

Aus dem (ehem.) Institut für Gynäkopathologie
des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Löning

**Expression von MMP-1, MMP-9, PAI-1 in Mammakarzinomen:
Korrelation zu klinisch-prognostischen Parametern und zu Transkriptionsfaktoren
der FOS-Familie**

Dissertation

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

Bahriye Aslan
aus Hamburg

Hamburg, 2008

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg**

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 21.07.2008

Prüfungsausschuss, der Vorsitzender: Prof. Dr. Th. Löning

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. F. Jänicke

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD. Dr. J. Schwarz

INHALTSVERZEICHNIS

A EINLEITUNG

A.1.1. Das Mammakarzinom

A.1.1.1. Inzidenz.....1

A.1.1.2. Altersverteilung.....2

A.1.1.3. Mortalität.....2

A.1.1.4. Ätiologie.....3

A.1.1.5. Klassifikation des Mammakarzinoms

 A.1.1.5.1. Pathomorphologie des Mammakarzinoms.....4

 A.1.1.5.2. Histopathologisches Grading.....6

 A.1.1.5.3. TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (UICC, 2002).....6

A.1.1.6. Prognostische Faktoren des Mammakarzinoms.....11

A.1.2. Onkogenese.....14

A.1.2.1. Aufbau und Funktion der extrazellulären Matrix.....17

A.1.3. Matrixmetalloproteinasen.....20

A.1.3.1. Struktur der Matrixmetalloproteinasen.....23

A.1.3.2. Aktivierung und Inhibierung der Matrixmetalloproteinasen.....25

A.1.3.3. Regulation der Matrixmetalloproteinasen.....27

A.1.3.4. Rolle der Matrixmetalloproteinasen in der Tumorbilogie.....30

A.1.4. Das Plasminogenaktivator-System.....33

A.1.4.1. Urokinase-Plasminogenaktivator.....34

A.1.4.2. Der Urokinase-Plasminogenaktivator- Rezeptor (uPAR).....35

 A.1.4.2.1. Proteolytische Funktion des Plasminogenaktivator-Systems.....35

 A.1.4.2.2. Nicht-proteolytische Funktion des Plasminogenaktivator-Systems..36

 A.1.4.2.3. Induktion der AP-1-Expression durch uPA-uPAR-Bindung.....39

A.1.4.3. Plasminogenaktivator-Inhibitoren39

A.1.4.4. Regulation von uPA.....40

A.1.4.5. Regulation von PAI-1.....	41
A.1.4.6. Klinische Relevanz des Plasminogenaktivator-Systems.....	42
A.1.5.1. Der AP-1-Komplex.....	43
A.1.5.2. Klinische Relevanz der AP-1-Transkriptionsfaktoren.....	44
A.1.6. Ziele der Arbeit.....	45
B MATERIAL	
B.1. Material	
B.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	47
B.1.2. Chemikalien.....	48
B.1.3. Pufferlösungen für die Proteinextraktion und das Western Blotverfahren.....	48
B.1.4. Primärantikörper.....	50
B.1.5. Sekundärantikörper.....	51
B.2. Patientenkollektiv.....	51
B.3. Klassifikation der untersuchten Tumoren.....	52
B.4. Beschreibung der Zelllinien.....	52
C METHODEN	
C.1. Proteinextraktion aus den Tumoren und den Zelllinien.....	54
C.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Protein Assay.....	54
C.3. Westernblotanalyse	
C.3.1. Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	55
C.3.2. Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	56
C.3.3. Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf.....	58
C.3.4. Elektro-Blotting.....	58
C.3.5. Blockierung.....	59
C.3.6. Inkubation mit primärem und sekundären Antikörper.....	60

C.3.7. Detektion.....	60
C.3.8. Densitometrische Auswertung.....	61
C.3.9. Statistische Auswertung.....	62

D ERGEBNISSE

D.1. Densitometrisch ausgewertete Ergebnisse der AP-1-Faktoren.....	63
D.1.1. Auffällige Korrelationen von AP-1-Faktoren zu klinischen Daten.....	64
D.2. Ergebnisse für MMP-1	
D.2.1. Expression von MMP-1 in den Tumoren.....	67
D.2.2. Expression von MMP-1 in den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7, T47D.....	69
D.2.3. Korrelation von MMP-1 zu AP-1-Faktoren.....	69
D.2.4. Korrelation von MMP-1 zu klinischen Daten.....	71
D.3. Ergebnisse für MMP-9	
D.3.1. Expression von MMP-9 in Tumoren.....	73
D.3.2. Expression von MMP-9 in den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7, T47D.....	74
D.3.3. Korrelation von MMP-9 zu AP-1-Faktoren.....	75
D.3.4. Korrelation von MMP-9 zu klinischen Daten.....	76
D.4. Ergebnisse für PAI-1 und den PAI-1/uPA-Komplex	
D.4.1. Expression von PAI-1 in Tumoren.....	78
D.4.2. Expression von PAI-1/uPA-Komplex in Tumoren.....	78
D.4.3. Expression von PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex in den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7, T47D.....	78
D.4.4. Korrelation von PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex zu AP-1-Faktoren.....	79
D.4.5. Korrelation von PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex zu klinischen Daten.....	81
D.5. Beziehungen der Proteasen untereinander.....	81

E	DISKUSSION	82
F	ZUSAMMENFASSUNG	93
G	LITERATURVERZEICHNIS	94
	LEBENS LAUF	123

A. EINLEITUNG

A.1.1. Das Mammakarzinom

A.1.1.1. Inzidenz

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau in der Welt, nach Schätzungen der WHO erkrankten im Jahr 2000 über eine Million Frauen an einem Mammakarzinom, 370.000 verstarben daran. Für Europa ging man im selben Jahr von 350.000 Neuerkrankungen und 130.000 Sterbefällen aus (Tyczynski, 2002). Das mittlere Lebenszeitrisko von Frauen an Brustkrebs zu erkranken, beträgt in Deutschland 9,2 %; das heißt, durchschnittlich jede 11. Frau erkrankt im Lauf ihres Lebens an Brustkrebs (Schön et al., 2004). Innerhalb Deutschlands steht das Mammakarzinom nach wie vor an erster Stelle in der Rangfolge der Krebsinzidenz bei Frauen (vor Darmkrebs, Lungen-Ca., Corpus uteri, Ovarialkarzinom und Magenkrebs). Bis zum Ende der 1980er Jahre stieg die Brustkrebsinzidenz in Deutschland deutlich an, in geringerem Maße auch die Sterblichkeit. In den letzten Jahren sind die Beobachtungen für Inzidenz und Mortalität weitgehend stabil. Die Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister und das Robert-Koch-Institut geben 47.517 Neuerkrankungsfälle für das Jahr 2000 (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002). In einer Pressemitteilung vom September 2006 berichtet das Bundesministerium für Gesundheit, dass im Jahre 2004 mehr als 55.000 Frauen neu an Brustkrebs erkrankt seien. Im selben Jahr seien insgesamt 17.592 an den Erkrankungsfolgen verstorben.

A.1.1.2. Altersverteilung

Brustkrebs ist die wichtigste Krebserkrankung bei jüngeren Frauen. Im Alter zwischen 35 und 59 Jahren gehen rund 40 % der Krebsneuerkrankungen und knapp 30 % der Todesfälle an Krebs auf das Konto von Brustkrebs. Das Erkrankungsrisiko nimmt mit fortschreitendem Alter zu. Das mittlere Erkrankungsalter liegt etwas über 60 Jahre. Der Altersanstieg der Inzidenzraten ist besonders auffällig zwischen 30 und 50 Jahren. Bei etwa 40% aller erkrankten Frauen wird die Diagnose damit vor dem 60.Lebensjahr gestellt (s. Diagramm 1).

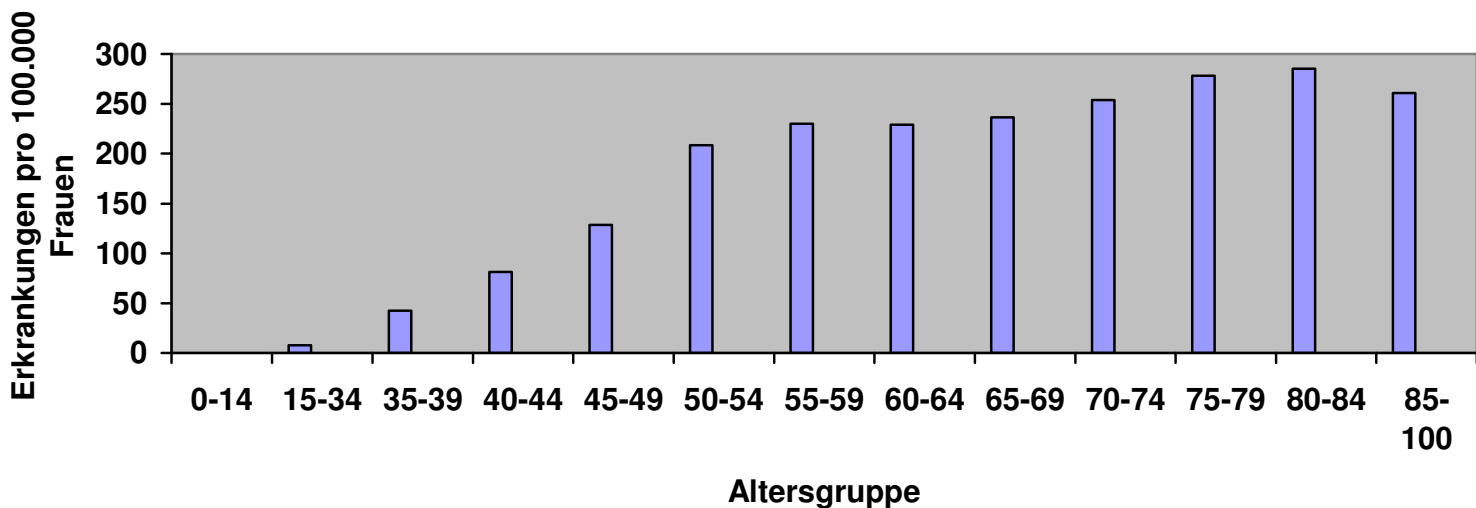


Diagramm 1: Schätzungen der altersspezifischen Brustkrebs-Inzidenz in Deutschland 2000;

Quelle: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004

A.1.1.3. Mortalität

Auch bezüglich der Mortalität ist das Mammakarzinom in Deutschland die häufigste Krebstodesursache bei Frauen und belegt mit 18 % den ersten Rang bei den Frauen. 2003 verstarben laut Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes 17.173 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Seit 1997 ist die Brustkrebsmortalität rückläufig. In den Jahren

2000 bis 2002 hat sie gegenüber den Jahren 1990 bis 1992 in fast allen Altersgruppen über 40 Jahren abgenommen (s. Diagramm 2).

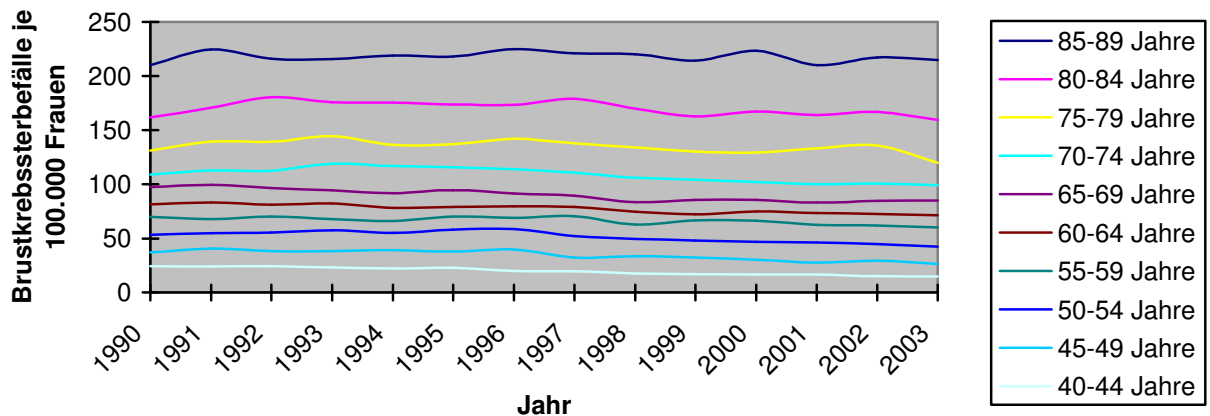


Diagramm 2: Entwicklung der altersspezifischen Brustkrebs-Mortalität in den Jahren 1990-2003 für Frauen im Alter ab 40 Jahren Brustkrebssterbefälle je 100.000 Frauen;
Quelle: Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamts (RKI 23.Juni 2007)

A.1.1.4. Ätiologie

Obwohl die Ätiologie des Mammakarzinoms in vielen Punkten unbekannt ist, sprechen eine Reihe von Indizien dafür, dass genetische Faktoren, hormonelle Imbalancen und Umweltfaktoren eine Rolle spielen.

Folgende mit einem erhöhten Krebsrisiko verbundenen Faktoren sind beim Mammakarzinom von besonderer Bedeutung (Böcker, 1997):

- Genetische Disposition. 1,2- bis 3 fach erhöhtes Krebsrisiko bei Vorkommen von Brustkrebs bei Verwandten ersten Grades (Mutter, Schwester, Tochter)
- Mutationen im BRCA 1- und BRCA 2-Gen (Tumorsuppressorgene) mit vollständigem Funktionsverlust
- Frühe Menarche/späte Menopause. Erhöhtes Risiko, wenn die erste Menarche vor dem 12. Lebensjahr auftrat und bei Menopause nach dem 55. Lebensjahr

- Nulliparae und späte Erstgebärende. Wenn das erste Kind nach dem 35. Lebensjahr der Mutter geboren wird, ist das Mammakarzinomrisiko der Mutter um das 2- bis 3-fache erhöht.
- Hormonelle Imbalancen. Möglicherweise hat ein erhöhter Östrogenspiegel Einfluß auf die Entwicklung von Mammakarzinomen.
- Adipositas, auf Grund der Östrogenproduktion im Fettgewebe
- Alter. Die Häufigkeit von Mammakarzinomen nimmt mit dem Alter der Frau zu, allerdings verlangsamt sich der Anstieg nach der Menopause.
- Karzinom der kontralateralen Mamma stellt ebenfalls ein erhöhtes Krebsrisiko dar.

Folgende Erkrankungen der Mamma gehen mit einem erhöhten Risiko für ein invasives Mammakarzinom einher:

- Proliferierende Mastopathie. Bioptisch nachgewiesen, bedeutet sie statistisch ein 1,5- bis 2,6 fach erhöhtes Krebsrisiko
- Lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) und atypische lobuläre Hyperplasie
- Duktales Carcinoma in situ (DCIS) und atypische duktale Hyperplasie.

A.1.1.5. Klassifikation des Mammakarzinoms

A 1.1.5.1. Pathomorphologie des Mammakarzinoms

Die histologische Typisierung invasiver Mammakarzinome folgt den Vorgaben der aktuellen WHO-Klassifikation (WHO, 2003):

- Invasives duktales Karzinom, not otherwise specified (=NOS): mit 40-75 % die größte Gruppe infiltrierend wachsender Karzinome
 - gemischter Typ
 - pleomorphes Karzinom (schlechte Prognose)
 - Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen

- Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen
- Karzinom mit melanotischen Merkmalen
- Invasives lobuläres Karzinom: mit einer Inzidenz von 5-15 % zweithäufigste Karzinomform
- Tubuläres Karzinom: selten, Inzidenz 1-2 %, günstige Prognose
- Invasives kribriiformes Karzinom: selten, Inzidenz <1 %, prognostisch sehr günstig)
- Medulläres Karzinom (selten, Inzidenz 1-7 %, mäßig gute Prognose, typische und atypische Variante)
- Muzinöses Karzinom und andere Muzin-reiche Tumoren
 - Muzinöses Karzinom
 - Zystadenokarzinom und zylinderepitheliales muzinöses Karzinom
 - Siegelringzell-Karzinom
- Neuroendokrine Tumoren
 - Solides neuroendokrines Karzinom
 - Atypischer Carcinoidtumor
 - kleinzelliges Karzinom
 - großzelliges neuroendokrines Karzinom
- Invasives papilläres Karzinom (selten, Inzidenz 1-2 %, günstige Prognose)
- Invasives mikropapilläres Karzinom
- Apokrines Karzinom (selten)
- Metaplastische Karzinome
 - rein epitheliale metaplastische Karzinome
 - Plattenepithelkarzinom
 - Adenokarzinom mit Spindelzell-Metaplasie
 - Adenosquamöses Karzinom
 - Mukoepidermoides Karzinom
 - gemischtes epithelial-/mesenchymales metaplastisches Karzinom
- Lipidreiches Karzinom
- Sekretorisches Karzinom
- Onkozytäres Karzinom
- Adenoid-zystisches Karzinom
- Azinuszell-Karzinom

- Glykogenreiches Klarzellkarzinom
- Sebazeöses Karzinom
- Inflammatorisches Karzinom

A.1.1.5.2. Histopathologisches Grading

Für invasive Karzinome wird das Grading nach Elston und Ellis empfohlen (Elston & Ellis, 1991). Es erfolgt die semiquantitative Beurteilung der histo- und zytologischen Kriterien an primär fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material. Bewertet werden Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate. Hierbei werden die vergebenen Scorewerte addiert und ergeben das Grading (s. Tabelle 1).

Summenscore	G-Gruppe	Definition
3,4,5	G ₁	gut differenziert
6,7	G ₂	mäßig differenziert
8,9	G ₃	niedrig differenziert

Tabelle 1: Grading der invasiven Mammakarzinome nach Elston und Ellis

A.1.1.5.3. Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation (6.Auflage, UICC (2002))

pT - Primärtumor

Die pathologische Klassifikation erfordert die Untersuchung des Primärtumors ohne makroskopisch erkennbaren Tumor an den Resektionsrändern. Ein Fall kann nach pT klassifiziert werden, wenn an den Resektionsrändern Tumorgewebe nur histologisch nachgewiesen wird.

Bei der pT-Klassifikation wird zur Bestimmung der Tumorgöße nur die *invasive* Komponente gemessen. Wenn ein Tumor aus einer großen in-situ-Komponente (z.B. 4 cm) und einer kleinen invasiven Komponente (z.B. 0,5 cm) besteht, wird der Tumor als pT_{1a} klassifiziert.

Die pT-Kategorien entsprechen den T-Kategorien.

pT _x	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT ₀	kein Anhalt für Primärtumor
pT _{is}	Carcinoma in situ
pT _{is} (DCIS)	Duktales Carcinoma in situ
pT _{is} (LCIS)	Lobuläres Carcinoma in situ
pT _{is} (Paget)	M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor. Der M. Paget kombiniert mit einem nachweisbaren Tumor wird entsprechend der Größe des Tumors klassifiziert.
pT ₁	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT _{1 mic}	Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT _{1a}	Mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT _{1b}	Mehr als 0,5 cm, aber nicht größer als 1 cm in größter Ausdehnung
pT _{1c}	Mehr als 1 cm, aber nicht größer als 2 cm in größter Ausdehnung
pT ₂	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT ₃	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT ₄	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand ³ oder Haut, soweit unter pT _{4a} bis pT _{4d} beschrieben
pT _{4a}	Ausdehnung auf die Brustwand. Die Brustwand schließt die Rippen, die Interkostalmuskeln und den vorderen Serratusmuskel mit ein, nicht aber die Pektoralismuskulatur.
pT _{4b}	Ödem (einschließlich Apfelsinhaut) oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT _{4c}	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT _{4d}	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

pN – Regionäre Lymphknoten

Die pathologische Klassifikation erfordert die Resektion und Untersuchung zumindest der unteren axillären Lymphknoten (Level I). Hierbei sollten sechs oder mehr Lymphknoten histologisch nachgewiesen worden sein. Das Mindestmaß für zwei untersuchte Level sind zehn Lymphknoten (Level II: mittlere Axilla; Level III: apikale Axilla). Weitere regionäre Lymphknoten sind ipsilateral gelegene infraklavikuläre Lymphknoten, Lymphknoten an der A. mammaria interna und supraclavikuläre Lymphknoten. Zervikal und kontralateral gelegene Lymphknotenmetastasen werden als Fernmetastase (pM₁) klassifiziert.

Die Untersuchung einer oder mehrerer Schildwächterlymphknoten („sentinel-Lymphknoten-Biopsie“) kann für die pathologische Klassifikation herangezogen werden. Eine Klassifikation, die allein auf der Untersuchung des Schildwächterlymphknotens, ohne nachfolgende Untersuchung der axillären Lymphknoten beruht, sollte mit dem Zusatz (sn) bezeichnet werden, z.B. pN₁(sn).

pN _x	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
pN ₀	keine regionären Lymphknotenmetastasen Fälle mit isolierten Tumorzellen in regionären Lymphknoten werden als pN _{0(i+)} klassifiziert. Isolierte Tumorzellen sind definiert als einzelne Tumorzellen oder kleine Kluster von Zellen, die nicht größer als 0,2 mm in der größten Ausdehnung sind und die üblicherweise durch immunhistochemische oder molekulare Methoden entdeckt und manchmal in der HE-Färbung verifiziert werden können. Typischerweise zeigen isolierte Tumorzellen keine metastatische Aktivität wie Proliferation oder Stromareaktion.
pN ₁ mi	Mikrometastase (größer als 0,2 mm, aber nicht größer als 2 mm)
pN ₁	Metastase(n) in 1–3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), nachgewiesen durch Untersuchung des Schildwächterlymphknotens, aber klinisch nicht erkennbar.

	(Als „klinisch erkennbar“ werden Metastasen bezeichnet, die durch klinische Untersuchung oder durch bildgebende Verfahren (ausgeschlossen Lymphszintigraphie) diagnostiziert werden oder vom Pathologen makroskopisch erkannt werden.)
pN _{1a}	Metastase(n) in 1–3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine Metastase mehr als 2 mm in größter Ausdehnung.
pN _{1b}	Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), nachgewiesen durch Untersuchung des Schildwächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar.
pN _{1c}	Metastasen in 1–3 axillären Lymphknoten <i>und</i> Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), nachgewiesen durch Untersuchung des Schildwächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar.
pN ₂	Metastase(n) in 4–9 axillären Lymphknoten <i>oder</i> in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen.
pN _{2a}	Metastase(n) in 4–9 axillären Lymphknoten, zumindest eine Metastase mehr als 2 mm in größter Ausdehnung.
pN _{2b}	Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen.
pN ₃	Metastasen in 10 oder mehr ipsilateralen axillären Lymphknoten <i>oder</i> in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten <i>oder</i> in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase <i>oder</i> mehr als 3 axillären Lymphknoten mit klinisch nicht erkennbarer(en), nur mikroskopisch nachweisbarer(en) Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna <i>oder</i> Metastase(n) in supraclavikulären Lymphknoten.
pN _{3a}	Metastase(n) in 10 oder mehr ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine größer als 2 mm) <i>oder</i> in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten.

pN _{3b}	Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase <i>oder</i> Lymphknotenmetastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna nachgewiesen durch Untersuchung des/ der Schildwächterlymphknoten(s), aber nicht klinisch erkennbar.
pN _{3c}	Metastase(n) in ipsilateralen supraclavikulären Lymphknoten.

