.M. Gottesmann, 1990; Vol. 1:99-106.
- Liu J.J. et al.**, Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15:3654-3663.
- Liu Y. et al.**, 2002 Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene* 21:7680–7689.
- Liu Y. et al.**, AP-1 blockade in breast cancer cells causes cell cycle arrest by suppressing G1 cyclin expression and reducing cyclin-dependent kinase activity. *Oncogene.* 2004 Oct 28;23(50):8238-46.
- Lord K. et al.**, Protooncogenes fos/jun are positiv regulators of myeloid differentiation. *Mol Cell. Biol.* 13 (1993) 841-851.

- Lu C. et al.**, cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. *Onc.* 2005 Sep 29, 14:6516-24.
- Lucibello F.C. et al.**, Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *EMBO J.* 1990 Sep;9(9):2827-34.
- Ludes-Meyer J.H. et al.**, AP-1 blockade inhibits the growth of normal and malignant breast cells. *Oncogene.* 2001 May 17;20(22):2771-80.
- Lukas J. et al.**, Cyclin D1 is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* 1994; 9:707-718.
- Mackay A.R. et al.**, Effect of phorbol ester and cytokines on MMPs and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. *Invasion Metastasis.* 1992;12(3-4):168-84.
- Mackay AR**, Gomez DE, Cottam DW, Rees RC, Nason AM, Thorgeirsson UP. Identification of the 72-kDa (MMP-2) and 92-kDa (MMP-9) gelatinase/type IV collagenase in preparations of laminin and Matrigel. *Bio-techniques.* 1993 Dec;15(6):1048-51.
- Makris AR**, *Lancet* 345: 1181-1182, 1995.
- Meiser et al.**, Attitudes toward prophylactic oophorectomy and screening utilization in women at increased risk of developing hereditary breast/ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 75: 122-129, 1999.
- Mignatti P. et al.**, (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73, 161–195.
- Milde-Langosch K. et al.**, 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.* 1999 Oct 22;84(5):533-8.
- Milde-Langosch K. et al.**, 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 AP-1 family members. *Int J Cancer.* 2000 Aug 15;87(4):468-72.
- Milde-Langosch K. et al.**, FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas. *Breast-Canc.-Res.-Treat.* 2003; 77:265-275.
- Milde-Langosch K. et al.**, The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Jul;86(2):139-52.
- Minden A. et al.**, Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim. Acta* 1997; 1333:85-104.
- Morgan D.O.**, CDKs: engines, clocks and microprocessors. *Anna. R. Cell. Dev. Biol.*, 1997; 13:261.
- Morrow M**, Foster RS Jr. Staging of breast cancer: a new rationale for internal mammary node biopsy. *Arch Surg.* 1981 Jun;116(6):748-51. Review.
- Morton S. et al.**, 2003 A reinvestigation of the multisite phosphorylation of c-Jun. *EMBO J* 22:3876–3886.
- Mulligan G. et al.**, The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends. Genet.* 1998, 14:223.
- Mumberg D. et al.**, Alternative splicing of fosB transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins; *Genes and Develop.*, 1991, 5:1212-1223.
- Murray G. I. et al.**, (1996) MMP-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat. Med.* 2,461-462.
- Musti A.M. et al.**, Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP-kinases. *Science.* 1997 Jan 17;275(5298):400-2.
- Nakabeppu Y. et al.**, Proliferative activation of quiescent Rat-1A cells by δ FosB. *Mol Cell Biol.* 1993 Jul;13(7):4157-66.
- Narvaez C.J. et al.**, Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and TPA on cell cycle and apoptosis of MCF-7 cells and a D3-resistant variant. *Endocrinology.* 1997 Nov;138(11):4690-8.