M – Fernmetastasen

Die pM-Kategorien entsprechen den M-Kategorien.

pM _x	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
pM ₀	keine Fernmetastasen
pM ₁	Fernmetastasen

Die Kategorien M₁ und pM₁ können wie folgt spezifiziert werden:

Lunge	PUL	Knochenmark	MAR
Knochen	OSS	Pleura	PLE
Leber	HEP	Peritoneum	PER
Hirn	BRA	Nebenniere	ADR
Lymphknoten	LYM	Haut	SKI
Andere Organe	OTH		

R-Klassifikation

Die pTNM-Klassifikation kann durch die Residualtumor (R) –Klassifikation ergänzt werden (UICC, 2002). Das Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumor wird durch die R-Klassifikation beschrieben. Der Operateur bewertet und dokumentiert den intraoperativen Befund. Für den Pathologen ist die Klassifikation in Bezug auf den Resektionsrandstatus relevant.

R _x	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R ₀	Kein Residualtumor
R ₁	Mikroskopischer Residualtumor
R ₂	Makroskopischer Residualtumor

A.1.1.6. Prognostische Faktoren des Mammakarzinoms

Die Metastasierung von Krebs ist die bei weitem häufigste Todesursache von Krebspatienten und ist für das Mammakarzinom bisher als nicht heilbar anzusehen.

Für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen ist es sehr entscheidend, in welchem Stadium der Tumor diagnostiziert wird. Bis heute ist der axilläre Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom der stärkste Prognosefaktor. Bei einem lokal begrenzten Primärtumor mit negativem Lymphknotenstatus liegt die relative 5-(10-) Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 94,8 % (86,4 %), während dieser Wert bei Befall von zehn und mehr Lymphknoten nur noch bei 48,1 % (27,3 %) erreicht (Sauer, 2005).

Weitere, sogenannte „klassische Prognosefaktoren“ sind Grösse und Ausdehnung des Primärtumors (pT₁-T₄), Beurteilung des Malignitätsgrades (G₁-G₃), Anzahl von Fernmetastasen (M₀-M₁) und der Steroidhormonrezeptoren-Status (Östrogen- und Progesteronrezeptoren).

Nach den Erhebungen des Tumorregisters München lautet das relative Fünf- und Zehnjahresüberleben für die jeweiligen pT-Kategorien wie folgt:

- pT₁ 91,0 % und 81,7 %, wobei:
 - pT_{1a} 96,9 % und 90,3 %
 - pT_{1b} 98,1 % und 91,2 %
 - pT_{1c} 91,9 % und 80,9 %
- pT₂ 78,3 % und 62,9 %
- pT₃ 61,5 % und 40,7 %
- pT₄ 47,1 % und 30,7 %

Auch wenn das histologische Grading mit anderen Prognosefaktoren korreliert ist, ergibt sich univariat eine gute Trennung für die bekannte Klassifikation.

Das relative Fünf- bzw. Zehnjahresüberleben kann für

- G₁-Tumoren mit 99,6 % bzw. 94,1 %
- G₂-Tumoren mit 87,5 % bzw. 73,7 %
- und für G₃-Tumoren mit 69,8 % und 55,3 % angegeben werden.

Desweiteren wird in den meisten Studien Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiven Tumoren unabhängig vom Status der Lymphknoten eine bessere Prognose zugesprochen (Knight et al., 1977; McGuire, 1986). Der Verlust der Östrogenrezeptor-Expression dagegen spricht für eine fortgeschrittene Entwicklung des Tumors. Somit ist die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus gemäß den Empfehlungen des 8. Internationalen-Experten-Konsensus zur Primärtherapie des frühen Mammakarzinoms in St. Gallen, 2003, obligat durchzuführen (Goldhirsch et al., 2003).

Auch *histologisch-morphologische Kriterien* sind von hoher prognostischer Bedeutung. So haben definierte Sonderformen, wie z.B. tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinome, eine signifikant bessere Prognose als duktales. Ein histologisch nachweisbarer peritumoraler Tumoreinbruch in die Lymph- oder Blutgefäße weist auf eine schlechte Prognose hin.

Neben diesen „klassischen“ Prognosefaktoren, deren Nachweis überwiegend in unabhängigen Studien belegt ist, erlangen auch immer mehr sogenannte „neuere“ tumorbiologische

Prognosefaktoren eine weitreichende Bedeutung. Ihr Einfluss auf das rezidivfreie und/oder Gesamtüberleben der Patientinnen ist zum Teil noch nicht mit gleicher Evidenz belegt.

Weitgehend anerkannt als prognostischer Marker ist die Bestimmung des Status des Urokinase-Plasminogenaktivators (uPA), sowie seines Inhibitors PAI-1. Diese Faktoren haben sich vor allem bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall als gute Indikatoren für das Rezidivrisiko erwiesen (Pechtl et al., 2000; Jänicke et al., 1993).

Zunehmende Bedeutung erhält auch HER2/neu-Onkoprotein, ein transmembranärer Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ. Ca. 25% der invasiven Mammakarzinome zeigen eine Überexpression des HER2/neu-Onkoproteins. Dies ist offenbar in den meisten Fällen auf eine Amplifikation des HER2/neu-Gens zurückzuführen. Eine HER2/neu-Überexpression ist in der Regel mit einem aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung und einer Herunterregulierung des Hormonrezeptorstatus korreliert (Konecny et al., 2003). Eine unabhängige prognostische Relevanz einer HER2/neu-Überexpression ist allerdings nicht endgültig geklärt, da die Korrelation zwischen HER2/neu-Status und Krankheitsverlauf durch seine prädiktive Bedeutung hinsichtlich des Ansprechens auf Systemtherapie überdeckt wird (Yamauchi et al, 2001). Eine möglichst frühzeitige Bestimmung des HER2/neu-Status ist allerdings empfehlenswert im Hinblick auf eine spätere Therapie mit dem humanisierten Antikörper Herceptin™ (Trastuzumab). Diese Therapie ist in der metastasierten Situation zugelassen und wird in der adjuvanten Situation im Rahmen von Studien angeboten.

Als ein weiterer „neuer“ Prognosefaktor zählt der immunzytochemische Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark, die mit Hilfe von Antikörpern gegen epithelzellspezifische Zytokeratine in Knochenmarkbiopsien detektiert werden (Braun et al., 2000). In der neuen TNM-Klassifikation (UICC, 2002) wird ein positiver Knochenmarkstatus nicht als Metastasierung gewertet, sondern getrennt klassifiziert.

Alle weiteren „neuen“ Prognosefaktoren, wie andere tumorassoziierte Proteolysefaktoren (z.B. Kathepsine, Matrixmetalloproteinasen) oder zellkinetische Parameter (z.B. S-Phase, Ploidie, Ki-67, MIB1, PCNA), sowie neue molekulare Ansätze (z.B. Cyclin E, RNA-Expressionsmuster, Proteomics) sind derzeit noch Gegenstand der Forschung und sollten

außerhalb von Studien nicht bestimmt werden. Aus der Bestimmung solcher Faktoren leiten sich derzeit keine klinischen Konsequenzen ab.

A.1.2. Onkogenese

Die Entstehung eines Tumors beginnt mit der **Transformation** einer somatischen Zelle in eine maligne Tumorzelle. Diese Veränderung kann u.a. ausgelöst werden durch krebsauslösende Noxen (**Karzinogene**), wie z.B. ionisierende Strahlen, UV-Strahlen, chemische Karzinogene (z.B. Nitrosamine), Tumor(Retro-)viren, Onkogene und Verlust von Tumorsuppressorgenen. Die Auswirkung eines oder mehrerer Karzinogene (Synkarzinogene) kann durch Kokarzinogene (Promotoren) unterstützt oder verstärkt werden.

Karzinogene üben ihre Wirkung an der DNA aus und führen dort zu bleibenden Veränderungen (**Initiation**), auch wenn die Noxe nur kurzfristig wirksam war („Hit-and-run“-Wirkung). Die DNA-Veränderung wird dann von einer einzigen transformierten Ursprungszelle auf die Tochterzellen des Tumors weitergegeben und stellt den Ausgangspunkt der nach einer unterschiedlich langen Latenzzeit einsetzenden **klonalen Expansion** dar.

Ist das ursprüngliche normale Gewebe vollständig durch atypische Zellen ersetzt, die Basalmembran aber noch nicht durchbrochen, spricht man von einem Carcinoma in situ. Aus einem Carcinoma in situ kann schließlich das invasive Karzinom entstehen. Hierfür ist im Rahmen der Tumorzell-Dissoziation eine Ablösung einzelner Tumorzellen aus dem organisierten Tumorzellverband und das aktive Einwachsen von Tumorzellen in das umgebende Gewebe (**Invasion**) (Mundy, 1997). Damit sich Tumorzellen aus dem Zellverband ablösen können, muss die Zahl an zellulären Adhäsionsmolekülen (CAM's = Cell adhesion molecules) vermindert sein (Hoffman, 2003). So ermöglicht z.B. E-Cadherin als Oberflächenprotein eine Adhäsion von Epithelzellen untereinander (Vleminckx et al., 1991).

Synergistisch für die Invasivität der Tumorzelle wirken Enzyme, die eine temporäre und reversible Auflösung (**Degradation**) der Basalmembran (bestehend aus Kollagen Typ IV und

Glykoproteinen wie Laminin) und der extrazellulären Matrix (zusammengesetzt aus Kollagen Typ I, II V und VI, Fibrin, Fibronectin, Proteoglykane) ermöglichen (Mundy et al., 1997; Mignatti, et al., 1986; Mignatti & Rifkin, 1993; Liotta et al., 1991; Andreasen et al., 1997 und 2000).

Eine wesentliche Rolle spielen dabei Sekretion und Aktivierung von degradierenden Enzymen (wie z.B. Matrixmetalloproteinasen, Plasminogenaktivatoren und Glykosidasen) durch die Tumorzelle und/oder Fibroblasten.

Die aktive amöboide Fortbewegung der Tumorzelle in der enzymatisch eröffneten Gewebestruktur wird durch spezifische CAM's vermittelt. Zu den am weitesten verbreiteten zählen die **Integrine**. Diese sind an einer Reihe von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen entscheidend beteiligt (Aumailley et al., 1998), vermutlich auch an der hämatogenen Aussaat von Tumorzellen (Hynes, 1992). Mit der extrazellulären Domäne der Integrine haftet sich die Tumorzelle an Laminin, Fibronectin, Vitronectin oder andere verschiedene Komponenten der EZM an, wobei mehrere Integrine oft sogar dieselbe Komponente binden können (Hynes, 1992). Die intrazelluläre Domäne sorgt für die Bewegung durch die Aktinfilamente (Giancotti et al., 1999).

Gelangen invasive Tumorzellen in Lymph- und/oder Blutgefäße, können sie in einen anderen Bereich des Körpers gelangen, aus dem Gefäß wieder austreten und in dieser Lokalisation durch An- und Weiterwachsen eine Tochtergeschwulst bilden (**Metastasierung**, griech.: metastasis = Wegzug). Während das Ablösen der Tumorzellen aus dem Zellverband mit einer verminderten Expression von CAM's einhergeht, ist am Ort der Tumormetastasierung wiederum eine erhöhte Expression von CAM's für das Anheften an die EZM notwendig (Mundy, 1997).

Das Tumorwachstum ist in hohem Maße von einer tumoreigenen Gefäßversorgung abhängig. Bis zu einer Tumorgröße von 1-2 mm³ können Tumorzellen durch Diffusion ernährt werden. Das weitere Wachstum hängt dann allerdings von der Bildung eines eigenen Gefäß führenden Tumorstromas ab (**Angiogenese**) (Strömblad & Cherech, 1996).

Induziert wird die Neovascularisierung durch Sekretion von **Vascular-Endothelial-Growth Factor (VEGF)** und **β -Fibroblast-Growth Factor (β - FGF)** durch Tumorzellen. Der initiale Stimulus ist dabei die Hypoxie, die allgemein in Tumoren auftritt, bedingt durch eine Minderversorgung der schnell proliferierenden Zellen (Dang & Semenza, 1999).

Die Angiogenese startet mit einem begrenzten Untergang der Basalmembran durch Proteolyse ihrer Bestandteile, gefolgt von der Auswanderung von Endothelzellen aus dem Gefäßlumen. Anschließend proliferieren diese Zellen in die sie umgebende Matrix und bilden tubulusähnliche Strukturen, aus denen sich schließlich die neuen Gefäße formieren (Folkman & Shing, 1992). Die proliferierenden neuen Gefäße haben fragmentierte Basalmembranen, die leichter von Tumorzellen penetriert werden können. Endothelzellen dieser Neovaskularisation produzieren auch extrazelluläre Matrix degradierende Enzyme, die nicht nur die Penetration der Endothelzellen ermöglichen, sondern auch die Invasion der Tumorzellen selbst (Engel et al., 1996). Zu den Enzymen, die Komponenten der EZM abbauen, zählen die Plasminogenaktivatoren sowie die Matrixmetalloproteinasen (MMP's).

Entscheidend für die Ausformung eines Gefäßes scheint die lokale Begrenzung der Proteolyse zu sein, wie *in vitro*-Untersuchungen nahe legen. So wachsen stimulierte Endothelzellen, die auf einem Fibringel aufgebracht wurden, in Gegenwart eines unspezifischen Serinproteinaseinhibitors wie Aprotinin in Form von Kapillaren, während sie ohne Inhibitor das gesamte Gel auflösen.

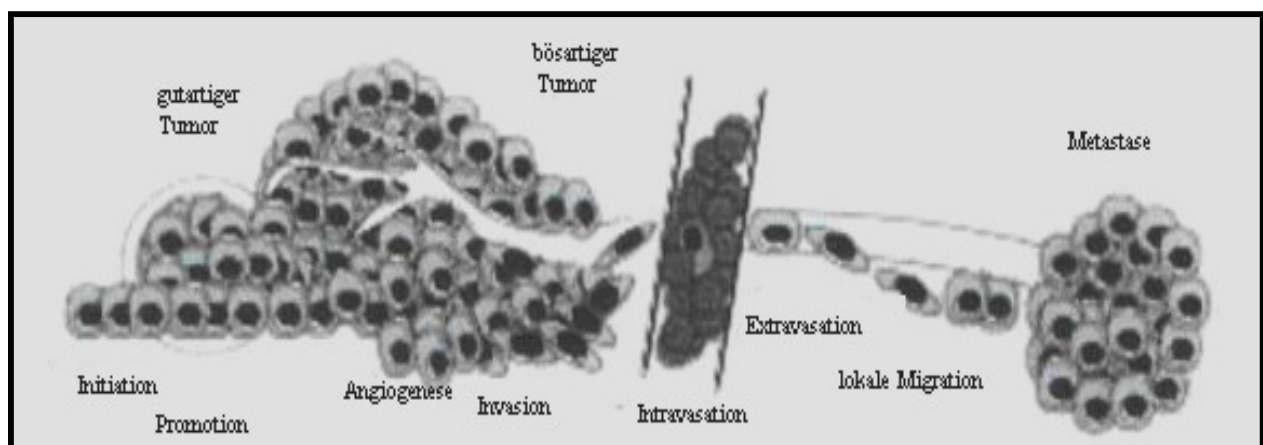


Abbildung 1 zeigt die relevanten Schritte in der Entwicklung von der Entartung eines benignen Tumors zum malignen Tumor. Dabei sind neben der **Initiation, Promotion, die Angiogenese, Invasion und Migration** wichtige Schritte der Metastasierung und Focus für Grundlagenforschung und klinische Anwendungen. (Coussens et al., 2002)

A.1.2.1. Aufbau und Funktion der extrazellulären Matrix (EZM)

Unter dem Begriff der extrazellulären Matrix (EZM) wird eine grosse Zahl unterschiedlicher extrazellulär gelegener Proteine zusammengefasst, in welche die Zellen eines Gewebes eingebettet sind. Zu den wesentlichen Bestandteilen dieser Matrix gehören einerseits unlösliche fibrilläre Makromoleküle wie die Kollagene, andererseits auch lösliche Polymere wie die Proteoglykane sowie eine Vielzahl kleinerer Glykoproteine wie beispielsweise Fibronectin, Laminin oder Nidogen. Eine qualitativ und quantitativ korrekt zusammengesetzte Matrix ist eine Grundvoraussetzung für die strukturelle Integrität und Funktionsfähigkeit eines jeden Gewebes.

Die Vorstellung der EZM als starres Gerüst, welches lediglich für den Zusammenhalt eines Gewebes notwendig ist, hat sich in den letzten Jahren grundlegend gewandelt. Mit zunehmendem Verständnis der Heterogenität der einzelnen Proteinfamilien der EZM und dem Aufklären der komplexen Strukturen stellte sich heraus, dass den einzelnen Domänen dieser großen Moleküle ganz unterschiedliche Funktionen zukommen und es ist nunmehr gut bekannt, dass sie direkt mit Zellen interagieren und den Stoffwechsel, die Proliferation sowie das Wachstumsverhalten kontrollieren können.

Die EZM beeinflusst über vielfältige Mechanismen die Freisetzung und Aktivität von Zytokinen und übt so einen indirekten Einfluss auf ganz unterschiedliche biologische Vorgänge aus. Es ist somit nicht verwunderlich, dass Zell-Matrix-Wechselwirkungen eine große Rolle bei Remodelierung der EZM spielen, sowohl während physiologischer Prozesse, wie z.B. Embryogenese, Ovulation (Beers et al., 1975), postmenopausale Mammainvolution (Ossowski et al., 1979) und Wundheilung (Grøndahl-Hansen et al., 1988; Schafer et al., 1994), als auch während pathologischer Prozesse wie Entzündungen (Aktivierung von Makrophagen und Proteasen) und Tumormigration/-invasion.

Die extrazelluläre Matrix unterliegt selbst in Geweben, welche gleichsam ruhen und keinen größeren Wachstums- oder Umbauvorgängen unterworfen sind, einem ständigen, sorgfältig balancierten Gleichgewicht zwischen Neubildung und Abbau. Der Abbau wird durch eine

Vielzahl verschiedener Proteasen gewährleistet, welche sich entsprechend der strukturellen Eigenschaften des jeweiligen enzymatisch aktiven Zentrums in Serin-, Zystein-, Aspartyl-, sowie Metalloproteinasen (s. Tabelle 2) einordnen lassen. Erst eine Veränderung in der Balance zwischen proteolytisch wirksamen Proteinen und deren Inhibitoren wird mit der relevanten Degradation der EZM in Zusammenhang gebracht.

Proteasenfamilie	Untergruppe
Serin-Proteasen	Plasmin Elastase Kathepsin G
Matrixmetalloproteinasen	Kollagenasen Gelatinasen Stromelysine Membranständige MMP`s (MT-MMP`s)
Zystein-Proteasen	Kathepsin B Kathepsin L
Aspartyl-Proteasen	

Tabelle 2. Proteasenfamilien und ihre Untergruppen

So kommt es z.B. während schwerer Entzündungsvorgänge (z.B. Multiorganversagen nach Polytrauma, Sepsis, Peritonitis) zur Ausschüttung verschiedener Mediatoren und Effektoren.

Bei invasivem Tumorwachstum bedienen sich die entarteten Zellen proteolytischer Systeme. Insbesondere die Serinproteasen sowie die Matrixmetalloproteinasen (MMP`s) scheinen für die Zellmigration von besonderer Bedeutung zu sein (s. Abbildung 2). So zeigte sich bei invasiven Brusttumoren eine im Vergleich zu gutartigen Geschwulsten erhöhte Plasminogen-Expression, die sich in den Bereichen invasiven Wachstums konzentriert (Clavel et al., 1986). Ebenso ist bereits eine vermehrte Expression von Proteasen aus der Familie der MMP`s zu beobachten, die eng mit der Tumorerkrankung und Metastasierung assoziiert ist (Westermarck & Kähäri, 1999). Darüber hinaus wurde auch eine Assoziation von Aspartyl- oder Zystein-Proteasen mit Tumorzellinvasion beschrieben (s. Tabelle 2). Während der Metastasierung

muss v.a. die Degradation der Basalmembran von Gefäßen mehrfach erfolgen. Den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 scheint während dieses Vorgangs eine Schlüsselstellung zuzukommen, da diese in der Lage sind Kollagen IV zu spalten.

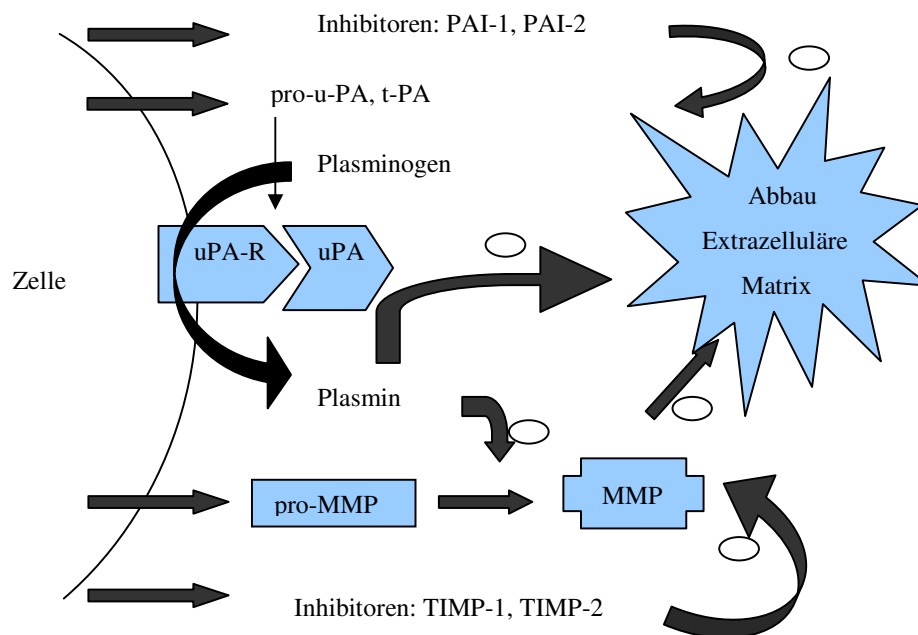


Abbildung 2. Interaktion des Urokinase-Plasminogenaktivator- und Matrixmetalloproteinase-Systems beim Abbau der EZM

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der größte Teil der matrixdegradierenden proteolytischen Aktivität nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von dem umliegenden Fibroblasten ausgeht. So wird z.B. EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), ein Mitglied der Immunoglobulinfamilie, das an verschiedenen Zellen als Oberflächenantigen exprimiert wird (Guo et al., 1997), durch die Tumorzelle gebildet und induziert die verstärkte Expression von Matrixmetalloproteinasen durch Fibroblasten. Weiterhin sind die Tumorzellen in der Lage, die sie umgebenden Endothelzellen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren ebenfalls zur Sezernierung von matrixdegradierenden Enzymen, Proliferation und Induktion zur Neoangiogenese anzuregen.

A.1.3. Das Matrixmetalloproteinasen (MMP) – System

Ausgehend von der initialen Entdeckung, dass ein Kaulquappenscheibchen Kollagen auflösen kann, wurde in fast allen menschlichen Tumoren die proteolytische Aktivität der MMP`s entdeckt (Gross et al., 1962).

Matrixmetalloproteinasen bilden eine Familie von Zink-abhängigen Enzymen, von denen bereits mehr als 24 verschiedene Endopeptidasen beim Menschen beschrieben wurden (Ravanti & Kahari, 2000), welche aufgrund ihrer strukturellen Merkmale und ihrer Substratspezifität in vier Untergruppen eingeordnet werden können (Woessner, 1998).

Bei

- den Kollagenasen,
- den Stromelysinen
- den Gelatinasen handelt es sich um sezernierte Enzyme, wohingegen
- die membranständigen Metalloproteinasen mittels einer Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert sind.

Zusammengenommen verfügen die MMP`s über ein sehr weites Substratspektrum, so dass sie nahezu alle Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagene, Laminin oder Elastin abbauen können.

In den meisten Tumoren werden MMP`s von den Tumor- und den Tumor-umgebenden Stromazellen gebildet, wo eine vermehrte Expression am invasiven Rand des Tumors beobachtet werden konnte, um an dieser Stelle die EZM gemeinsam stark abzubauen (Basset et al., 1997; Johnson et al., 1998; Heppner et al., 1996; Johansson et al., 1999).

Die **Kollagenasen** MMP-1, MMP-8 und MMP-13 sind für den proteolytischen Abbau der fibrillären Kollagene vom Typ I, II, III und V verantwortlich, die nach ihrer Spaltung zu amino-terminalen $\frac{3}{4}$ - und carboxy-terminalen $\frac{1}{4}$ -Fragmenten bei Körpertemperatur schnell denaturieren und von anderen MMP`s (v.a. **Gelatinasen** wie MMP-2 und MMP-9) weiter

degradiert werden (Kähäri et al., 1997; Shapiro, 1998; Woessner, 1998). Kollagenasen können immer dann nachgewiesen werden, wenn in der Umgebung ein hoher Umsatz an extrazellulärer Matrix stattfindet.

Stromelysin-1 (MMP-3) und -2 (MMP-10) sowie Matrilysin (MMP-7) und die Metallo-Elastase aus Makrophagen (MMP-12) werden zur Subgruppe der Stromelysine zusammengefasst (He et al., 1989). Metallo-Elastase und Matrilysin können darüber hinaus auch Elastin proteolytisch abbauen. Stromelysin-1 (MMP-3) und andere spielen ausserdem eine wichtige Rolle in der Aktivierungskaskade von MMP-1 und MMP-9 (Okada et al., 1992).

Gelatinase A (MMP-2) und **Gelatinase B (MMP-9)** verdauen Gelatine, Laminin, Nidogen und sind vor allem in der Lage, die Basalmembran aufzulösen (Simon et al., 1999).

MMP-9 kann die Kollagene der Typen I, II und V spalten (Okada et al., 1995). Andere Untersuchungen über die Substratspezifität der Gelatinasen bewiesen ihre Fähigkeit, Kollagene der Typen IV, V, VII und X sowie Fibronectin und Elastin abzubauen (Murphy et al., 1991, Senior et al., 1991, Matrisian et al., 1992).

MMP-9 wird von epithelialen Zellen, vor allem von Keratinozyten, exprimiert und zusätzlich auch in den sekretorischen Granula von Neutrophilen und Eosinophilen gespeichert (Stähle-Bäckdahl et al., 1993). Immunhistochemische Untersuchungen zeigen aber auch eine Expression von MMP-9 in Tumorzellnestern selbst auf (Sugiura et al., 1998). Jedoch konzentriert sich auch bei diesen die Expression auf die invasive Front des Malignoms, wo nicht nur die Matrix lysiert wird, sondern dadurch auch Wachstums- und Angiogenesefaktoren frei werden, die zuvor in der Extrazellulärmatrix gebunden waren (Kerkelä et al., 2003). Diese Interaktion zwischen Tumorgewebe und dem Mikromillieu hebt die Bedeutung von MMP-9 für das maligne Verhalten eines Tumors hervor.

Die EZM-MMP Interaktionen sind sehr komplex. Ein Beispiel hierfür bietet die Tatsache, dass die EZM als Reservoir für unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine dient. So bindet das EZM-Protein Decorin TGF- β , was nach dessen Abbau durch z.B. MMP-2 und -3 frei wird und seine biologische Funktion ausüben kann. Interessanterweise ist eine der Funktionen die Unterdrückung der Expression von MMP-Genen, so dass hier ein negativer-Feedback

Mechanismus zu Tragen kommt (Imai et al, 1997). Einen Überblick über die bekannten MMP's und ihre Substrate bietet die u.g. Tabelle 3.

MMP	Enzym, Synonme	Molekulargewicht Inaktive/aktive Form	Kollagen-Substrat	weitere Substrate
MMP-1	Kollagenase-1, Fibroblast Kollagenase	55 kDa/45kDa	I, II, III, VII, VIII, X	A, G, MMP-2, MMP-9
MMP-2	Gelatinase A, Type IV Kollagenase	72 kDa/66 kDa	I, II, III, IV, V, VII, X, XI	A, G, E, F, L, MMP-9, MMP-13
MMP-3	Prokollagenase, Stromelysin-1	57 kDa/ 45 kDa	II, III, IV, IX, X, XI	A, G, E, F, L, MMP-7, MMP-8, MMP-13
MMP-7	Matrilysin	28 kDa/19 kDa	IV, X	A, G, E, F, L, MMP-1, MMP-2, MMP-9
MMP-8	Kollagenase-2	75 kDa/58 kDa	I, II, III, V, VII, VIII, X	A, G, E, F, L
MMP-9	Gelatinase B, Type IV Kollagenase	92 kDa/86 kDa	IV, V, VII, X, XIV	A, G, E, F
MMP-10	Stromelysin-2	57 kDa/44 kDa	III, IV, V	A, G, E, F
MMP-11	Stromelysin-3	51 kDa/44 kDa		A, F, L
MMP-12	Makrophagen Metalloelastase	54 kDa/45 kDa und 22 kDa	IV	G, E, F, L
MMP-13	Kollagenase-3	60 kDa/48 kDa	I, II, III, IV	A, G
MMP-14	MT1-MMP, MT-Metalloproteinase-14	66 kDa/56 kDa	I, II, III	A, G, E, F, L, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT2-MMP, MT-Metalloproteinase-15	72 kDa/60 kDa		G, F, L, MMP-2
MMP-16	MT3-MMP, MT-Metalloproteinase-16	64 kDa/52 kDa		MMP-2
MMP-17,	MT4-MMP, MT-Metalloproteinase-17	57 kDa/53 kDa		
MMP-18	Kollagenase-4	70 kDa/53 kDa		
MMP-19	RASI-1	54 kDa/45 kDa		
MMP-20	Enamelysin	54 kDa/22 kDa		Amelogenin
MMP-21	XMMP (Xenopus laevis)			
MMP-22	CMMP (chicken)			

MMP	Enzym, Synonyme	Molekulargewicht	Kollagen-Substrat	weitere Substrate
		Inaktive/aktive Form		
MMP-23				
MMP-24	MT5-MMP, MT- Metalloproteinase-24			
MMP-25	MT6-MMP, MT-Metalloproteinase-25			
MMP-26	Endometase, Matrilysin-2			
MMP-27				
MMP-28	Epilysin			

Tabelle 3: MMP's und ihre Substrate; MT = Membran type, RASI = rheumatoide Arthritis-assozierte Autoantigen, A = Aggrecan, G = Gelatin, E = Elastin, F = Fibronectin, L = Laminin

A.1.3.1. Struktur der MMP's

MMP's sind durch zwei Zink-Ionen und zwei bis drei Kalzium-Ionen zur Stabilisierung im katalytischen Zentrum charakterisiert. Weiterhin enthalten sie eine N-terminale Signalsequenz, die Prä-Domäne, die nach der Synthese abgespalten wird (s. Abbildung 3). Außer Stromelysin-3 (MMP-11) und den membranständigen MMP's, die im Golgi-Apparat der Zelle aktiviert werden, werden alle übrigen MMP's als Zymogene sezerniert und im Extrazellularraum durch Abspaltung der Pro-Domäne aktiviert (Kähäri et al., 1997; Shapiro, 1998; Woessner, 1998; Murphy et al., 1997). Die Abspaltung der Pro-Domäne führt zu einer Veränderung der Konformation und legt so die katalytische Domäne mit dem aktiven Zentrum frei (Nagase et al., 1999). Die Spezifität wird weniger über die katalytische Domäne selbst gewährleistet, die eine starke Homologie zwischen den einzelnen MMP-Subtypen aufweist, sondern eher durch die große Bindungsstelle am Carboxy-Terminus der Enzyme (Woessner, 1998). Bei allen MMP's, bis auf MMP-7 (= Matrilysin, dem kleinsten MMP), MMP-23 und MMP-26 gibt es eine sog. Haemopexin/Vitronectin-ähnliche C-terminale Domäne, die für die jeweilige Substratspezifität verantwortlich ist (Allan et al., 1991; DeClerck et al., 1993; Baragi et al., 1994). Die MMP's binden also schon in ihrer nicht aktiven Form an Proteine der EZM und werden erst durch Abspaltung der Pro-Domäne aktiv. So ist eine rasche Aktivierung der

MMP's sichergestellt. Die aktivierten MMP's können dann diffus im gesamten Extrazellularraum enzymatisch wirksam werden. Ein kleinerer Teil der MMP's liegt membrangebunden vor (MT-MMP's). Diese sind an einer lokalen Degradation von Matrixproteinen oder in Zusammenarbeit mit sezernierten MMP's an einer Tumorzellbewegung in Einzelzellbewegungen und Zellkohortenbewegungen beteiligt (Nabeshima et al., 1999 und 2000; Legrand et al., 1999).

Gelatinasen (z.B. MMP-2 und MMP-9) enthalten zusätzlich 3 Fibronectin-ähnliche Domänen in der katalytischen Domäne, die die Bindung an Gelatin ermöglichen.

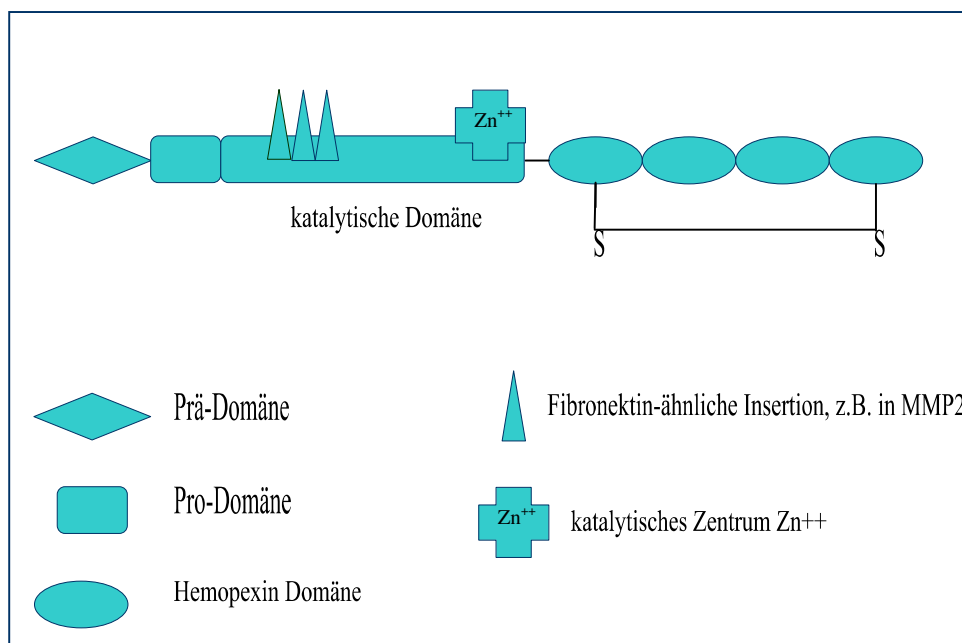


Abbildung 3. Struktur der MMP's

A.1.3.2. Aktivierung und Inhibierung der MMP`s

Aktivierung der MMP`s

Eine Aktivierung der MMP`s erfolgt, wie bereits in Kapitel A 1.3.1. beschrieben, durch enzymatische Abspaltung der Pro-Domäne vom Zymogen. Hierbei sind uPA und PAI-1 als Co-Aktivatoren von vielen MMP`s bekannt (Nagase, 1997; Vassalli et al., 1991). Außerdem aktiviert Plasmin bestimmte Prometalloproteinasen (He et al., 1989; Mazzieri et al., 1997; Murphy and Docherty, 1992; Werb et al., 1977). So ist bekannt, dass die proteolytische Aktivierung von MMP-1 hauptsächlich durch Plasmin erfolgt.

Desweiteren sind Aktivierungskaskaden der MMP`s untereinander möglich, so kann z.B. MMP-9 durch MMP-13, dieses wiederum durch MT1-MMP aktiviert werden (Johansson et al., 1997; Murphy et al., 1997).

Endogene Inhibition der MMP`s

Die Inaktivierung der MMP`s erfolgt zum einen durch Autokatalyse in kleinere und damit nicht mehr aktive Proteinefragmente.

Zum anderen wird die Aktivität durch TIMP`s (= tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) kontrolliert (Greene et al., 1996). Es konnten bislang vier verschiedene TIMP`s (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4) identifiziert werden. Die spezifische Inhibition der MMP`s erfolgt durch eine N-terminale Domäne der TIMP`s, die mit der zink-bindenden Region der MMP`s interagiert und dadurch zu einer direkten (reversiblen) Hemmung der MMP-Aktivität führt (Sternlicht & Werb, 2001). So kann TIMP-1 beispielsweise MMP-1 und MMP-3 inaktivieren und TIMP-4 inhibiert MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 (Kleiner et al., 1993; Stetler-Stevenson et al., 1990; Woessner, 1991).

TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4 werden in löslicher Form sezerniert und TIMP-3 kommt an die EZM gebunden vor (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1999). Dabei werden TIMP`s im Rahmen

der tumorinduzierten Gewebereaktion während des Invasionsprozesses von Fibroblasten in dem tumorumgebenden Stroma gebildet (Heppner et al., 1996).

Hierbei sei der Vollständigkeit halber erwähnt, dass TIMP`s abhängig von der Gewebekonzentration neben ihrer inhibitorischen Rolle auch eine stimulierende Funktion auf MMP`s ausüben können. So konnte z.B. gezeigt werden, dass TIMP-1 Fibroblasten zur Produktion von MMP-1 stimulieren kann (Clark et al., 1994) und TIMP-2 ist in die Aktivierung von MMP-2 involviert (Murphy et al., 1997).

Gomez et al. wiesen eine positive Korrelation zwischen TIMP-und MMP-Expression und schlechter Prognose maligner Erkrankungen nach. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch die binodale Funktion der TIMP`s zustande kommen. Zum einen sind sie in der Lage MMP`s zu inaktivieren und zum anderen übernehmen sie eine Schlüsselrolle in einer Zelloberflächen-abhängigen MMP-Aktivierungskaskade (Gomez et al., 1997).

Somit ist die Rolle von TIMP`s in der Regulierung von MMP-Aktivität und Krebsprogression *in vivo* noch unklar.

Exogene MMP Inhibition

Die pharmakologische Inhibition der MMP-Expression wurde in vielen verschiedenen Studien untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass synthetisch hergestellte MMP-Inhibitoren die MMP-Aktivität der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 auf den Knochenabbau blockieren (Yoneda et al., 1999).

Synthetische MMP-Inhibitoren wie Hydroxyamate sind kleine ($M_r < 600$) Peptide, die dem fibrillären Kollagen ähnlich sind. Sie interagieren mit dem Zink-Ion in der katalytischen Domäne der MMP`s und inhibieren ihre Aktivität. Somit hemmen sie die Tumorvergrößerung durch die Entwicklung einer „fibrotic capsule“ um den Tumor herum und durch Hemmung der Tumor-induzierten Angiogenese. Die hauptsächliche unerwünschte Nebenwirkung zeigt sich in Muskelschmerzen, welches durch Inhibierung der MMP`s, welche physiologische Umbauvorgänge des Normalgewebes in Sehnen und Gelenken bewirken, zustande kommt

(Brown, 1998). Batimastat wird gut toleriert, aber muss auf Grund der schlechten Wasser-Löslichkeit intraperitoneal verabreicht werden (Rasmussen et al., 1997). Marimastat ist wasserlöslich und kann per os gegeben werden. Beides sind Breitspektrum-Hydroxymate MMP-Inhibitoren. Nicht nur auf Grund der genannten Nebenwirkungen ist es ein Ziel, selektive Inhibitoren gegen bestimmte MMP`s zu entwickeln. Bestimmte MMP`s (MMP-3, -7, -9 und -12) hemmen die Angiogenese durch Bildung von Angiostatin aus Plasminogen und somit wäre deren Ausschaltung nicht erwünscht. Spezifische MMP-Inhibitoren gegen Kollagenasen oder Gelatinasen sind bereits entwickelt, aber die näheren Untersuchungen zeigten, dass MMP-Inhibitoren mit ähnlichem Inhibitionsprofil *in vitro*, völlig entgegengesetzte Effekte auf Tumorwachstum und Metastasierung *in vivo* haben können (Brown, 1998).

A.1.3.3. Regulation der MMP`s

Die Regulation der MMP`s erfolgt wie bereits in Kapitel A 1.3.2. beschrieben auf Proteinebene durch Aktivatoren (Serinproteasen oder MMP`s untereinander) und Inhibitoren (z.B. TIMP`s). Daneben konnten Faktoren identifiziert werden, die von Tumorzellen produziert werden und zu einer erhöhten Expression verschiedener MMP`s in Stromazellen führen. Einer dieser Faktoren, EMMPRIN, wurde in Kapitel 1.2.1. vorgestellt und kann die Expression von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 durch Fibroblasten induzieren (Guo et al., 1997; Nagase & Woessner, 1999; Biswas et al., 1995).

Desweiteren wird die Expression von MMP`s in Tumorzellen auf Transkriptionsebene reguliert. So ist die basale Expression von verschiedenen MMP`s (1, 3, 7, 9, 10, 12 und 13) in Zellkulturen niedrig und ihre Transkription kann durch extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Zytokine und Wachstumsfaktoren angeregt werden (Birkedal-Hansen et al., 1993; Kähäri & Saarialho-Kere, 1997; Shapiro, 1998; Woessner, 1998; Vincenti et al., 1996; Benbow & Brinckerhoff, 1997).

-
- 1. Transkription der MMP-Gene**
 - 2. Sekretion synthetisierter MMP`s**
 - 3. Aktivierung inaktiver Proformen**
 - 4. Inhibition aktiver MMP`s (z.B. durch TIMP`s)**
 - 5. Degradation aktiver Enzyme**
-

Tabelle 4. Regulationsebenen der MMP-Aktivität.

In einigen Untersuchungen ist bereits eine Regulation der MMP-Gen-Expression durch AP-1-Faktoren beschrieben worden. So ist ein AP-1-Element in der Promoter-Region (etwa an der Stelle -70) jedes induzierbaren MMP-Genes bekannt (Fini et al., 1998; Crawford & Matrisian, 1996). Dieses Element ist in der Lage Mitglieder der AP-1-Faktoren als Jun/Jun Homodimere oder Jun/Fos Heterodimere zu binden und somit verschiedene regulierende Aufgaben zu verantworten. Westermarck et al. konnten zeigen, dass das proximale AP-1-Element, welches sich zwischen -72 und -66 befindet, eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Regulation der MMP-1 Genexpression übernimmt. Mutationen an dieser Stelle reduzieren die basale Sekretion von MMP-1 und das Ansprechen des MMP-1-Promoters auf externe Stimuli (Lee et al., 1996; Doyle et al., 1997; Westermarck et al., 1997, Crawford & Matrisian, 1996). So zeigten Benbow et al., dass die Bindung von Fos und Jun als AP-1-Dimer an die Promoter-Region von Kaninchen-MMP-1 den Effekt von Phorbol ester vermittelt (Benbow et al., 1997). Am MMP-9-Promoter sind ebenfalls TRE-Elemente bekannt, welche AP-1-Bindungsstellen enthalten (Sato et al., 1993) (s. Abbildung 4).