- Nevins J.R.**, Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Growth Different.* 1998; 9:585-593.
- Nielsen N.H. et al.**, Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer, *Br. J. Cancer* (1996) 74: 874-880.
- Nishina H. et al.**, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3619-3623.
- Oda S. et al.**, Stabilization of cyclin E and cdk2 mRNAs at G1/S transition in Rat-1A cells emerging from the G0 state. *On-cogene.* 1995 Apr 6;10(7):1343-51.
- Okada Y. et al.**, *J. Biol. Chem.*, 1992; 267:21712-21719.
- Okada A. et al.**, Epithelial c-jun and c-fos are temporally and spatially regulated by estradiol during neonatal rat oviduct differentiation. *J Endocrinol.* 2004 Aug;182(2):219-27.
- Paech K. et al.**, Diff. ligand activation of ER α and ER β at AP-1 sites. *Science* 1997; 277:1510.
- Pai S.R. et al.**, Overexpression of c-fos induces expression of the retinoblastoma tumor suppressor gene Rb in transfected cells. *Anticancer Res.* 1994 Nov-Dec;14(6B):2501-8.
- Pai S.R. et al.**, Interaction of the Rb tumor suppressor protein with the c-fos promoter in c-fos transfected cells overexpressing c-fos and Rb. *Anticancer Res.* 1997 Sep-Oct;17(5A):3265-72.
- Pardee A.B.**, A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1974; 71:1286-1290.
- Pardee A.B. et al.**, G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 1989: 246:603.
- Passegue E. et al.**, JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16 (INK4a) expression. *EMBO J.* 2000 Jun 15;19(12):2969-79.
- Petz L.N. et al.**, Estrogen receptor alpha and AP-1 mediate estrogen responsiveness of the PR gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2002; 143:4583-4591.
- Phillips A. et al.**, FRA-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 1998 Jul;12(7):973-85.
- Platet N. et al.**, Breast cancer cell invasiveness: correlation with PKC activity and differential regulation by phorbol ester in ER-positive and -negative cells. *Int J Cancer.* 1998 Mar 2;75(5):750-6.
- Porter W. et al.**, *Mol. Endocrinology* 1996.
- Powell W.C. et al.**, Complex roles of MMPs in tumor progression. *Curr. Microbiol.*, 1996; 213.
- Preston G. et al.**, Induction of apoptosis by c-fos protein. *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 211-218.
- Qi X. et al.**, ER inhibits c-Jun-dependent stress-induced cell death by binding and modifying c-Jun activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):6769-77.
- Quantin and Breathnach**, Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature.* 1988 Aug 11;334(6182):538-9.
- Rauscher F.J. et al.**, 1988 Common DNA binding site for fos protein complexes and AP-1. *Cell* 52: 471-480.
- Redemann-Fibi B. et al.**, Stage and tissue-specific expression of fosB during mouse development. *Differentiation* 1991 Feb;46(1):43-9.
- Ree A.H. et al.**, Regulation of tissue-degrading factors and in vitro invasiveness in progression of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 1998 Apr;16(3):205-15.
- Resnitzky D. et al.**, Acceleration of the G1/S-Phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14:1669-1679.
- Rinehart-Kim J. et al.**, Alterations in the gene expression profile of MCF-7 breast tumor cells in response to c-Jun. *Int J Cancer.* 2000 Oct 15;88(2):180-90.
- Rha S.Y. et al.**, Sequential production and activation of matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Apr;43(2):175-81.

- Robbins P.D. et al.**, Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. *Nature*. 1990 Aug 16;346(6285):668-71.
- Rosen PP**, Groshen S, Kinne DW, Norton L., Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 1993 Nov;11(11):2090-100.
- Russo J**, Russo IH, Role of hormones in cancer initiation and progression, *Biological Neoplasia* 3: 49-61, 1998.
- Russo J**, Russo IH, *Molecular Basis of Breast Cancer*, Springer 2004, S. 1 ff. u. S. 317 ff.
- Rutter G. A. et al.**, (1995) Involvement of MAP kinase in insulin signalling revealed by noninvasive imaging of luciferase gene expression in single living cells. *Curr. Biol*. 5,890-899.
- Ryseck and Bravo**, C-Jun, Jun B, and Jun D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene*. 1991 Apr;6(4):533-42.
- Sabapathy K. et al.**, Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell*. 2004 Sep 10;15(5):713-25.
- Saez E. et al.**, C-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 82 (1995) 721-734.
- Safe S.**, 2001 Transcriptional activation of genes by 17 β -estradiol through ER-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 62:231–252[
- Schaerli P. et al.**, EGF-induced programmed cell death of human mammary carcinoma MDA-MB-468 cells is preceded by activation AP-1. *Cell Mol Life Sci*. 1998 Feb;54(2):129-38.
- Schlingemann J. et al.**, Profile of gene expression induced by the tumour promoter TPA in murine epithelial cells. *Int J Cancer*. 2003 May 10;104(6):699-708.
- Schonwasser D.C. et al.**, (1998) Activation of the MAPK/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell Biol*. 18, 790–798.
- Schuchard M. et al.**, 1993 Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocrine Reviews* 14: 659–669.
- Schuermann M. et al.**, FosB is a transforming gene encoding a transcriptional activator. *Oncogene*. 1991 Apr;6(4):567-76.
- Seshadri R. et al.**, Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol*. (1993) 11: 1936-1942.
- Sheng et al.**, 1991.
- Shermann M.L. et al.**, Transcriptional and post-transcriptional regulation of c-jun expression during differentiation of human myeloid leukemic cells. *J Biol Chem*. 1990 Feb 25;265(6):3320-3.
- Slamon D.J. et al.**, Correlation of relapse and survival with amplification on HER-2/neu. *Science* (1987) 235: 177-182.
- Smith L.M. et al.**, Breast cancer cells have lower activating protein 1 transcription factor activity than normal mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 1997 Jul 15;57(14):3046-54.
- Smith L.M. et al.**, cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*. 1999 Oct 28;18(44):6063-70.
- Sommers C.L. et al.**, Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; 31(2-3):325-35.
- Soto A.M.**, Cell proliferation of estrogen sensitive cells, *Endocrine Review* 48: 52-58, 1987.
- Speirs V., Parkes A.T.**, Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: Poor prognostic factors in human breast cancer. *Cancer Research*, 1999; 59:525-528.
- Stauber/ Weyerstahl**, *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Thieme 2001, S.366 ff.