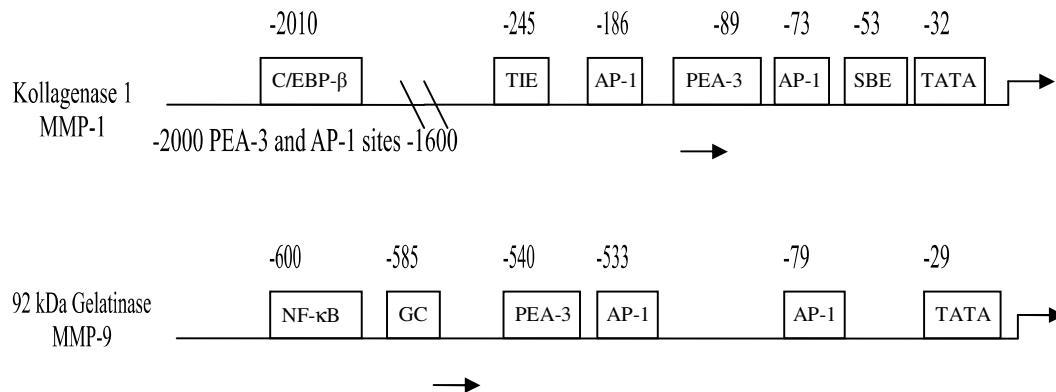


Abbildung 4. Regulierende Elemente an der Promoter Region in humanen MMP-Genen modifiziert nach Benbow and Brinckerhoff (1997). Die Boxen beinhalten folgende cis-Elemente: AP-1=activating protein-1; PEA3=polyoma enhancer A binding protein-3; TIE=TGF- β inhibitory element; GC=Sp-1 binding site; SBE=STAT binding element; C/EBP- β =CCAAT/enhancer binding protein- β ; NF- κ B=nuclear factor- κ B

Auch extrazelluläre Signale (wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Stress, UV-Licht und onkogene Transformation) aktivieren den nukleären AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplex, welcher aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Proteinfamilie besteht. Diese binden an die AP-1-Bindungsstelle und aktivieren die Transkription der jeweiligen MMP-Gene. Dem MMP-2-Promoter fehlt diese AP-1-Bindungsstelle (Huhtala et al., 1990). TGF- β und Glukokortikoide scheinen eine supprimierende Wirkung auszuüben (Nagase & Woessner, 1999).

Die Signalvermittlung von den Zellmembran-Rezeptoren, induziert durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone und Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, erfolgt durch die Phosphorylierung durch *GTP*- und *MAP*-Kinase-(mitogen activated protein kinases) assoziierte Signalwege (Minden et al., 1997; Robinson et al., 1997; Lewis et al., 1998; Korzus et al., 1997). Sie regulieren die Fähigkeit von AP-1-Transkriptionsfaktoren an DNA zu binden, so wie die Transaktivierungskapazität.

So benutzen vor allem inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α *MAPK*-Signaltransduktionswege wie *ERK* (extracellular signal regulated), *SAPK* (stress-activated

protein kinase)/*JNK* (Jun N-terminale Kinase) und *p38*, um die Expression von MMP-1 und MMP-2 zu verstärken (Reunanen et al., 1998). Diese unterschiedlichen Signaltransduktionswege führen letztendlich zu Transkriptionsfaktoren wie *p53*, *NF- κ B*, *jun* und *fos* bzw. *AP-1* (Heterodimer aus *jun* und *fos*), die sich im Zellkern an die entsprechenden Promoter der MMP-Gene binden und so diese induzieren (Sternlicht & Werb, 2001).

UV-Licht führt über die stressaktivierte Janus Proteinkinase *JNK* ebenso zur verstärkten Induktion von MMP-1 und MMP-3 in dermalen Fibroblasten (Reunanen et al., 1998).

Ein weiteres wichtiges cis-Element, welches in dieser Arbeit nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden soll, ist die Polyomavirus enhancer A (= PEA3) Bindungsstelle.

PEA3-Elemente, welche ETS-Transkriptionsfaktoren binden, sind in allen induzierbaren MMP-Promotern entdeckt worden, mit Ausnahme des MMP-12-Promoters. Sie sind angrenzend an das kleinste AP-1-Element lokalisiert (s. Abbildung 4). ETS-Proteine bilden gewöhnlicherweise keine Dimere und binden nicht alleine an DNA, sondern ziehen es vor Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren, z.B. AP-1-Faktoren zu bilden, für die sie Koaktivatoren bilden (Sharrocks et al., 1997; Carrere et al., 1998). Die Expression von ETS-1 und verschiedenen MMP's ist örtlich in Stroma-Fibroblasten angrenzend an den invasiven Rand von verschiedenen Tumoren lokalisierbar (Bolon et al., 1995 und 1996; Wernert et al., 1994). ETS-1 Expression ist außerdem beschrieben während der Tumervaskularisation (Wernert et al., 1992). Die Aktivität der ETS-Transkriptionsfaktoren wird auch durch ERK-1, -2, JNK/SAPK und p38 Wege reguliert (Robinson et al., 1997; Lewis et al., 1998; Leppa et al., 1998).

Diese hochspezifischen Signaltransduktionskaskaden erlauben durch Amplifikation, Feedback, Crosstalk und Abzweigen/Ausbreiten der initialen Signale eine präzise Regulierung der Genexpression in Situationen wie der Tumorzellinvasion.

A 1.3.4. Rolle der MMP`s in der Tumorbiologie

Die Tumorinvasion verläuft in mehreren Schritten, in denen Zellmotilität und Proteolyse unter Einwirkung des umgebenden Stromas eng miteinander verbunden sind. So werden MMP`s nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von Fibroblasten und inflammatorischen Zellen gebildet und sezerniert. Die Expression der MMP`s zeigt ihr größtes Ausmass an der Tumorfront, dem Ort zwischen Tumor und Bindegewebe mit aktiver Tumorinvasion (Nakanishi et al., 2000) und Degradation der EZM (Basset et al., 1997; Johnson et al., 1998; Heppner et al., 1996; Johansson et al., 1999). Für die erhöhte Motilität der Tumorzellen beim Invasionsprozess und für die Grössenzunahme der Mikrometastasen (Koop et al., 1994, Chambers et al., 1997) ist eine erhöhte MMP-Aktivität erforderlich. Ausserdem scheinen MMP`s bei der Angiogenese und bei der Intra- und Extravasation von Tumorzellen eine wichtige Rolle zu spielen (Kim et al., 1998).

Bergers et al. zeigten wie MMP-9 in Pankreasinseldtumor die Bildung von Gefässen durch Freisetzung von VEGF bewirken kann (Bergers et al., 2000). Dennoch ist die Situation auch hinsichtlich der Neubildung von Gefässen durch Malignome im Zusammenhang mit MMP`s nicht eindeutig. So fördern MMP-2, MMP-7, MMP-9 und MMP-12 die Konversion von Plasminogen in Angiostatin (Patterson et al., 1997; Lijnen et al., 1998; Dong et al., 1997). Andere MMP`s generieren Endostatin. Angiostatin und Endostatin sind potente Inhibitoren der Gefässneubildung (Cornelius et al., 1998), so dass hier eine Angiogenese-limitierende Funktion der MMP`s erkennbar wird.

Beeindruckende Beweise für die Beteiligung der MMP`s an der Tumorinvasion lieferten Nabeshima et al., 2000. Ausgehend von der Entdeckung der perizellulären fibrinolytischen Aktivität der zellmembranständigen Membran-Typ-MMP (MT-MMP) (Sato et al., 1994; Hiraoka et al., 1998), konnte diese Arbeitsgruppe den Beweis führen, dass MMP`s an der Tumorzellinvasion beteiligt sind und dieser Prozess durch den synthetischen MMP-Inhibitor Batimastat gehemmt werden kann. Nabeshima et al. beschrieben die Tumorzellbewegung in Einzelzellbewegungen (single cell locomotion) und Zellkohortenbewegungen (cohort

migration) unter dem Einfluss zellmembranständiger MT-MMP`s und sezernierter MMP`s (Nabeshima et al., 1999).

In den Untersuchungen zur Funktion der MMP`s bei der Zellbewegung ließ sich auch eine dichotome Eigenschaft der MMP`s zeigen. Außer den bekannten Eigenschaften der MMP`s wie Ab-, Um- und Aufbau der EZM ließ sich eine "Pfadfinder"-Funktion nachweisen, die den Weg eines Tumorzellverbandes im Gewebe steuert. Diese "Pfadfinder"-Funktion der MMP`s lässt sich nicht nur bei Tumorzellen, sondern auch bei der physiologischen Migration von Zellen des Alveolar- und Bronchialsystems nachweisen (Nabeshima et al., 1999 und 2000; Legrand et al., 1999).

Die MMP`s haben nicht nur die Funktion von Wegbereitern für die malignen Zellen, sondern können auch aktiv in deren Differenzierung eingreifen. So haben Sternlicht et al. nachgewiesen, dass MMP-3 zu phänotypischen Änderungen im Brustgewebe von transgenen Mäusen führt, was in einem aggressiveren Verhalten der Tumorzellen resultiert. Diese Änderung kann aber durch eine gleichzeitige Expression von TIMP-1 verhindert werden (Sternlicht et al., 1999). Diese Ergebnisse wurden auch in anderen Studien mit transgenen Mäusen bestätigt. Es wurde herausgefunden, dass MMP-überproduzierende Mäuse spontan Geschwülste entwickelten. Im Gegenzug weisen Mäuse, die MMP-2 nicht exprimieren ein abgeschwächtes Tumorwachstum und Angiogenese auf (Itoh et al., 1998). Weiterhin zeigte sich bei Mäusen, denen MMP-7 fehlte eine Reduktion von intestinaler Tumorgenese (Wilson et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse liefern auch Versuchstiere mit einer Überexpression von TIMP. Die verschiedenen Studien führen zu der These, dass MMP`s nicht nur aufgrund ihrer EZM-abbauenden Aktivität die Tumorinvasion begünstigen, sondern selbst tumorauslösende intrinsische Wirkungen haben.

Aufgrund ihrer komplexen Expressionsmuster und Regulationsmechanismen können MMP`s bisher nicht (wie uPA) als Prognosefaktoren eingesetzt werden.

A 1.4 Das Plasminogenaktivator-System

Das Plasminogenaktivator-System besteht aus den Komponenten Plasmin, seinen Aktivatoren uPA (urokinase-type plasminogen activator, benannt nach dem Urintrakt als erstem Nachweisort) und tPA (tissue plasminogen activator = Gewebeaktivator von Plasminogen), sowie dem zellulären Rezeptor (uPAR=CD87) und den Inhibitoren PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) und PAI-2 (plasminogen activator inhibitor-2) (Irigoyen et al., 1999; Vassalli et al., 1991; Andreasen et al., 1997 und 2000; Schmitt et al., 1997 und 2000; Reuning et al., 1998).

Das Plasminogenaktivator-System ist vor allem aus der Blutgerinnungskaskade und dabei speziell aus der Fibrinolyse bekannt. Hier baut Plasmin Fibrin im vaskulären System ab. Das hauptsächlich in der Leber produzierte inaktive Zymogen Plasminogen (Raum et al., 1980) wird durch die von Endothelzellen produzierte Serinprotease tPA zum funktionellen Enzym Plasmin abgebaut, das letztendlich Fibrin in verschiedene Fibrinabbauprodukte, wie z.B. in die diagnostisch gebrauchten D-Dimere zersetzt (Chandler et al., 2000). Dieser katabolische Schenkel der Fibrinolyse hat zur Erhaltung der Homöostase einen Gegenpart, der vor allem von α_2 -Antiplasmin und den Serpinen (Serinprotease-Inhibitoren) PAI-1 und PAI-2 gebildet wird.

Während tPA eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse einnimmt, induziert uPA die Plasminogenaktivierung im Gewebe, was zur Einbeziehung des Plasmins in die Umbauvorgänge der EZM während physiologischer und pathologischer Prozesse führt.

So konnte bei verschiedenen Tumoren wie z.B. in Hirn, Brust, Magen, Dickdarm deutlich erhöhte Expression der Komponenten des proteolytischen Plasminogenaktivator-System und eine positive Korrelation mit deren Tumormalignität entdeckt werden (Arai et al., 1998; Baker et al., 2000; Dublin et al., 2000).

A 1.4.1. Der Urokinase-Plasminogenaktivator

Der Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) ist ein glykosyliertes, **52 kDa** großes Protein und wurde ursprünglich aus Urin isoliert (Williams, 1951). uPA zählt zu den Serinproteinasen und wird als einkettiges Proenzym sc-uPA (single chain-uPA) u.a. von Nierentubulizellen, Fibroblasten und Tumorzellen sezerniert (Danø et al., 1985; Schmitt et al., 1992). Dies besitzt nur beschränkte proteolytische Eigenschaften, die etwa 250mal geringer sind als die von uPA (Petersen et al., 1988). Im Plasma wird uPA nur in der einkettigen, inaktiven Form gefunden und aktivierter uPA wird schnell durch im Überfluß vorhandenen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) abgefangen.

uPA ist aus drei funktionellen Domänen aufgebaut:

- Die *growth factor-like domain* (GFD) ist 6 kDa (AS 1-48) groß und enthält die uPAR-Bindungsregion (uPA-Rezeptor-Bindungsregion), welche von Aminosäure 19 bis 31 reicht (Magdolen et al., 1996).
- Die zweite Domäne ist die sogenannte Kringeldomäne (AS 49-131), welche Homologien zu den Kringeldomänen von Prothrombin und Plasmin(ogen) aufweist.
- Die katalytische (dritte) Domäne, stellt eine typische Serinproteinase-Domäne mit den Aminosäuren der katalytischen Triade dar (His 204; Asp 255 und Ser 356).

Durch die Spaltung der Bindung Lys 158–Ile 159, z.B. durch Plasmin, Trypsin, Kallikrein, Kathepsin B oder Kathepsin L entsteht aus dem einkettigen pro-uPA der zweikettige, enzymatisch aktive HMW-uPA (*high molecular weight-uPA*) (Kobayashi et al., 1991; Goretzki et al., 1992; Andreasen et al., 1997). HMW-uPA setzt sich aus der sogenannten A- und der B-Kette zusammen, welche durch eine Disulfidbrücke (Cys 148–Cys 279) miteinander verknüpft sind. Die A-Kette besteht aus der GFD- und Kringel-, die B-Kette aus der Serinproteinase-Domäne. Durch Spaltung von HMW-uPA zwischen Lys 135–Lys 136 entsteht zum Einen das sogenannte aminoternale Fragment (ATF) und zum Anderen der

low molecular weight-uPA (LMW-uPA), der nicht mehr an uPAR binden kann, da die uPAR-Bindungsstelle im Bereich des ATF liegt (Appella & Blasi, 1990; Magdolen et al., 1996).

LMW-uPA beinhaltet die Serinproteinase-Domäne, d.h. sie kann Plasminogen zu Plasmin aktivieren (Appella & Blasi, 1990). Plasmin selbst kann dann direkt EZM-Bestandteile lysieren, z.B. Fibronectin und Laminin (Werb et al., 1980) oder weitere Kollagenasen und Wachstumsfaktoren aktivieren (Reuning et al., 1998) und gilt zusammen mit uPA als stärkster Aktivator von Matrixmetalloproteinasen (MMP`s) (Nagase, 1997; Vassalli et al., 1991; He et al., 1989; Mazzieri et al., 1997; Murphy & Docherty, 1992; Werb et al., 1977), wobei durch Abspaltung einer Peptidkette das Proenzym der MMP`s in die aktive Form überführt wird (Inuzuka et al., 2000; Mazzieri et al., 1997). Untersuchungen der Plasminogenaktivierung über einzelne Faktoren des fibrinolytischen Systems zeigen, dass die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen mit der Plasminogenaktivierungskaskade stark assoziiert ist (Chapman, 1997).

A.1.4.2. Der Urokinase-Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPAR)

Der uPA-Rezeptor (uPAR) ist ein 55 kDa-Protein, das mit dem aminoterminalen Ende an die A-Kette von uPA bindet und auch pro-uPA binden kann (Vassalli et al., 1985; Ellis & Dano, 1992). Zusätzlich zur uPA-Bindungsstelle besitzt uPAR eine weitere Bindungsstelle mit hoher Affinität ($K_d < 30$ nM) zu Vitronectin (Wei et al., 1994; Høyer-Hansen et al., 1997), einer Komponente der extrazellulären Matrix (Deng et al., 1994; Waltz et al., 1994; Kanse et al., 1996).

A.1.4.2.1. Proteolytische Funktion des Plasminogenaktivator-Systems

Nach Bindung an uPAR wird uPA proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert (Petersen et al., 1988). Dieses führt zu einer bis zu 40-fach gesteigerten Plasminogenaktivierung (Lee et al., 1994; Ellis et al., 1991).

Anders als die meisten Plasmamembran-Rezeptoren ist uPAR nach Bindung mit dem Liganden nicht phosphoryliert, der uPA/uPAR-Komplex wird nicht internalisiert und es folgt auch keine Rezeptor-Down-Regulation.

Erst die Bindung von Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) an den uPA/uPAR-Komplex führt zu einer Internalisierung des ternären Komplexes in die Zelle (Nykjaer et al., 1992 und 1997; Conese et al., 1995; Cubellis et al., 1990; Estreicher et al., 1990). Hier werden dann uPA und PAI-1 von uPAR abgetrennt und degradiert. Der uPAR wird größtenteils wieder an die Zelloberfläche gebracht („*recycling*“), wo er erneut pro-uPA binden kann (Cubellis et al., 1990; Nykjaer et al., 1997; Herz et al., 1992; Andreasen et al., 1994). Dieser Prozess dient möglicherweise der Regulation des Plasminogenaktivator-Systems, da z.B. uPAR an einer anderen als der Internalisierungsstelle wieder an die Zelloberfläche gebracht werden kann, und es so zu einer Fokussierung der proteolytischen Aktivität kommen kann (Andreasen et al., 2000). Dieses bestätigen auch Lokalisierungs- und Expressions-Studien, welche ergaben, dass uPAR in erster Linie von den Tumorzellen, uPA allerdings nur von den Tumorzellen an der Invasionsfront und von den Stromazellen gebildet werden. Die gleichzeitige Expression von uPA und seinem Rezeptor uPAR korreliert streng mit gesteigerter Invasivität der Tumorzellen (Wu et al., 2002).

Bindet der Plasminogenaktivator-Inhibitor-2 (PAI-2) an einen uPA/uPAR-Komplex, so wird dieser nicht internalisiert. uPA wird dabei in zwei Teile gespalten und dadurch inaktiviert (Ragno et al., 1995).

A.1.4.2.2. Nicht-proteolytische Funktion des Plasminogenaktivator-Systems

Neben seiner Funktion bei der fokalen Proteolyse konnte die Beteiligung des uPAR während der gerichteten zellulären Migration beobachtet werden. Hierbei ist ein Wechsel von perizellulärer Proteolyse und anschließender Adhäsion von Zellen notwendig. Die Bindung von Zellen an Komponenten der EZM (z.B. Vitronektin) wird durch uPAR, PAI-1 und zelloberflächenassoziierte Adhäsionsrezeptoren der Integrinfamilie beeinflusst. uPAR besitzt zusätzlich zur uPA-Bindungsstelle eine mit hoher Affinität ($K_d < 30$ nM) zu Vitronektin (Wei et al., 1994; Høyer-Hansen et al., 1997), einer Komponente der extrazellulären Matrix (s.

Abbildung 5a) (Deng et al., 1994; Waltz et al., 1994; Kanse et al., 1996). Bindet uPA an uPAR, wird die Bindung des uPAR an Vitronektin verstärkt (s. Abbildung 5b). Vitronektin steigert die Zellmigration und der spezifische Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist verantwortlich für die Zellmotilität (s. Abbildung 5c). Bei der Interaktion von uPAR mit Vitronektin konkurrieren uPAR und PAI-1 um dieselbe Bindungsstelle an der zentralen Region des N-terminalen Endes der sogenannten Somatomedin B-Domäne des Vitronektins und können somit die Interaktion von Vitronektin mit Integrinen unterbinden (Deng et al., 1994 und 1996; Steffanson and Lawrence, 1996; Kanse et al., 1996; Sidenius et al., 2000; Preissner et al., 1999). PAI-1 konkurriert mit uPAR um die Bindung an Vitronektin und lockert so die uPA/uPAR/Vitronektin-Bindung und ermöglicht somit die Reduktion von uPAR-vermittelter Adhäsion auf Vitronektin. Allerdings verliert PAI-1 durch die Bindung an uPA ihre Affinität an Vitronektin zu binden und somit ist wieder eine Zelladhäsion und Migration der Tumorzelle möglich (s. Abbildung 5d).

Der uPAR/ $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Gehalt einer Tumorzelle einerseits und der PAI-1-Gehalt andererseits scheinen für eine kontrollierte Loslösung bzw. Anheftung der Zelle an die extrazelluläre Matrix verantwortlich zu sein (Loskutoff et al., 1999; Ossowski et al., 2000). Jegliche mengenmäßige Veränderung dieser Komponenten zueinander führt zu einer Änderung des adhäsiven, migrativen und invasiven Verhaltens der Karzinomzelle. Daher ist die Zellausbreitung und Migration in einer vitronektinreichen EZM abhängig von der relativen Menge an PAI-1 und uPA:

1. Überschuss an uPA gegenüber PAI-1 fördert die Adhäsionsfähigkeit der Zelle (s. Abbildung 5e).
2. Überschuss an PAI-1 gegenüber uPA inhibiert die Integrin-Bindung und blockiert die uPAR-vermittelte Zelladhäsion an Vitronektin und fördert die Loslösung der Zelle (s. Abbildung 5 d).

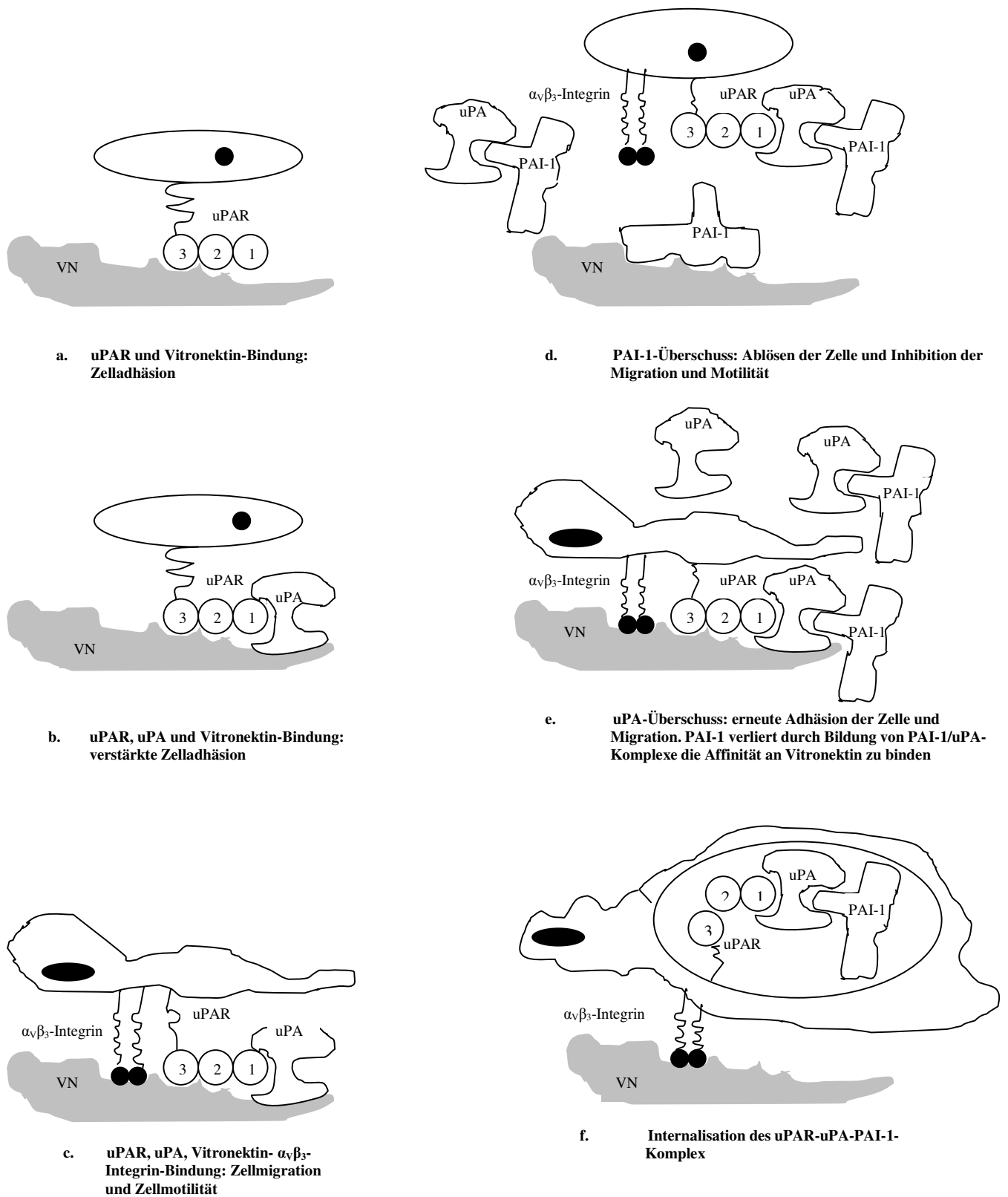


Abbildung 5. a.-f. Interaktion zwischen Tumorzelle, uPAR, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Vitronektin (=VN), uPA und PAI-1

A.1.4.2.3. Induktion der AP-1-Expression durch uPA-uPAR Bindung

Untersuchungen konnten zeigen, dass der uPA-Rezeptor nicht nur für die Aktivierung von uPA und die Migrationsrichtung eine wesentliche Rolle spielt, sondern auch in eine komplexe Signaltransduktionskaskade eingebunden ist (Dumler et al., 1994 und 1998; Bohuslav et al., 1995; Resnati et al., 1996; Wang, 2001). Obwohl uPAR keine intrazelluläre Domäne besitzt und somit das Signal über Adaptorproteine in die Zelle gelangen muss (Dumler et al., 1993; 1994 und 1999), kommt es zur Aktivierung von Serin-Kinasen, Fokal-Adhäsion-Kinasen, Tyrosinkinasen und Janus-Kinasen und u.a. zur Regulation der Transkription bestimmter Gene. Vor diesem Hintergrund wurde berichtet, dass z.B. in Ovarialkarzinomzellen die Bindung von uPA an uPAR zur Induktion der Expression von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-fos führt (Dumler et al., 1994). Weiterhin beobachteten Konakova et al., dass in der humanen HT1080 Fibrosarkom-Zelllinie die uPA-Wirkung über p38 und ERK-2 vermittelt wird, welche letztendlich zu einer Zunahme der c-fos Genexpression führte (Konakova et al., 1998). Diese Erkenntnisse erzeugten die Hypothese, dass die Bindung von uPA an uPAR zu einer Induktion der AP-1-Aktivität führen kann.

A.1.4.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI's)

Drei Inhibitoren von uPA konnten identifiziert werden: PAI-1, PAI-2 und die Protease Nexin. Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und -2 bilden äquimolare, stabile Komplexe mit uPA. Sie gehören zur Klasse der Serpine (**Serin-Proteinase-Inhibitoren**).

PAI-1 ist ein glykosyliertes einkettiges Protein (52 kDa), welches von Blutplättchen, Endothelzellen, Tumorzellen und Zellen des Tumorstromas exprimiert wird (Erickson et al., 1984 und 1985; Kruithof et al., 1986). PAI-1 unterscheidet sich von allen anderen Serpinen dadurch, dass es nur eine sehr kurze Halbwertszeit von etwa 2 h aufweist, und dabei von einer aktiven in eine latente, inaktive Form übergeht (Erickson et al., 1985; Pannekoek et al., 1986). Es ist ein spezifischer Inhibitor des uPA. PAI-1 liegt im Plasma in seiner aktiven Form im

Vergleich zu den Aktivatoren in einem zweifachen molaren Überschuss vor, so dass unter physiologischen Bedingungen keine Aktivierung von Plasminogen zu erwarten ist.

Neben der Fähigkeit von PAI-1, freie Serinproteasen (uPA) zu binden und somit die proteolytische Aktivität zu hemmen, kann PAI-1 durch Bindung an den uPA/uPAR-Komplex die uPA-Aktivität inhibieren, da es anschliessend zur Internalisierung kommt und die uPA-Wirkung beendet wird. Die Internalisierung und die Beteiligung von PAI-1 in den schrittweisen Migrationsprozess sind bereits im vorausgegangenen Kapitel beschrieben. Die Fähigkeit von PAI-1, Zelladhäsion über Integrine zu inhibieren scheint unabhängig von der Funktion als Proteaseinhibitor zu sein.

PAI-2 besitzt ein Molekulargewicht von 60 kDa und ist zu 38 % mit PAI-1 identisch. PAI-2 ist unter physiologischen Bedingungen im Serum nicht nachweisbar, wird aber z.B. in der Schwangerschaft von Trophoblastzellen der Plazenta exprimiert (Kawano et al., 1968). Im Gegensatz zu PAI-1 ist das inhibitorische Potential ca. 15mal kleiner (Ellis et al., 1990).

A 1.4.4. Regulation von uPA

Vergleichbar mit der Aktivierung und Induktion der MMP-Gene ist eine Regulation des Urokinase-Plasminogenaktivators auf transkriptioneller Ebene bekannt und bereits in vielen experimentellen Arbeiten untersucht. Die uPA-Transkription wird über verschiedene Mechanismen gesteuert, wie zum Beispiel cAMP, Calcitonin, Wachstumsfaktoren (Epidermal-, Hepatozyten- (=HGF) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (=FGF-2)), Tumorpromoter, verschiedene onkogene Produkte, Retinoide, Glukokortikoide, usw. (Cirillo et al., 1999).

So konnte nach experimentellen Untersuchungen der Wachstumsfaktoren- und Phorbolsterabhängigen transkriptionellen Regulation im humanen uPA-Gen ein Enhancer-Komplex beschrieben werden, welcher eine 120 bp Region umfasst und 2 kb 5'-wärts des Transkriptionsbeginnes liegt (Nerlov et al., 1991 und 1992; Rørth et al., 1990; Verde et al., 1988).

Dieser uPA-Enhancer besteht aus einer ETS-Bindungsstelle (=EBS) und einer c-Jun-ATF-2 Bindungsstelle (5`-AP-1). Diese beiden angrenzenden Bindungsstellen sind stark voneinander abhängig und einzeln nicht induzierbar. Die Abhängigkeit der ETS-Proteine von AP-1-Faktoren wurde bereits im Kapitel A 1.3.3. beschrieben.

Ein zweites ETS-AP-1-Element liegt am 5`-Ende des uPA-Genes (-5,3 kb beim Menschen) und wirkt mit dem 3`ETS-AP-1-Element als Antwort auf die TPA- und FGF-2-Induktion zusammen (D'Orazio et al., 1997).

Am 3`-Ende des uPA-Promoters konnte eine weitere AP-1-Bindungsstelle nachgewiesen werden (uPA 3`-TRE). Die Wirkung zwischen diesen induzierbaren Elementen wird durch eine 74-bp Protein-bindende Domäne, dem „Cooperation mediator element“ (=COM) moduliert (Nerlov et al., 1992). COM interagiert mit vier verschiedenen nukleären Proteinen („urokinase enhancer factors 1-4“) (Berthelsen et al., 1996; De Cesare 1996 und 1997).

Während uPA-5`TRE und 3`TRE unabhängig als TRE`s reagieren können, zeigt die isolierte COM-Region keine transkriptionell-stimulierende Aktivität. Sie scheint eine reine strukturelle Funktion am uPA-Enhancer zu haben.

Neben der Regulation auf Transkriptionsebene kommt die **posttranskriptionale Kontrolle** der uPA-Enzymaktivität auf verschiedenen Stufen vor:

1. Proenzym-Aktivierung (vgl. Kapitel A 1.4.1.)
2. Interaktion mit uPAR, Zellmembran oder EZM-Bindungsstellen (vgl. Kapitel A 1.4.2.)
3. Inhibierung durch spezifische Gewebeinhibitoren (PAI 1 und 2) (vgl. Kapitel A 1.4.3.)

A 1.4.5. Regulation von PAI-1

Die Regulation von PAI-1 ist auf Transkriptionsebene durch AP-1-Proteine induzierbar (Olmen et al., 1999). Rinehart-Kim et al. untersuchten c-Jun-induzierbare Gene und konnten hierunter auch AP-1-Bindungsstellen am PAI-1-Promoter nachweisen. Weitere AP-1-Bindungsstellen konnten im Intron 3, Intron 7 und Intron 8 identifiziert werden (Rinehart-Kim et al., 2000).

A 1.4.6. Klinische Relevanz des Plasminogenaktivator-Systems

Ein erstmals 1976 beschriebener von Karzinomzellen gebildeter Plasminogenaktivator konnte als uPA identifiziert werden (Astedt and Holmberg, 1976). Seitdem wird die Schlüsselrolle von uPA zusehends evident. Das erhöhte Vorkommen steht in enger Verbindung mit einem invasiven und aggressiven Phänotyp von Tumoren (Schmitt et al., 1997; Reuning et al., 1998). Deshalb wurden der Gehalt der Serinprotease uPA, uPAR und der Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 in vielen soliden malignen Tumoren bestimmt und die prognostische Relevanz für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben der Patienten untersucht.

Duffy et al. zeigten bereits 1988, dass Patientinnen mit einer erhöhten uPA-Aktivität im Mammakarzinom ein signifikant kürzeres DFS-Intervall (=„disease-free survival“; rezidivfreie Überlebenszeit) aufwiesen als Patientinnen mit geringer uPA-Aktivität im Tumor.

1989 und 1990 stellten Jänicke et al. und Duffy et al. (1990) unabhängig voneinander fest, dass das uPA-Antigen ein statistisch signifikanter Prognosefaktor beim primären Mammakarzinom ist. Diese Ergebnisse wurden von vielen anderen Gruppen bestätigt (Spyratos et al., 1992; Foekens et al., 1992; Grøndahl-Hansen et al., 1993; Fernö et al., 1994).

1991 berichteten Jänicke und Kollegen, dass ein hoher PAI-1-Wert im Primärtumor ebenfalls mit einer schlechten Prognose beim Mammakarzinom korreliert. Andere Gruppen wie zum Beispiel Foekens et al. (1994), Duffy et al. (1996) und Kute et al. (1998) konnten dieses ebenfalls bestätigen. Die Studien ergaben, dass PAI-1 sowohl bei nodal-negativen als auch bei nodal-positiven Mammakarzinom-Patientinnen mit der Aggressivität der Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte. Bei den nodal-negativen Patientinnen war das PAI-1 ein nahezu gleich starker prognostischer Marker wie uPA. In dieser Subgruppe waren die Protease und ihr Inhibitor unabhängig voneinander von prognostischer Bedeutung (Jänicke et al., 1993). Die anfangs unerwartete Beobachtung, dass der hohe Tumorgehalt eines Proteaseinhibitors mit einer schlechten Prognose für die Patientinnen einherging, wurde im Verlauf durch die tumorbiologischen Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung immer verständlicher. So wurden zunehmend auch nicht-proteolytische Funktionen der Enzyme erkannt wie die Wirkung der einzelnen Komponenten des Proteinaseaktivator-Systems während des Adhäsions- und Migrationsvorganges.

Die Aufnahme sowohl der uPA- als auch der PAI-1-Messungen in den Routinepanel für prognostische Faktoren beim Mammakarzinom wurde von der EORTC-Rezeptor und Biomarker Study Group empfohlen (Blankenstein, 1997).

Hohe uPA- und PAI-1-Konzentrationen wurden auch in Zervix-, Blasen-, Nieren-, Magen-, Pankreas-, Kopf- und Hals- sowie Leber-Karzinomgewebe gleichbedeutend mit einer Progression der Tumorerkrankung und einer schlechteren Prognose für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben des Patienten nachgewiesen (Reuning et al., 1998; Schmalfeldt et al., 1995; Kuhn et al., 1999; Foekens et al., 1994; Schmitt et al., 1997 und 2000). Auch in Ovarialkarzinomen zeigten quantitative Untersuchungen der Komponenten des Plasminogenaktivator-Systems einen prognostischen Wert von uPA und PAI-1. Patientinnen mit erhöhten uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Ovarialkarzinomgewebe haben eine schlechtere Prognose für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben als Patientinnen mit niedrigen uPA- und PAI-1-Werten (Schmalfeldt et al., 1995; Kuhn et al., 1999; Tecimer et al., 2000).

A 1.5.1 Der AP-1-Komplex

Faktoren des “activating protein-1”(AP-1)-Komplexes sind als Onkogene zu betrachten, die in zwei Gruppen unterteilt werden können: die Jun-Faktoren c-Jun, Jun-B und Jun-D (Hirai et al., 1989; Ryder et al., 1988 und 1989) und die zur Fos-Familie gehörigen c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2 (Cohen & Curran, 1988; Zerial et al., 1989; Angel & Karin, 1991; Nishina et al., 1990).

Unter den AP-1-Faktoren enthalten die c-Fos- und FosB-Proteine eine C-terminale Transaktivierungsdomäne, welche Fra-1 und Fra-2 fehlt, so dass diesen Faktoren eine inhibitorische Funktion der AP-1-Aktivität zugesprochen wird (Wisdom et al., 1993).

Die Aktivität aller Fos-Faktoren wird posttranslational durch Phosphorylierung (z.B. durch MAPK, PKA oder PKC) modifiziert. Hierdurch kommt es zu einer Proteinstabilisierung, Verstärkung der AP-1-Bindungsaktivität und Einfluss auf das Transaktivierungspotential (Gruda et al., 1994; Hurd et al., 2002; Rosenberger et al., 1999).

Die Jun-Faktoren können untereinander eine Bindung über sogenannte „leucine zipper regions“ eingehen und Homodimere ausbilden. Außerdem können sich Mitglieder der Jun-Familie mit Mitgliedern der Fos-Familie formieren und Heterodimere bilden (Karin et al., 1997). In-vitro-Studien zeigen, dass Jun-Fos-Heterodimere stabiler sind und eine stärkere DNA-Bindungsaktivität besitzen als Jun-Jun-Homodimere (Ryseck & Bravo, 1991).

Die jeweiligen Dimere binden wiederum an bestimmte DNA-Sequenzen (TRE = 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) responsive element) innerhalb vieler Promotoren und spielen bei der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Angiogenese und Invasion eine entscheidende Rolle als Transkriptionsfaktoren (Tulchinsky, 2000; van Dam et al., 2001, Shaulian et al., 2001; Jochum et al., 2001).

So werden viele Proteasen, die an der Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt sind, von AP-1-Transkriptionsfaktoren reguliert (MMP's, uPA, PAI-1, TIMP-1 (Belguise et al., 2005; Cirillo et al., 1999)). In vielen experimentellen Studien konnten die o.g. TRE-Elemente in den einzelnen Genen nachgewiesen werden. Dieses ist im Kapitel A 1.3.3. und Kapitel A 1.4.4. ausführlich beschrieben.

A 1.5.2. Klinische Relevanz der AP-1 Transkriptionsfaktoren

Es gibt Untersuchungen, die die Rolle der AP-1-Faktoren bei Mammakarzinomen geprüft haben. So konnte in Östrogenrezeptor-positiven MCF-7 Zellen erhöhte Expression von FosB und fehlendes Fra1 nachgewiesen werden, wohingegen in der Östrogenrezeptor-negativen, hoch invasiven MDA-MB-231-Zelllinie verstärkte Expression von Fra1 nachweisbar war (Bamberger et al., 1999; Philips et al., 1998). Immunhistochemisch konnte diese Beobachtung in klinischem Material von Mammakarzinomen bestätigt werden (Bamberger et al., 2000; Milde-Langosch et al., 2003). Das FosB-Protein und ihre m-RNA-Expression liessen sich in lobulären und duktalem Zellen des Mamma-Normalgewebes nachweisen, außerdem in gut-differenzierten Tumoren, während es bei schlecht-differenzierten und Steroidrezeptor-negativen Tumoren nicht detektierbar war. Sequenzierungsuntersuchungen und RT-PCR

zeigten, dass FosB in diesen Fällen nicht durch Mutationen inaktiviert wird, sondern die Downregulation hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene erfolgt (Milde-Langosch et al., 2003).

In Westernblot-Untersuchungen an Mammakarzinomgeweben korrelierten hohe Expressionen von FosB mit geringer Zellproliferation und höherem Differenzierungsgrad des Tumorgewebes, wohingegen hohe Fra-1-Expressionen mit hoher Expression von Proliferationsmarkern wie Ki67 und Cyclin-E korrelieren (Bamberger et al., 1999; Milde-Langosch et al., 2000).

Auch Kustikova et al. konnten nachweisen, dass in Mamma-Adenokarzinom-Zelllinien (CSML) der Maus eine positive Korrelation zwischen Fra-1-Expression und höherer Malignität des Tumors einhergeht. So zeigten schwach invasive und nicht metastasierende CSML0 Zellen nach Induktion mit Fra-1 ein hohes invasives Potential und gesteigerte Motilität (Kustikova et al., 1998).

Auch in anderen Tumoren ist das Vorhandensein von AP-1 Faktoren weit untersucht. So sind Regulationen in Endometriumkarzinomen (Bamberger et al., 2001), Zervixkarzinomen (Prusty et al., 2005), Ovarialkarzinomen (Bani et al., 2004), Kolorektalen Karzinomen (Vial et al., 2003), Ösophaguskarzinomen und hepatozellulären Karzinomen (Mikula et al., 2003) beschrieben.

A.1.6. Ziele der Arbeit

MMP-1, MMP-9 und PAI-1 gehören zu denjenigen Proteinen, deren Beteiligung am Invasionsgeschehen bereits beobachtet wurde und in deren Promoterregion AP-1-Bindungsstellen bekannt sind. Ziel dieser Arbeit war es Informationen über Regulationsmechanismen zu erhalten, die während der Progression des Mammakarzinoms eine Rolle spielen.

Zu diesem Zweck wurden dann folgende Versuche durchgeführt:

- Untersuchung der Expression von MMP-1, MMP-9, PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex in 75 Mammakarzinomen durch Western Blot.

- Vergleich mit der Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, c-Jun, Jun-B, Jun-D. Hierzu wurde ein bereits untersuchtes Kollektiv um weitere 22 Karzinome erweitert und statistische Korrelationen durchgeführt.

B.1. MATERIAL

B.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Elektrophoresekammer	SE 600 and 660 Standard Dual Cooled Gel Electrophoresis Units, Amersham
Transferkammer	Elektrophoresis Power Supply EPS 601, Amersham Pharmacia, Biotech
PCR-Gerät	Trio Thermoblock TB1, Biometra biomed. Analytik, Göttingen
Taumelschüttler	Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau
Glasplatten	18x16 cm with Hoefer SE 400/SE 600
Spacer	2 cm x 16 cm x 1.5 mm, Hoefer No. SE 6119-1-1.5
Halteklammern für die Glasplatten	Clamp assy universal 16 cm, Hoefer No. SE 6119-1-1.5
Kämme für Geltaschen	Comp, 12 wells, 1.5 mm, Hoefer No. SE 511-12-1.5, Amersham P.B., USA
Eppendorf-Hütchen	Eppendorf, Hamburg
Blottingpapier	Whatman
Immobilon P Membran	Millipore Corporation, MA 01730, USA
Schwämme zum Transfer	Foam Sponges, 1/8 thick, Hoefer No. TE 45 F-1/8
Röntgenfilme	Hyperfilm ECL Röntgenfilme, Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilm-Entwicklungsgerät	Protec, Oberstenfeld
Densitometer	GS 700, Bio-Rad Laboratories, München

B.1.2. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Proteinaseinhibitorcocktail	Sigma P-8340
BCA Protein Assay Kit	Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin
BSA (Albumin-Standard)	Pierce, Rockford, USA
40% Acryl-/ Bisacrylamid 37:1	40 % stock solution mixture (37:1 ratio), #A-6050, Sigma
SDS	71725, Sigma
Glycerin	#1.04091.1000 Merck
TEMED	#35925.01 Serva
Tricine	Sigma, FW 179.2
Bromphenolblau	Sigma, B-0126
Mercaptoethanol	Bio-Rad 161-0710
Rainbow-Marker	MWM 14.3-220 kDalton, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Blocking reagent	#1096176, Boehringer
Chemiluminescence- Lsg.	Super Signal® West Pico Pierce, Rockford, IL 61105

B.1.3. Pufferlösungen für die Proteinextraktion und das Western Blotverfahren

Lysispuffer

0,05 M	Tris-HCl, pH 6,8
1 %	SDS
10 %	Saccharose

Gelpuffer

3 M	Tris-HCl, pH 8,45
0,3 %	SDS

Anodenpuffer

0,2 M	Tris-HCl, pH 8,9
-------	------------------

Kathodenpuffer

0,1 M	Tris-HCl, pH 8,25
0,1 M	Tricine
0,1 %	SDS

Pcsb-1

50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
1 %	SDS
10 %	Saccharose

Pcsb-2

50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
3 %	SDS
10 %	Saccharose
0,01 %	Bromphenylblau
10 %	Mercaptoethanol

Transferpuffer:

0,1 M	Tris
0,193 M	Glycin

Blockingpuffer:

0,1 M	Maleinsäure
0,15 M	NaCl
1 %	Blocking reagent

auf pH 7,5 mit NaOH einstellen.