- Stähle-Bäckdahl M. et al.**, (1993) 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 142,995-1000.
- Stein B. et al.**, Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.* 1993 Oct;12(10):3879-91.
- Stein B.**, Yang M.X., 1995 Repression of the IL-6 promoter by ER is mediated by NF- κ B and C/EBP β . *Mol Cell Biol* 15:4971-4979.
- Straub et al.**, Hereditäres Mammakarzinom. Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, Zuckerschwerdt, 2004.
- Sutherland et al.**, 1992.
- Suzuki et al.**, 1991.
- Tesarik J. et al.**, 1995 Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1438–1443.
- Thor A.D. et al.**, erbB-2, p53 and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 1346-1360.
- Thorgeirsson U.P. et al.**, Effect of natural protease inhibitors and a chemoattractant on tumor cell invasion in vitro. *J. Nat. Can. Inst.* 69 (1982) 1049.
- Tonetti D.A. et al.**, Stable transfection of an ER beta cDNA isoform into MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Oct;87(1):47-55.
- Tora et al.**, The human ER has two transcriptional AFs. *Cell* 1989; 59:477-487.
- Treisman**, 1992.
- Tulchinsky E.**, Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol. Histopathol.* (2000) 15:921-8.
- Ullmannova V. et al.**, Relationship between cyclin D1 and p21(Waf1/Cip1) during differentiation of human myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res.* 2003 Dec;27(12):1115-23.
- Umayahara Y. et al.**, 1994 Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* 269:16433–16442.
- Valagussa P.**, Bonadonna G, Veronesi U. Patterns of relapse and survival in operable breast carcinoma with positive and negative axillary nodes. *Tumori.* 1978 Jun 30;64(3):241-58.
- Van Dam H. et al.**, Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 1993 Feb;12(2):479-87.
- Van Diest P.J. et al.**, Cyclin D expression in breast cancer, *Am. J. Path.* (1997) 150: 705-711.
- Van Straaten et al.**, Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jun;80(11):3183-7.
- Vegeto E. et al.**, Human PR A form is a cell- and promoter-specific repressor of human PR B function. *Mol Endocrinol* 7 (1993):1244–1255.
- Vincenti M. P. et al.**, (1996) Regulating expression of the gene for MMP-1: mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.* 6,391-411.
- Wagener C.**, *Molecular Oncology*, Thieme 1999, S. 139 ff.
- Wang et al.**, 1994.
- Wang H. et al.**, Transcriptional expression of oncogenes and Rb antioncogene in experimental atherosclerotic lesions *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 1996 Jun;27(2):117-21. Chinese.
- Webb P. et al.**, 1992 The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. *Mol Endocrinol* 6:157–167.
- Webb P. et al.**, Tamoxifen activation of the ER/AP-1 pathway. *Mol. Endocrin.* 1995; 9:443-456.