TBST:

0,02 M	Tris-HCl, pH 7,6
0,137 M	NaCl
0,05 %	Tween 20

B.1.4. Primärantikörper

MMP-1	mouse anti-MMP-1 (Ab-6 von Calbiochem-Novabiochem)
Verdünnung:	1:1000
MMP-9	mouse anti-MMP-9 (Ab-3 von Calbiochem-Novabiochem)
Verdünnung:	1:1000
PAI-1	mouse anti-PAI-1 (Ab-1 von Calbiochem-Novabiochem)
Verdünnung:	1:100
Actin	goat anti-actin (I-19 von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:10000
c-Jun	rabbit anti-c-Jun (KM-1 von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:200
junB	rabbit anti-junB (210 von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:100
junD	rabbit anti-junD (329 von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:2000
c-Fos	rabbit anti-c-Fos (4 von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:1000
FosB	rabbit anti-FosB (102 von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:200
Fra1	rabbit anti-Fra1 (R20 von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:400
Fra2	rabbit anti-Fra2 (Q-20 von Santa Cruz)
Verdünnung	1:800

B.1.5. Sekundärantikörper

MMP-1, MMP-9 und PAI-1	anti-mouse-IgG (von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:2000
AP-1 Faktoren	anti-rabbit-IgG (von Santa Cruz)
Verdünnung:	1:5000

B.2. Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Studie wurden 75 Mammakarzinompatienten und 4 Mammakarzinom-Zelllinien (s. Kapitel B.4) untersucht. Die Tumoren stammten von 74 weiblichen und einem männlichen Patienten.

Die Patienten erhielten in einem Zeitraum zwischen den Jahren 1994 und 2001 in der gynäkologischen Abteilung des Universitätskrankenhauses Eppendorf eine operative Therapie.

Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug 58 Jahre (25-90Jahre). Zum Zeitpunkt der Primärtherapie lag bei 67 Patienten ein Primärtumor vor, bei 8 Tumoren handelte es sich um ein intramammäres Rezidiv. Die Stadieneinteilung erfolgte nach der TNM-Klassifikation (UICC) und konnte bei insgesamt 7 Tumoren nicht eindeutig erhoben werden (s. Kapitel B.3).

Die Verlaufsdaten konnten für 51 Patientinnen erhoben werden. Die mediane Nachbeobachtungszeit der Patientinnen, die zum Zeitpunkt dieser Analyse noch lebten, betrug 52,5 Monate (6- 110 Monate). Innerhalb des Beobachtungszeitraumes erlitten 14 Patienten (27,5 %) ein Rezidiv und 6 Patientinnen (11,8 %) starben.

B. 3 Klassifikation der untersuchten Tumoren

Faktoren	N	(%)
Lymphknotenbefall (N)	67	
0 = kein Befall	30	(44,8)
1 = positiver Befall	37	(55,2)
Histologie	75	
ductales Ca.	59	(78,7)
lobuläres Ca.	11	(14,7)
muzinöses Ca.	4	(5,3)
medulläres Ca.	1	(1,3)
Stadium (UICC; nur der Primärtumoren)	68	
1	13	(19,1)
2	39	(57,4)
3	4	(5,9)
4	12	(17,6)
Grading	75	
G 1 = gut differenziert	3	(4)
G 2 = mäßig differenziert	36	(48)
G 3 = undifferenziert	36	(48)
Steroidhormonrezeptorstatus	73	
PR positiv	53	(72,6)
PR negativ	20	(27,4)
ER positiv	54	(74)
ER negativ	19	(26)
Ki67	75	
Expression < 50 %	56	(74,7)
Expression > 50 %	19	(25,3)

Tabelle 5. Verteilung der histomorphologischen, klinischen und tumorbiologischen Faktoren bei Patienten mit Mammakarzinom aus dem untersuchten Kollektiv (n = 75).

B.4. Beschreibung der Zelllinien

In dieser Arbeit werden 4 verschiedene Mamma-Zelllinien mit unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich des Rezeptorstatus mit untersucht. Teilweise wurden sie als Positivkontrolle herangezogen.

Zelllinie HBL-100, ATCC HTB-124

Aus scheinbar normalem humanem Mammaepithel gezüchtete Zelllinie. Sie ist SV40 positiv und daher nicht wirklich mit „gesunden“ Mammaepithelzellen vergleichbar.

Zelllinie T47D, ATCC HTB-133

Aus humanen duktalem Mamma-Karzinomzellen gezüchtete Zelllinie. Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiv, exprimiert die Isoformen Progesteronrezeptor A und B.

Zelllinie MDA-MB-231, ATCC- HTB-26

Aus humanen Mamma-Adenokarzinomzellen gezüchtete Zelllinie, Östrogen- und Progesteronrezeptor negativ.

MCF-7

Aus humanen Mamma-Karzinomzellen gezüchtete Zelllinie, Östrogen- und Progesteronrezeptor positiv.

C **METHODEN**

C.1. **Proteinextraktion aus den Tumoren und den Zelllinien**

- Die Gewebstücke der Tumoren und der Zelllinien wurden bei -80 ° C gelagert.
- Homogenisatoren und Probenpuffer (Pcsb-1 → s. Kapitel B 1.3) wurden auf Eis vorgekühlt.
- Gewebstücke wurden aus der -80°C- Truhe in flüssigen Stickstoff gelegt.
- Sämtliche folgende Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.
- Mit dem sterilen Skalpell wurde ein ca. 5x5 mm großes Gewebstück vom Tumor herausgeschnitten, in Alufolie eingepackt und mit Hilfe eines Hammers zerkleinert. Dann wurde das Päckchen erneut mit einer Pinzette in flüssigen Stickstoff gehalten und die Gewebstücke in den Homogenisator überführt.
- Gewebepulver wurde mit 2 ml Pcsb-1 und 20 µl eines Proteinaseinhibitorcocktails (Sigma protease inhibitor cocktail P8340) versetzt und im Homogenisator gründlich auf Eis gemörsert, dabei gingen die Proteine in Lösung, Reste an nicht löslichem Material wurden bei 13 000 Upm für 3 Minuten abzentrifugiert.
- Der Überstand, der unter anderem die lösliche Fraktion des Proteins enthielt, wurde in gekühlte Eppendorf-Hütchen überführt und in Aliquots zu ca. 0,5 ml bei -80°C eingefroren.
- Für die Konzentrationsbestimmung wurden 25 µl der Probenlösung im Verhältnis 1:5 mit Pcsb-1 verdünnt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.
- Entsprechend wurden die kultivierten Zelllinien in Pcsb-1 lysiert und für die Proteinkonzentrationsbestimmung vorbereitet.

C.2. **Konzentrationsbestimmung von Proteinen/Zelllinien mittels BCA-Protein Assay**

Die Konzentration von Proteinen wurde mit der BCA-(=Bicinchoninsäure) Methode ermittelt. Mit Hilfe von BSA-(=Bovine Serumalbumin) Proteinstandards wurden Eichlösungen verschiedener bekannter Konzentrationen (25-1000 µg/ml) hergestellt.

Parallel hierzu wurden die Proteinextrakte mit Pcsb-1 1:5 verdünnt (s.o.) und die Lösungen auf Eis gelagert. Lösungen A und B aus dem BCA-Kit wurden 50:1 gemischt.

Im Doppelansatz wurden zu je 50 µl Eichlösungen und 1:5 verdünnten Probelösungen 1 ml des BCA-Reagenzes gegeben, gut gemischt und die Ansätze für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Das Reaktionsprinzip dieser Nachweismethode basiert darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduzieren (Biuret-Reaktion) und dann mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden. Zu beachten ist, dass die Proteinprobe frei von Reduktionsmitteln wie zum Beispiel größeren Mengen von Zuckern sein muss, da die Messung sonst fehlerhaft ist.

Die Menge dieses Farbstoffkomplexes wurde bei 562 nm in einem Photometer bestimmt. Der zugehörige Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe einer Kalibriergeraden mit BSA-Proteinstandards parallel zu jeder Messung ermittelt. Die den Extinktionen entsprechenden Proteinkonzentrationen der Proteinextrakte aus den Tumoren und den Zelllinien konnten anhand der Standardkurve ermittelt werden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das 40 µg entsprechende Volumen für jede Probe errechnet.

C.3. Westernblotanalyse

C.3.1. Analytische diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(Laemmli, 1970, modifiziert)

Bei der analytischen **Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)** wurden Proteingemische einer größenabhängigen Auftrennung im elektrischen Feld unterworfen. SDS hat als anionisches Detergenz zwei Wirkungen auf Proteine. Es führt zum einen zu einer Auflösung von Quartär- und Tertiärstrukturen und zum anderen bindet es im Überschuss in konstantem Verhältnis (1,4 g SDS/1 g Protein) an Proteine, was eine gleichartige negative Ladung pro Masseneinheit bewirkt.

Diese negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode. Zur Auftrennung der Komplexe nutzt man die Molekularsiebeeigenschaften von Polyacrylamidgelen (PAA-Gel) aus. Dabei ist die Beweglichkeit bei den meisten Proteinen umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer molekularen Masse. Das diskontinuierliche Puffersystem nach Laemmli (1970) bewirkt eine Konzentrierung der Proben an der Übergangsstelle zwischen Sammelgel und Trenngel, was zu einer hohen

Auflösung bei der anschließenden Trennung führt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts unbekannter Proteine lässt man Eichproteine bekannten Molekulargewichts mitlaufen. (→ Eichgerade).

Die Porengröße des Gels wird durch das Verhältnis der Konzentration an Acrylamid zum Quervernetzer N-N'-Methylenbisacrylamid bestimmt. Der Acrylamid-Anteil (% T) und der Vernetzungsgrad (% C) sind daraus resultierende Größen, die ein Polyacrylamidgel charakterisieren:

$$\% T = \text{Acrylamid (g) + Bis (g) / Volumen (ml) x 100}$$

$$\% C = \text{Bis (g) / Acrylamid (g) + Bis (g) x 100}$$

Der % T-Anteil bestimmt den Trennbereich eines PAA-Geles.

C.3.2. Herstellung von diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen

- Glasplatten, Spacer, Gummis im Kammerunterteil und Probenkämme wurden mit abs. Ethanol gereinigt.
- Die Glasplatten wurden zusammengesetzt, dabei wurde darauf geachtet, dass die Gummis oben und unten nicht überstehen. Dann wurde der Fußteil der Gelkammer für bis zu zwei Gele eingesetzt und befestigt.
- Trenngel-Lösung (s. Tabelle 6) wurde in einem Messzylinder angesetzt.

Gelkonzentration:	8 %	10 %
Trennbereich:	80 – 100 kD	40 – 80 kD
87% Glycerin	4 g	4 g
Aqua dest.	10 ml	8,5 ml
Gelpuffer <u>mit</u> SDS	10 ml	10 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid 40 %	6 ml	7,5 ml
TEMED	15 µl	15 µl
APS 10 %	150 µl	150 µl

Tabelle 6. Zusammensetzung des Trenngels (30 ml)

- Erst kurz vor dem Gießen wurden TEMED und „Starter“-Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zugegeben und gut vermischt.
 - Die Gelkammer wurde zu $\frac{3}{4}$ mit Trenngel gefüllt, ohne dass Luftblasen entstanden.
 - Jedes Gel wurde ca. 3-4 mm mit Aqua dest. überschichtet, so dass eine glatte Oberfläche entstand.
 - Das Gel wurde mindestens 30 min. auspolymerisiert, dann das Aqua dest. abgegossen und Restwasser mit gefaltem Papierhandtuch aufgesaugt.
 - Die Probenkämme wurden eingesetzt.
- Sammelgel-Lösung (s. Tabelle 7) wurde in einem Messbecher angesetzt.

Aqua dest.	7,9 ml
Gelpuffer (<u>ohne</u> SDS)	3,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	1,5 ml
TEMED	15 μ l
APS 10 %	150 μ l

Tabelle 7. Zusammensetzung des Sammelgels (12,5 ml)

- Ebenfalls kurz vor dem Gießen wurden TEMED und "Starter"-Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %) zugegeben und gut vermischt.
- Die Sammelgel(e) wurden langsam aufgegossen.
- Die Gele wurden mindestens 30 min auspolymerisiert, dann die Probenkämme entfernt.
- Mit Hilfe der Probenkämme waren zwölf Taschen zur Aufnahme der Proteinproben entstanden. Die Taschen wurden mit entionisiertem Wasser mittels Mikropipette gereinigt.
- Gelkammer(n) wurden mittels Klammern an der Kathodenpufferkammer befestigt.
- Zur Auslaufprobe wurde die Kathodenpufferkammer zur Hälfte mit Aqua dest. gefüllt und 30 min. stehen gelassen.
- In der Zwischenzeit wurden die Proben vorbereitet.

C.3.3. Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf

- Die Proteine wurden aus der Gefriertruhe entnommen, zum Auftauen in der Hand erwärmt und aufgemischt.
- Die Proben wurden vorbereitet, indem Äquivalente von 40 µg Protein mit Pcsb-1 auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und im Verhältnis 1:1 mit Pcsb-2 (s. Kapitel B 1.3) versetzt wurden. Wenn das entsprechende Volumen größer als 50 µl war, wurde das gleiche Volumen an Pcsb-2 hinzugegeben. Das Endvolumen der Proben lag meistens bei 100 µl, maximal bei 204 µl. Als Molekulargewichtsmarker lief bei jedem Gel ein Rainbow-Marker (Amersham) in einer Tasche mit, ausserdem eine Positivkontrolle, welche das zu untersuchende Protein enthielt. Dem Pcsb-2 war zur Verfolgung der Wanderungsgeschwindigkeit gesättigte wässrige Bromphenolblau-Lösung beigemischt.
- Die Proben wurden gut aufgemischt und 5 min. lang im Thermocycler (PCR-Gerät) bei 99°C inkubiert.
- In der Zwischenzeit wurde die Auslaufprobe ausgegossen, die erforderlichen Mengen an Anoden- und Kathodenpuffer (s. Kapitel B 1.3) vorbereitet und in die jeweiligen Elektrophoresekammern gefüllt.
- Nach Abkühlen der Protein-Proben auf Raumtemperatur wurden sie mit 12 000 U/min. für 2 min. zentrifugiert.
- Die Proben wurden in die Geltaschen mit Hilfe von speziellen, lang ausgezogenen Mikropipetten (Biozym) einpipettiert.
- Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 17–28 Stunden bei Raumtemperatur nach Anlegen einer Stromstärke von 30 mA und einer variierenden Spannung von 50–75 V (in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins).

C.3.4. Elektro-Blotting

- Sobald die Lauffront (Bromphenolblau) das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Stromquelle abgeschaltet und die Glasplatten wurden aus der Apparatur gelöst.
- Die Proteinbanden wurden mittels Elektro-Blotting von dem SDS-Polyacrylamidgel

auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran transferiert. Für die Transferprozedur wurden das SDS-Gel und die Membran zwischen puffergetränkte Papiere plaziert (Sandwich-Aufbau) und an ein elektrisches Feld angelegt.

- Es wurden pro Gel 6 Filterpapiere (Whatman 3 MM), die ein wenig größer waren als das Gel, und eine Immobilon P-Membran (PVDF-Membran) von der Größe des Elektrophoresegels zugeschnitten und vorbereitet.
- Zur ausreichenden Benetzung war es notwendig, die Immobilon P-Membran vor Gebrauch in 100% Methanol, danach in Aqua dest. und schließlich in Transferpuffer zu inkubieren.
- Lauffront des Acrylamidgels und Sammelgel wurden mit einem Skalpell entfernt und entsorgt.
- Die Blot-Membran wurde luftblasenfrei auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgebracht, darüber wurden 3 Lagen Filterpapier, die jeweils zuvor in Transferpuffer getränkt waren, gelegt. Durch das Gegenlegen einer sauberen Glasplatte wurde der Stapel umgedreht und das Gel von der Glasplatte gelöst. Dann wurden weitere 3 Lagen in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere auf das Gel gelegt.
- Es wurden an beiden Seiten, wie bei einem Sandwich, in Transferpuffer getränkte Schwämme angebracht, dann darauf geachtet, dass auf der Seite auf der sich die Membran befand das Anodengitter, auf der Gegenseite das Kathodengitter angelegt wurde.
- Der Transfer erfolgte in der mit Transferpuffer gefüllten Transferkammer durch Anlegen einer Stromstärke von 400 mA über einen Zeitraum von 3-4 Stunden.
- Zu beachten war, dass die Transfargeschwindigkeit von der Proteingröße und von der Stromstärke abhing. Gemäß der negativen Ladung der Proteine im SDS-Gel wanderten sie im elektrischen Feld in Richtung Anode. Sie wurden aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an die Membranoberfläche gebunden.

C.3.5. Blockierung

- Nach erfolgtem Transfer der elektrophoretisch getrennten Proteine wurde die Membran in Methanol getränkt und bei Raumtemperatur 30 min. getrocknet.
- Die Membran wurde erneut in Methanol geschwenkt, dann in Aqua dest.
- Anschließend wurde zur Verminderung der unspezifischen Bindungsstellen des

Antikörpers die Blotmembran in Blockingpuffer bei 4°C im Kühlschrank über Nacht gelagert.

- Membranen, die nicht am nächsten Tag verwendet wurden, wurden eine Minute in Methanol getränkt, 15 min. bei Raumtemperatur erneut getrocknet und bei -20°C gelagert.

C.3.6. Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

- Der Blockingpuffer wurde abgegossen.
- Ein gegen das zu untersuchende Protein gerichteter Primärantikörper (s. Kapitel B 1.4) wurde in optimierter Konzentration mit einem Gemisch aus TBST und Blockierungspuffer (im Verhältnis 9:1) verdünnt und die Membran darin über 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rocky-Taumelschüttler inkubiert.
- Nach dreimaligem Waschen á 10 Minuten mit TBST auf dem Schüttler erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Bei den Sekundärantikörpern handelt es sich um Meerrettich-Peroxidasegekoppelte Antikörper, die je nach Primärantikörper gegen Maus-, Kaninchen- oder Ziegen-IgG gerichtet sind.
- Die Lösung wurde abgegossen und der Antikörperüberschuss auf der Membran wurde entfernt, indem sie für viermal zehn Minuten mit TBST auf dem Schüttler gewaschen wurde.

C.3.7. Detektion

- Zur Färbereaktion wurden 20 ml eines auf Luminol basierenden ECL-Detektionsreagenzes (Super-Signal West Pico kit, Pierce) zur Membran gegeben und für 5 min. auf dem Schüttler inkubiert. Das Luminolsubstrat wurde durch die Peroxidase am Sekundärantikörper oxidiert. Dabei entsteht ein Reaktionsprodukt, welches einen höheren, jedoch labilen Energiezustand hat. Beim Rückfall auf den energetischen Ausgangszustand werden Lichtquanten freigesetzt, die den Röntgenfilm an dieser Stelle schwärzen. Der Grad der Schwärzung ist somit ein Maß für die Menge an zu untersuchendem Protein.

-
- Nach 5 Minuten wurde die „Super-Signal“-Lösung abgegossen und die Membran mit der Pinzette in eine Klarsichtplastikhülle überführt. Dann wurde diese in eine Röntgenkassette gelegt.
 - In einer Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt. Die Expositionszeiten variierten je nach Antikörper zwischen 10 Sekunden und 10 Minuten. Nach Erreichen der gewünschten Expositionszeit wurde der Röntgenfilm in einem Entwicklungsgerät entwickelt.

C.3.8. Densitometrische Auswertung des Western Blots

- Die Schwärzung des Films war ein Mass für die vorhandenen Proteinkonzentrationen. Die quantitative Auswertung der Schwärzung der Banden auf dem Film erfolgte densitometrisch mit der Software Quantity One. Gemessen wurde die Absorption der spezifischen Bande in Bezug auf einen Hintergrund-Parameter. Die Absorption pro Flächeneinheit wurde nach Integration in Absorptionseinheiten $\times \text{mm}^2$ angegeben. Es wurde um die Signalbanden ein rechteckiges Messfeld gelegt. Bei gleichmäßiger Färbung des Hintergrundes wurde für alle auszuwertenden Signalbanden das gleiche Messfeld für den Hintergrundabgleich definiert.
- Um sicherzustellen, dass vergleichbare Mengen an Protein in den Tumor-Proteinproben enthalten sind, wurde für alle Karzinome auch die Expression an Aktin mit Hilfe der Westernblotanalyse bestimmt. Aktin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa. Es ist in allen eukaryoten Zellen enthalten. Es existieren drei unterschiedliche Klassen an Aktin-Proteinen (alpha, beta und gamma), von denen beta- und gamma-Aktin in Filamenten vorkommen. Alle untersuchten Karzinome und die Zelllinie T47D zeigten eine vergleichbar starke Expression an Aktin. Bei denjenigen Fällen, bei denen die Aktinexpression stärker als 10 % von der durchschnittlichen Expression abwich, wurde ein Korrekturfaktor berechnet. Mit diesem Faktor wurden die Expressionswerte der anderen gemessenen Proteine multipliziert.

C 3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Einsatz des Computerprogramms SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences 10.0). Die Ergebnisse wurden tabellarisch und graphisch dargestellt. Neben Mittelwertberechnungen und Standardabweichungen sind auch Assoziationen und Korrelationen mit dem integrierten Korrelationstest nach Pearson berechnet worden. Die Prüfung der Nullhypothese erfolgte durch Berechnung des χ^2 -Tests nach Pearson beziehungsweise bei Vierfeldertafeln der Prüfgrösse nach Fisher und bei schwach besetzten Mehrfeldertafeln mittels Hulton-Freeman-Test. Bei geordneten 2 x R-Tafeln wurde zusätzlich das Ergebnis des linearen Tests angegeben. Die berechneten p-Werte sind im Sinne deskriptiver Masszahlen aufzufassen und geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der man bei gegebener Unabhängigkeit der beiden Merkmale einen derart beobachteten oder noch grösseren Wert für die Prüfgrösse erhalten würde. Kleine p-Werte sprechen also **gegen** die Annahme der Unabhängigkeit. Es wurde hinsichtlich der Signifikanz ein p-Wert $\leq 0,05$ als ein signifikantes Ergebnis gewertet, p-Werte grösser 0,05 wurden folglich als nicht signifikantes Ergebnis gewertet.