- Webb P. et al.**, The ER enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 1999, 13:1672-85.
- Weisz A. et al.**, 1990 Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the ER and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res* 18:5097–5106.
- Weisz A et al.**, 1993 Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Critical Reviews in Oncogenesis* 4: 361–388.
- Wen D. et al.**, Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* (1992) 69: 559-572.
- Welter J.F. et al.**, Differential expression of the fos/jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncog.* 1995 Dec 21;11(12):2681-7.
- Wisdon R. et al.**, Transformation by FosB requires a trans-activation domain missing in FosB2 that can be substituted by heterologous activation domains. *Genes Dev.* 1992 Apr;6(4):667-75.
- Wisdon R. et al.**, Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation. *Mol Cell Biol.* 1993 May;13(5):2635-43.
- Wisdon R. et al.**, Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7429-38.
- Wu-Peng X.S. et al.**, *Mol. Endocrinology* 1992.
- Yamashita S. et al.**, 2001 Effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on c-fos and c-jun protooncogene expression in the mouse uterus. *Histology and Histopathology* 16: 131–140.
- Yamashita S. et al.**, 2003 Expression of c-fos and c-jun protooncogenes in the uteri of immature mice neonatally exposed to diethylstilbestrol. *Histology and Histopathology* 18: 83–92.
- Yen A. et al.**, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and TPA synergistically induce monocytic cell differentiation: Fos and Rb ex-pression. *J Cell Physiol.* 1993 Jul;156(1):198-203.
- Yen A. et al.**, The ratio of retinoblastoma to fos and RB to myc expression during the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995 Dec;210(3):205-12.

7. DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wäre nicht ohne Hilfestellung und Unterstützung zustande gekommen.

Prof. Dr. Thomas Löning danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Gynäkopathologie durchführen zu können.

Mein grosser Dank geht an Dr. Karin Milde-Langosch für die stetige Unterstützung, Ermutigung und ausgesprochen gute Betreuung während der experimentellen Arbeiten und vor allem während der Schreibphase. Sie war immer für ein beratendes Gespräch offen und eine grosse Hilfestellung.

Ein besonderes Dankeschön geht an Bianca Kelp und Gabi Rieck für die Betreuung und Anleitung im Labor.

Ohne meine Eltern wäre meine berufliche Ausbildung und damit verbunden diese Arbeit nicht möglich gewesen – nicht nur dafür danke ich ihnen von ganzem Herzen.

Ich bedanke mich bei Katrin Mittenzwei für die gemeinsame Zeit des Lachen und Leidens während unserer Ausbildung. Unsere Freundschaft hat so manche Strapaze erleichtert.

Und Klaas danke ich für den liebevollen Beistand.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8. LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Wolters, geb. Brinkmann
Vorname: Anja
Geburtsdatum/ -ort: 14.09.1977 in Braunschweig
Anschrift: Vorwerkstr. 11, 20357 Hamburg
Familienstand: verheiratet
01/2007: Geburt meines Sohnes Marten Wolters

Schulbildung:

1984 – 1988: Grundschule Lehndorf Siedlung, Braunschweig
1988 – 1990: Orientierungsstufe Leonhardtstrasse, Braunschweig
1990 – 1997: Wilhelm-Gymnasium (altsprachlich), Braunschweig

Hochschulbildung:

Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg 1998 – 2004

04/2000: Ärztliche Vorprüfung (Note 2,0)
04/2001: 1. Staatsexamen (Note 3,0)
03/2001 – 10/2002: Experimentelle Doktorarbeit, Thema: "Bedeutung und Regulation von FosB in zwei Mammakarzinom-Zelllinien", Gynäkopathologie, UKE, Hamburg
09/2003: 2. Staatsexamen (Note 1,6)
12/2004: 3. Staatsexamen (Note 2,0)

Wissenschaftliche Veröffentlichung:

Milde-Langosch K., Roeder H., Andritzky B., Aslan B., Hemminger G., Brinkmann A., Bamberger C.M., Loening T., Bamberger A.-M.: The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. Breast Cancer Res Treat. 2004 Jul;86(2):139-52.

Stipendium:

11/2002: Studienbeihilfe in der Höhe von Euro 2.000,00 zur "Förderung unbescholtenen, sehr guter Studentinnen der Medizin" durch die Rolwing-Stiftung (Mitglied des Freundes- und Förderkreises des UKE e.V.)

Ärztliche Weiterbildung:

01/2005 – 06/2006: Assistenzärztin Neurologie, Städt. Krh. Lüneburg, Niedersachsen
seit 07/2006: Assistenzärztin Neurologie, Marien-Krh., Hamburg

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder 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 bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Anja Wolters