D ERGEBNISSE

D.1 Ergebnisse zu den AP-1-Faktoren

Die Expression von AP-1-Faktoren in 53 Mammakarzinomen des gleichen Kollektives wurde bereits 1999 mit Hilfe der Westernblotanalyse untersucht (Bamberger et al, 1999). Allerdings erfolgte zu diesem Zeitpunkt keine densitometrische Auswertung der Ergebnisse, sondern nur eine Abstufung der Expressionsausprägung mit dem bloßen Auge. In dieser Arbeit wurden die vorhandenen Daten nachträglich densitometrisch ausgewertet.

Ausserdem konnte das Kollektiv um weitere 22 Karzinome erweitert werden. Diese wurden nach den vorhandenen Protokollen mittels Westernblotanalyse im Hinblick auf die Expression sämtlicher Jun- und Fos-Proteine untersucht. In der densitometrischen Auswertung wurde für jeden einzelnen AP-1-Faktor eine Positivkontrolle als Bezug genommen (100 %) und die Expressionswerte der weiteren Tumoren und der Zelllinien mit ihnen verglichen. Abschliessend wurden dann die Werte, wenn nötig, entsprechend an dem jeweiligen Wert für β -Aktin korrigiert (s.o.). Die gesamte Datenanalyse der einzelnen AP-1-Faktoren bezieht sich demnach auf relative Werte. Dieses Vorgehen wurde in gleicher Form für die Auswertung der Expressionswerte von MMP-1, MMP-9, PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex angewandt. Die jeweiligen Positivkontrollen sind im Kapitel C 3.3. erwähnt.

Die densitometrische Auswertung erfolgte, um exaktere Daten im erweiterten Kollektiv bezüglich der Expression der einzelnen Mitglieder der AP-1-Familie in den Tumoren zu erhalten. Des Weiteren sollen die AP-1-Faktoren mit der Expression von MMP-1, MMP-9, PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex verglichen und statistisch eine mögliche Beziehung überprüft werden. Zur statistischen Analyse werden an Hand des Medians der Expressionswerte jeweils zwei gleichgroße Gruppen für jedes AP-1-Mitglied gebildet, welche mit „niedriger“ und „hoher“ Expression bezeichnet wurden.

Besonderheiten ergaben sich in der Westernblotanalyse von **Fra-1**. Es ließen sich in einigen Tumoren zwei dicht nebeneinander liegende Banden bei 33 kDa und 36,5 kDa nachweisen, andere exprimierten nur eine dieser Banden. Somit wurde für die statistische Auswertung jeweils das Gesamtprotein und die langsamer wandernde Bande (phosphorylierte Form) allein bewertet. Insgesamt konnte allerdings nur zwischen negativ und schwach positiv, bzw.

fehlend und vorhanden unterschieden werden, da die Banden gegenüber dem relativ starken Hintergrund nur schwach waren und keine exakte Densitometrie erlaubten.

Auch für **Fra-2** konnten unterschiedliche Phosphorylierungsstadien und somit insgesamt drei verschiedene spezifische Banden mit Molekulargewichten zwischen 38 kDa und 47 kDa nachgewiesen werden. Auch hier wurden für die statistische Auswertung jeweils das Gesamtprotein, die zwei oberen Banden und die untere Bande unabhängig voneinander bewertet.

D 1.1 Auffällige Korrelationen von AP-1-Faktoren zu klinischen Daten

Unter den AP-1-Faktoren zeigte Fra-1 eine positive signifikante Korrelation zu Grading und Ki67, wobei die phosphorylierte Form zusätzlich eine positive Korrelation zum Nodalstatus aufwies. Schwache Fra-1-Expressionen gingen mit niedrigem Grading und weniger Ki67 Expressionen einher. In nodalpositiven Tumoren war die phosphorylierte Form des Fra-1 überproportional häufig nachweisbar. Ausserdem liess sich eine inverse Korrelation zum Östrogenrezeptorstatus nachweisen, d.h. Tumoren mit positivem Östrogenrezeptorstatus zeigten schwache Fra-1-Expression.

Genau entgegengesetzt liessen sich für FosB eine negative Korrelation zu Ki67 und eine positive Korrelation zum Östrogenrezeptorstatus nachweisen. c-Fos zeigte eine auffällige statistische Beziehung zum Tumorstadium und eine grenzwertige Signifikanz zum Nodalstatus. Die phosphorylierte Form von Fra-2 fiel mit einer statistisch signifikanten Korrelation zur Rezidivrate auf. c-Jun, JunD und JunB zeigten keine statistisch signifikanten Korrelationen.

Zu den übrigen klinischen Daten wie histologischer Typ, Alter und Progesteronhormonrezeptorstatus zeigte keiner der AP-1-Faktoren eine statistisch auffällige Beziehung.

Die relevanten Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen 8, 9 und 10 zusammengefasst:

		FosB		c-fos	
		niedrige Expr. (0-50 % der Kontrolle)	hohe Expr. (> 50 % der Kontrolle)	niedrige Expr. (0-9,5 % der Kontrolle)	hohe Expr. (> 9,6 % der Kontrolle)
Tumorstadium	1	4	8	11	2
	2	21	18	16	21
	3	9	7	8	10
			<i>p= 0,407</i>		p= 0,029
Nodalstatus					
negativ (n= 30)		15	15	20	10
positiv (n= 37)		21	16	16	21
			<i>p= 0,581</i>		p= 0,056
IHC-ER-Status					
Score 0-1		16	4	10	10
Score 2-12		22	32	30	24
			p= 0,003		<i>p= 0,670</i>
Ki67	< 10 %	5	12	10	7
	11- 49 %	19	20	21	18
	> 50 %	14	5	9	10
			<i>p= 0,028</i>		<i>p= 0,786</i>

Tabelle 8. Assoziation zwischen AP-1-Faktoren FosB, c-fos und einigen klinischen Daten; p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck und inverse Korrelationen sind kursiv hervorgehoben. IHC-ER-Status=immunhistochemischer Östrogenrezeptorstatus

		Fra-1 (t)		Fra-1 (p)	
		niedrige Expr.	hohe Expr.	niedrige Expr.	hohe Expr.
Grading I-II		22	17	31	8
	III	10	26	16	20
			p= 0,012		p= 0,002
Nodalstatus					
negativ (n= 30)		14	16	22	8
positiv (n= 37)		12	25	18	19
			p= 0,234		p= 0,041
IHC-ER-Status					
Score 0-1		5	15	4	16
Score 2-12		41	13	28	26
			p= <0,001		p= 0,014
Ki67	< 10 %	11	6	15	2
	11- 49 %	18	21	25	14
	> 50 %	3	16	7	12
			p= 0,01		p= 0,006

Tabelle 9: Assoziation zwischen Fra-1 und einigen klinischen Daten; Fra-1(t)=Gesamtprotein, Fra-1(p)=phosphorylierte Form von Fra-1; p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck, inverse Korrelationen sind kursiv hervorgehoben. IHC-ER-Status=immunhistochemischer Östrogenrezeptorstatus

		Fra-2 (t)		Fra-2 (p)	
		niedrige Expr. (0-25 % der Kontrolle)	hohe Expr. (> 25 % der Kontrolle)	niedrige Expr. (0-20 % der Kontrolle)	hohe Expr. (> 20 % der Kontrolle)
Rezidiv					
negativ (n= 37)		22	15	23	14
positiv (n= 13)		5	9	4	10
			p= 0,129		p= 0,032

Tabelle 10: Assoziation zwischen Fra-2 und Rezidivrate; Fra-2(t)=Gesamtprotein, Fra-2(p)=phosphorylierte Form von Fra-2; p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck hervorgehoben.

D 2 Ergebnisse für MMP-1

Die Expression von MMP-1 ließ sich mit vier verschiedenen Banden darstellen, wobei das Proenzym mit einer Doppelbande zwischen 54-56 kDa zur Darstellung kam und die aktive MMP-1-Form mit einer Doppelbande zwischen 47-50 kDa nachweisbar war. Als Positivkontrolle diente ein Tumor aus dem Kollektiv, welcher deutliche Banden für MMP-1 (Proenzym und aktive Form) zeigte. Die Stärke dieser Banden wurde als 100 % definiert.

D 2.1 Expression in den Tumoren

Mit Ausnahme von einem Tumor innerhalb der 75 untersuchten Tumoren konnte sowohl das Proenzym als auch die aktive Form von MMP-1 in allen Tumoren in unterschiedlicher Expressionsstärke nachgewiesen werden (s. Abbildung 6).

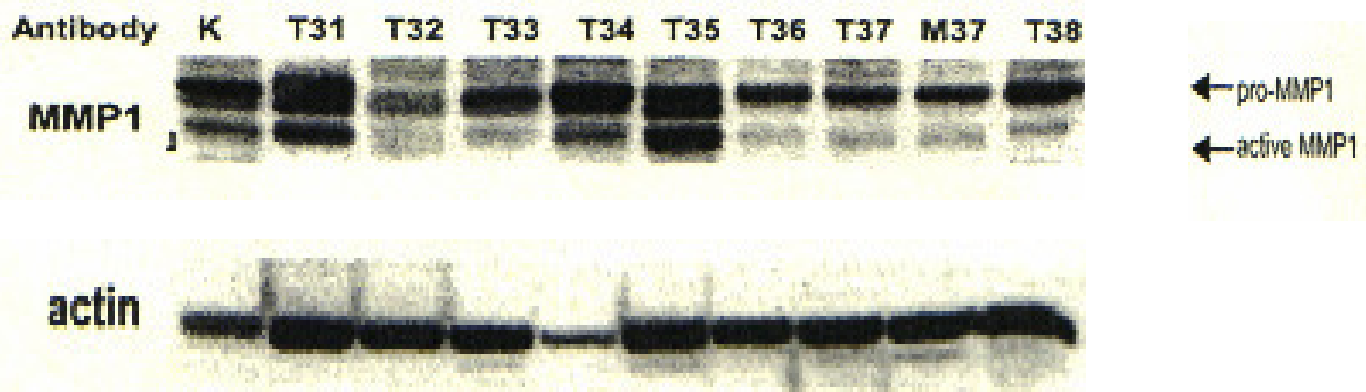


Abbildung 6. Western Blot Analyse für MMP-1 Proenzym und die aktive Form sowie für Aktin.

K=Positivkontrolle; T=Tumor (aus Mammakarzinomgewebe)

Zur weiteren statistischen Analyse wurden jeweils drei gleichgroße Gruppen für das Proenzym mit niedriger ($n = < 48\%$), mäßiger ($n = 48,1 - 90\%$) und hoher ($n = > 90,1\%$) Expression und für die aktive Form mit niedriger ($n = < 27\%$), mäßiger ($n = 27,1 - 86,5\%$) und hoher ($n = > 86,6\%$) Expression gebildet.

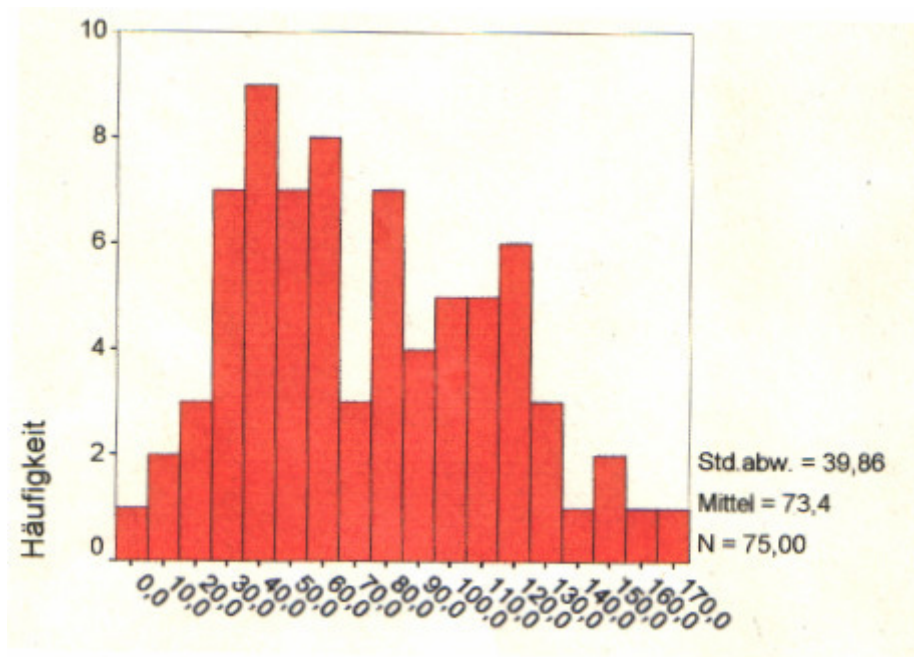


Diagramm 3. Verteilung der Expression der Proenzym Form von MMP-1 in Mammakarzinomen

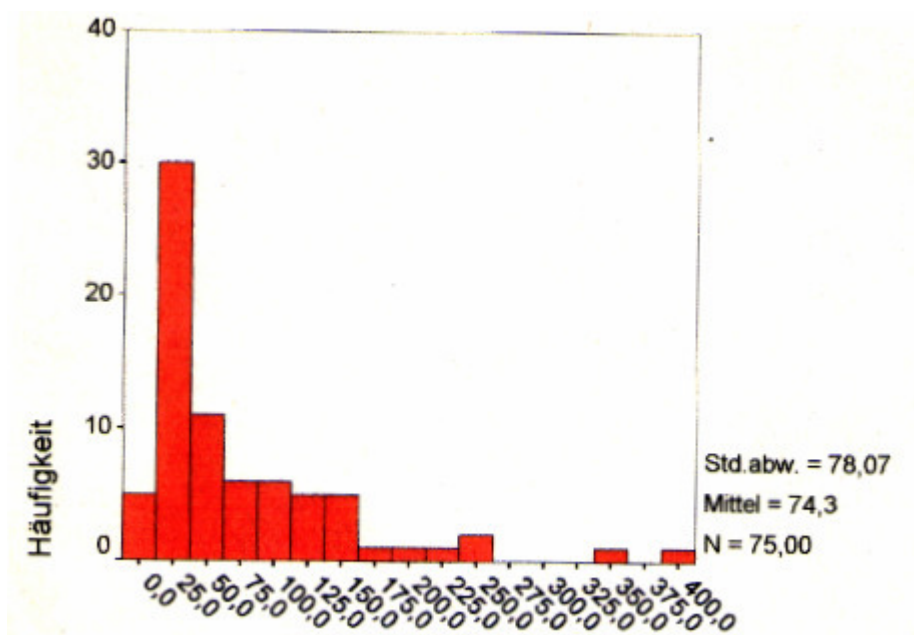


Diagramm 4. Verteilung der Expression der aktiven Form von MMP-1 in Mammakarzinomen

D 2.2 Expression von MMP-1 in Zelllinien

Bei Untersuchung der Zelllinien zeigten sich erhebliche Unterschiede. Während die rezeptornegative Zelllinie MDA-MB-231 eine sehr schwache Expression von MMP-1 aufwies (12,1 %), zeigten hingegen T47D (226,9 %) und MCF-7 (271,3 %) beide eine sehr starke Expression des Proenzym MMP-1. MCF-7 ließ außerdem eine sehr starke Expression der aktiven Form des MMP-1 nachweisen (580,8 %) (s. Abbildung 7).

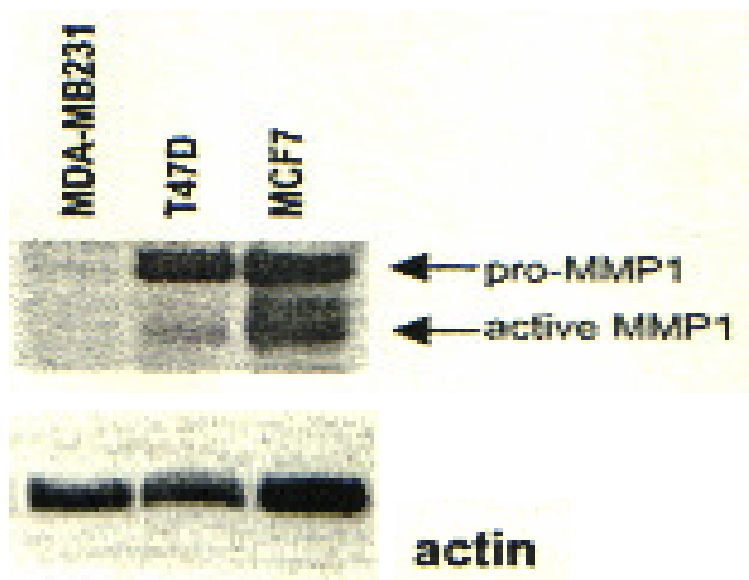


Abbildung 7. Expression von MMP-1, sowie von Aktin in den Zelllinien MDA-MB-231, T47D und MCF-7.

D 2.3 Korrelation von MMP-1 zu AP-1-Faktoren

Statistisch relevante Beziehungen zu der Expression des Proenzym von MMP-1 fanden wir für zwei AP-1-Faktoren, nämlich FosB und die phosphorylierte Form von Fra-2. Für c-Jun konnte eine grenzwertige Korrelation mit einem Chi Quadrat Wert nach Pearson von $p=0,067$ nachgewiesen werden. Für JunB, JunD, c-Fos und Fra-1 war keine statistisch relevante Beziehung zu der Expression des MMP-1-Proenzym erkennbar (s. Tabelle 11).

Die aktive Form des MMP-1 korrelierte signifikant positiv am stärksten mit FosB, außerdem mit c-Jun und negativ mit c-Fos (s. Tabelle 12). Keine Korrelation bestand mit der phosphorylierten Form von Fra-2, Totalprotein Fra2, JunB, JunD und Fra-1.

Die nachfolgenden Tabellen 11 und 12 geben die relevanten Korrelationen zwischen AP-1-Faktoren und MMP-1 (Proenzym und aktive Form) wieder.

	MMP-1- Proenzym		
	niedrige Expr. (<48 % d. Kontr.)	mittlere Expr. (48,1-90 % d. Kontr.)	hohe Expr. (>90 % d. Kontr.)
FosB			
niedrige Expr. (0-50 % d. Kontr.)	19	15	3
hohe Expr. (> 50 % d. Kontr.)	5	10	22
			p=<0,001
Fra-2 (p)			
niedrige Expr. (0-20 % d. Kontr.)	18	10	8
hohe Expr. (> 20 % d. Kontr.)	6	15	17
			p= 0,006
c-Jun			
niedrige Expr. (0-120 % d. Kontr.)	10	16	8
hohe Expr. (> 120 % d. Kontr.)	14	9	17
			p= 0,067

Tabelle 11: Assoziation zwischen MMP-1 und AP-1-Faktoren FosB, Fra-2 (p=phosphoryliert) und c-Jun; p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck, inverse Beziehungen durch Kursivdruck hervorgehoben.

	MMP-1- aktive Form		
	niedrige Expr. (<i><27 % d. Kontr.</i>)	mittlere Expr. (27,1-86,5% <i>d. Kontr.</i>)	hohe Expr. (<i>>86,6% d. Kontr.</i>)
FosB			
niedrige Expr. (0-50 % d. Kontr.)	19	13	5
hohe Expr. (<i>> 50 % d. Kontr.</i>)	5	12	20
			<i>p=<0,001</i>
c-Jun			
niedrige Expr. (0-120 % d. Kontr.)	18	10	6
hohe Expr. (<i>> 120 % d. Kontr.</i>)	6	15	19
			<i>p= 0,001</i>
c-Fos			
niedrige Expr. (0-9,5 % d. Kontr.)	15	8	16
hohe Expr. (<i>> 9,6 % d. Kontr.</i>)	9	17	9
			<i>p= 0,039</i>

Tabelle 12: Assoziation zwischen MMP-1 und AP-1-Faktoren FosB, c-Jun und c-Fos; p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck, inverse Beziehungen durch Kursivdruck hervorgehoben.

D 2.4 Korrelation von MMP-1 zu klinischen Daten

Die statistische Analyse der Expression von MMP-1 Proenzym mit klinischen Prognoseparametern (wie Tumorgrading, Lymphknotenbefall, Ki67 oder Rezidivbildung) zeigte bis auf eine positive Korrelation zu der Östrogenrezeptor-Expression in Mammakarzinomen keine auffälligen Korrelationen. Die positive Korrelation von MMP-1-

Proenzym-Form und dem Östrogenrezeptor-Status konnte mit einem p-Wert von 0,038 errechnet werden.

Die aktive Form von MMP-1 ergab eine statistisch signifikante negative Korrelation mit dem Lymphknotenstatus ($p=0,037$), das heisst starke Expression der aktiven MMP-1-Form war häufiger vergesellschaftet mit einem negativen Lymphknotenstatus (s. Tabelle 13).

Weitere relevante statistische Beziehungen zwischen MMP-1 und anderen klinischen Prognoseparametern wie dem Progesteronrezeptorstatus, Grading oder Ki67-Expression zeigten sich nicht.

		MMP-1 aktive Form			
		niedrige Expr. (0-27 % d. Kontr.)	mittlere Expr. (27,1-86,5 % d. Kontr.)	hohe Expr. (> 86,6 % d. Kontr.)	
Grading	I-II	14	11	14	$p= 0,556$
	III	10	14	11	
Nodalstatus					$p= 0,037$
	negativ (n= 30)	9	7	15	
	positiv (n= 37)	14	15	7	
Ki67	< 10 %	5	5	7	$p= 0,405$
	11-49 %	13	11	15	
	> 50 %	6	9	3	

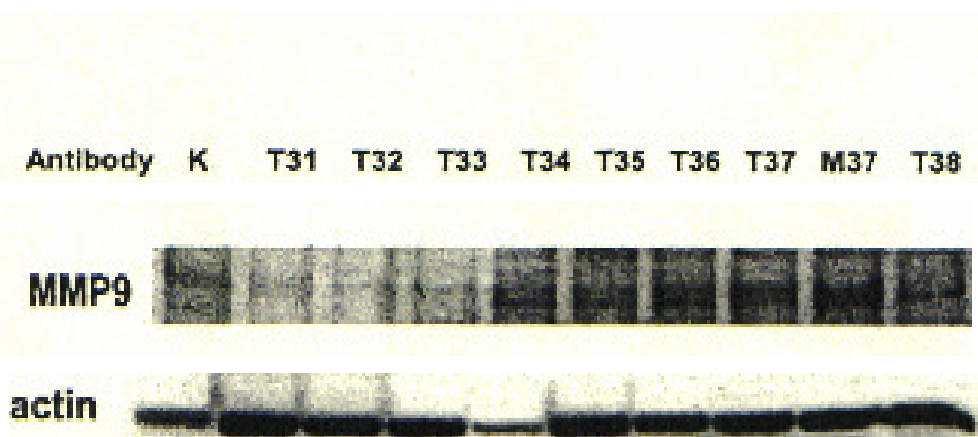
Tabelle 13: Assoziation zwischen der aktiven Form des MMP-1 und einigen klinischen Prognoseparametern; p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck hervorgehoben.

D 3 Ergebnisse für MMP-9

Bei der Matrixmetalloproteinase-9 handelt es sich um ein 92 kDa großes Protein. Die Expression von MMP-9 ließ sich in Höhe des zu erwartenden Molekulargewichtes mit einer spezifischen Bande bei 92 kDa darstellen. Es kam keine weitere Bande als Proenzym-Form zur Darstellung. Ein ausgewählter Tumor wurde als Bezug (100 %) bewertet und die Expressionswerte der weiteren Tumoren und der Zelllinien mit ihm verglichen.

D 3.1 Expression von MMP-9 in Tumoren

Mit Ausnahme von einem Tumor innerhalb der 75 untersuchten Tumoren konnte MMP-9 in allen Tumoren in unterschiedlicher Expressionsstärke nachgewiesen werden (s. Abbildung 8).



**Abbildung 8. Western Blot Analyse für MMP-9, sowie für Aktin in Mammakarzinomen;
K=Positivkontrolle, T=Tumor (aus Mammakarzinomgewebe)**

Nach densitometrischer Auswertung folgte die statistische Analyse und es wurden drei gleichgroße Gruppen mit schwacher ($n= 0-37 \%$), mäßiger ($n= 37,1-125 \%$) und starker ($n= >125,1 \%$) Expression von MMP-9 gebildet.

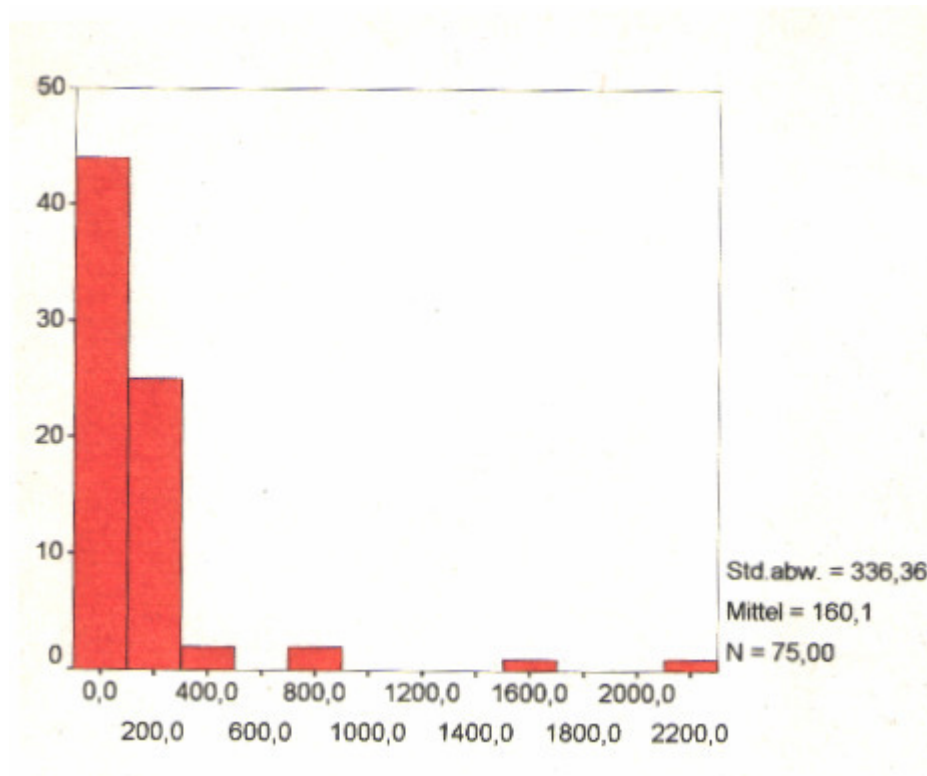


Diagramm 5. Verteilung der Expression von MMP-9 in Mammakarzinomen

D 3.2 Expression von MMP-9 in Zelllinien

MMP-9 war in allen drei Zelllinien gut nachweisbar. Die Expression in der Zelllinie T47D betrug bezogen auf die Kontrolle 28,9 %, MDA-MB-231 (19,5 %) und MCF-7 (19,39 %) exprimierten vergleichbar viel (s. Abbildung 9). Zwischen den untersuchten Zelllinien zeigten sich keine auffälligen Unterschiede.

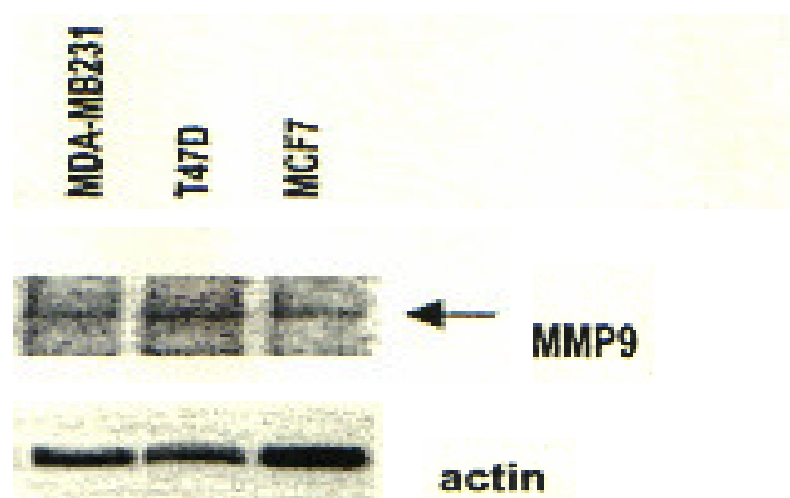


Abbildung 9. Expression von MMP-9, sowie von Aktin in den Zelllinien MDA-MB-231, T47D und MCF7

D 3.3 Korrelation von MMP-9 zu AP-1-Faktoren

Die statistische Auswertung ergab eine signifikante negative Korrelation von MMP-9 zu FosB und positive Korrelationen zu c-Fos, JunD, zur phosphorylierten Form von Fra-1 und zu Fra-2 (phosphorylierte Form **und** Totalprotein). Keine statistischen Beziehungen wurden zu c-Jun und JunB gefunden (s. Tabelle 14 und 15).

	MMP-9			
	niedrige Expr. (0-37 % d. Kontr.)	mittlere Expr. (37,1-125 % d. Kontr.)	hohe Expr. (>125 % d. Kontr.)	
c-Fos				
niedrige Expr. (0-9,5 % d. Kontr.)	17	14	8	
hohe Expr. (> 9,6 % d. Kontr.)	7	11	17	p= 0,023
FosB				
niedrige Expr. (0-50 % d. Kontr.)	14	5	18	
hohe Expr. (> 50 % d. Kontr.)	10	20	7	<i>p= 0,001</i>
Fra-1 (t)				
niedrige Expr.	12	12	8	
hohe Expr.	12	13	17	p= 0,374
Fra-1 (p)				
niedrige Expr.	20	17	10	
hohe Expr.	4	8	15	p= 0,006

Tabelle 14. Assoziation zwischen MMP-9 und AP-1-Faktoren c-Fos, FosB und Fra-1 (p=phosphoryliert, t=total); p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck und inverse Korrelationen sind kursiv hervorgehoben.

	MMP-9			
	niedrige Expr. (0-37 % d. Kontr.)	mittlere Expr. (37,1-125 % d. Kontr.)	hohe Expr. (>125 % d. Kontr.)	
Fra-2 (t)				
niedrige Expr. (0-25 % d. Kontr.)	18	10	7	
hohe Expr. (> 25 % d. Kontr.)	6	15	18	p= 0,003
Fra-2 (p)				
niedrige Expr. (0-20 % d. Kontr.)	18	9	9	
hohe Expr. (> 20 % d. Kontr.)	6	16	16	p= 0,007
JunD				
niedrige Expr. (0-175 % d. Kontr.)	19	12	6	
hohe Expr. (> 175 % d. Kontr.)	5	13	19	p= 0,001

Tabelle 15. Assoziation zwischen MMP-9 und AP-1-Faktoren Fra-2 (p=phosphoryliert, t=total) und JunD; p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck hervorgehoben.

D 3.4 Korrelation von MMP-9 zu klinischen Daten

Die statistische Analyse mit klinischen Daten erbrachte eine positive Korrelation von MMP-9 mit dem Lymphknotenstatus ($p=0,045$), das heißt überproportionale Expression von MMP-9 konnte mit einem positiven Lymphknotenbefall assoziiert werden (s. Tabelle 16).

MMP-9 zeigte zu keinem der anderen klinischen Prognoseparametern wie dem Hormonrezeptorstatus, histologischer Typ, Staging, Grading oder Ki67-Expression eine statistisch signifikante Korrelation.

		MMP-9		
		niedrige Expr. (0-37 % d. Kontr.)	mittlere Expr. (38-125 % d. Kontr.)	hohe Expr. (> 125 % d. Kontr.)
Grading	I-II	13	14	13
	III	12	12	13
p= 0,839				
Nodalstatus				
	negativ (n= 30)	13	13	5
	positiv (n= 37)	10	10	16
p= 0,045				
Ki67	< 10 %	7	7	3
	11-49 %	12	14	13
	> 50 %	5	4	9
p= 0,366				

Tabelle 16. Assoziation zwischen MMP-9 und einigen klinischen Prognoseparametern; p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck hervorgehoben.

D 4 Ergebnisse für PAI-1 und den PAI-1/uPA-Komplex

Die Serinprotease PAI-1 war in 73 Tumoren nachweisbar, in zwei Tumoren lag sie unterhalb der Nachweisgrenze. Als Kontrolle wurden HT1080-Zellen eingesetzt. Aufgrund der bekannten stabilen Bindungsverhältnisse von PAI-1 mit uPA und PAI-1 mit tPA ließen sich mit dem PAI-1-Antikörper neben der spezifischen Bande für PAI-1 bei 42 kDa zwei weitere schwächere Proteinbanden nachweisen. Somit konnte zusätzlich bei 100 kDa der PAI-1/uPA-Komplex separat zur Auswertung bestimmt werden.

Eine Bearbeitung der Bande für den PAI-1/tPa-Komplex (bei 110 kDa) fand in dieser Arbeit nicht statt.

D 4.1 Expression von PAI-1 in Tumoren

Die Expressionsstärke von PAI-1 in den Tumoren betrug 1-300 % im Vergleich zur Positivkontrolle. Zur statistischen Auswertung wurden drei gleichgroße Gruppen gebildet (niedrige Expression= 0-29 %, mittlere Expression= 29,1-60 % und hohe Expression= 60,1-300 %).

D 4.2 Expression von PAI-1/uPA-Komplex in Tumoren

Die Expression des PAI-1/uPA-Komplexes in den unterschiedlichen Tumoren betrug 0-270 % im Vergleich zur Kontrolle. Somit wurden zur statistischen Auswertung drei gleichgroße Gruppen gebildet (niedrige Expression= 1-9 %, mittlere Expression= 9,1-20 % und hohe Expression = >20%).

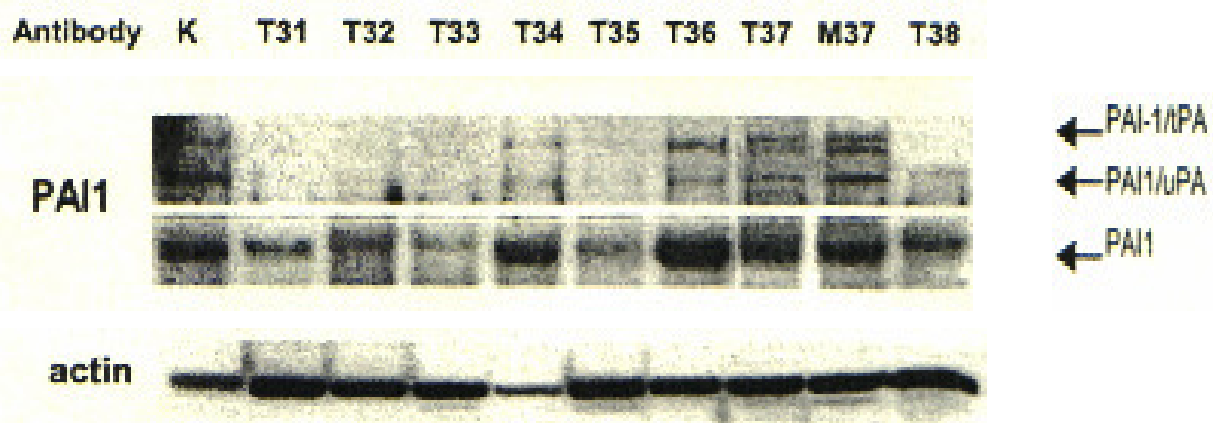


Abbildung 10. Western Blot Analyse für PAI-1/tPA-Komplex, PAI-1/uPA-Komplex, und PAI-1, sowie für Aktin. K=Positivkontrolle, T=Tumor (aus Mammakarzinomgewebe)

D 4.3 Expression von PAI-1 in den Zelllinien

Die Expressionsstärke des nicht-gebundenen PAI-1 war in den Zelllinien etwa vergleichbar hoch, wie in den Karzinomen. Die Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Zellen T47D exprimierten 103 % und MCF-7 99 % und die Steroidhormonrezeptor-negativen MDA-MB-231 61 % im Vergleich zur Positivkontrolle (s. Abbildung 11).

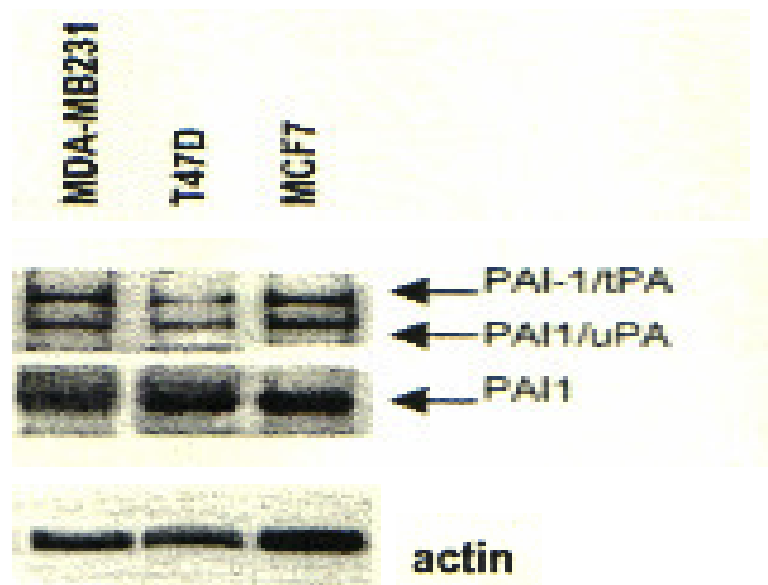


Abbildung 11. Expression von PAI-1/tPA-Komplex, PAI-1/uPA-Komplex und PAI-1, sowie für Aktin in den Zelllinien MDA-MB-231, T47D und MCF-7

D 4.5 Korrelation von PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex zu AP-1-Faktoren

Unter den AP-1-Faktoren zeigte Fra-2 (Totalprotein **und** phosphorylierte Form) eine signifikante Beziehung sowohl zu PAI-1, als auch zum PAI-1/uPA-Komplex, das heißt bei schwachem oder fehlenden Fra-2 war auch PAI-1 und der PAI-1/uPA-Komplex häufiger schwach. Die p-Werte sind in den Tabellen 17 und 18 dargestellt. Zu den anderen AP-1-Faktoren waren keine statistischen Auffälligkeiten errechnet worden.

	PAI-1		
	niedrige Expr. (<29 % d. Kontr.)	mittlere Expr. (29,1-60 % d. Kontr.)	hohe Expr. (>60 % d. Kontr.)
Fra-2 (p)			
niedrige Expr. (0-20 % d. Kontr.)	18	12	7
hohe Expr. (> 20 % d. Kontr.)	7	11	20 p= 0,004
Fra-2 (t)			
niedrige Expr. (0-25 % d. Kontr.)	17	10	9
hohe Expr. (> 25 % d. Kontr.)	8	13	18 p=0,038

Tabelle 17. Assoziation zwischen PAI-1 und Fra-2 (p=phosphoryliert, t=total); p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck hervorgehoben.

	PAI-1/uPA-Komplex		
	niedrige Expr. (<9 % d. Kontr.)	mittlere Expr. (9,1-20 % d. Kontr.)	hohe Expr. (>20 % d. Kontr.)
Fra-2 (p)			
niedrige Expr. (0-20 % d. Kontr.)	20	9	7
hohe Expr. (> 20 % d. Kontr.)	7	12	18 p= 0,003
Fra-2 (t)			
niedrige Expr. (0-25 % d. Kontr.)	21	8	5
hohe Expr. (> 25 % d. Kontr.)	6	13	20 p=<0,001

Tabelle 18. Assoziation zwischen PAI-1/uPA-Komplex und Fra-2 (p=phosphoryliert, t=total); p-Werte<0,05 sind durch Fettdruck hervorgehoben.

D 4.6 Korrelation von PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex zu klinischen Daten

Die statistische Analyse der Expression von PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex mit klinischen Prognoseparametern wie Steroidhormonrezeptorstatus, Tumorgrading, Lymphknotenbefall, Ki67 oder Rezidivbildung zeigte keine signifikanten Korrelationen.

D 5 Beziehungen der Proteasen untereinander

Die Korrelationsprüfungen der Proteasen MMP-1, MMP-9, PAI-1 und PAI-1/uPA-Komplex untereinander ergab eine inverse Korrelation zwischen der aktiven Form von MMP-1 zu PAI-1 mit einem p-Wert von 0,029 und eine positive Korrelation von MMP-9 zum PAI-1/uPA-Komplex mit einem p-Wert von 0,012.

E. DISKUSSION

Bei malignen Tumoren ist das Wachstum des Primärtumors von Ablösevorgängen und Ausbreitung der Tumorzellen im Organismus begleitet. Die entscheidende Voraussetzung zur Tumorzellinvasion und Metastasierung ist die Fähigkeit der Tumorzellen, die extrazelluläre Matrix zu durchdringen. Dieser Prozess wird durch verschiedenartige proteolytisch aktive Enzyme ermöglicht, die an der Tumorzelloberfläche lokalisiert sind oder von der Zelle sezerniert werden, wie Matrixmetalloproteinasen oder Enzyme des Plasminogenaktivator-Systems. So gibt es bereits einige Untersuchungen, die die klinische Relevanz dieser beiden Systeme überprüfen (Kapitel A.1.3.4 und A.1.4.5.). In den meisten klinischen Untersuchungen erfolgte hierbei die Bestimmung der Expression von einzelnen Proteinen, um ihre Beteiligung am Invasionsvorgang zu überprüfen. Anschliessend wurden die erhobenen Proteinmengen mit klinischen Daten und Prognosefaktoren verglichen.

In der vorliegenden Arbeit sollten Proteasen untersucht werden, deren Beteiligung am Invasionsgeschehen bereits beobachtet wurde und in deren Promoter AP-1-Bindungsstellen nachgewiesen wurden, um am klinischen Material von 75 humanen Mammakarzinomen zu überprüfen, ob die Metastasierung durch AP-1-Faktoren-abhängige Induktion der Proteasen beeinflusst wird. Untersuchungen über die transkriptionelle Regulation dieser Proteasen sind bislang überwiegend experimenteller Natur. Die Auswahl der einzelnen Proteasen trafen wir mit Hilfe der Kenntnisse aus der Literatur.

Brummer et al. beobachteten eine erhöhte MMP-1-Expression an der Invasionsfront in klinischen Mammakarzinomgewebe mittels in situ-Hybridisierung (Brummer et al., 1999). Eine Regulation der Gentranskription für MMP-1 durch AP-1-Faktoren wurde von Benbow et al., 1997 und Vincenti et al., 1996 beschrieben.

Die Matrixmetalloproteinase-9 zählt auf Grund der besonderen Fähigkeit die Basalmembran zu zerstören, zu den Proteasen, die die Invasionsfähigkeit des Tumors mit beeinflussen. So konnte in Mammakarzinomen eine erhöhte Expression von MMP-9 in prognostisch ungünstigeren Tumoren nachgewiesen werden (Ranuncolo et al., 2003; Li et al., 2004; Somiari et al., 2006). Eine Gen-Regulation am Promoter durch AP-1-Faktoren konnte in experimentellen Studien beobachtet werden (Gum et al., 1996; Yokoo et al., 1996).

Die prognostische Relevanz des Plasminogenaktivators uPA, sowie seines Inhibitor PAI-1 ist weitgehend anerkannt. Diese Faktoren haben sich bei Mammakarzinom-Patientinnen mit fehlendem Lymphknotenbefall als Indikatoren für eine höhere Rezidivneigung erwiesen (Prechtl et al., 2000; Jänicke et al., 1993) und scheinen daher ebenfalls am Invasionsgeschehen teil zu haben. Im uPA- und PAI-1-Gen konnten die in Kapitel A.1.4.4. und A.1.4.5. beschriebenen induzierbaren Regionen beobachtet werden, u.a. handelt es sich hierbei um AP-1-Bindungsstellen, welche eine transkriptionelle Regulation ermöglichen.

Somit zählen MMP-1, MMP-9, uPA und PAI-1 zu den AP-1-regulierten Genprodukten, welche in der Tumordinvasion aktiv sind. Ihre Untersuchung in klinischem Material von Mammakarzinomen im Vergleich zur Expression der Jun- und Fos-Proteine liess uns interessante Ergebnisse erwarten.

Die Expressionsstärken der untersuchten Proteine wurden mittels Westernblotanalysen ermittelt. Das Westernblotverfahren bot verschiedene Vorteile gegenüber immunhistochemischen Untersuchungen. Zum einen war es möglich die Gesamtmenge der jeweiligen Proteasen im klinischen Material zu bestimmen, ganz unabhängig davon, ob sie von Tumorzellen oder Stromazellen produziert wurden, denn für den Prozess der Tumordinvasion ist dieses nicht unmittelbar relevant. Und zum anderen konnten verschiedene Phosphorylierungsstadien (bei AP-1-Faktoren, Fra1 und Fra2) und Spaltprodukte (bei MMP-1) separat betrachtet und ausgewertet werden. Außerdem konnten die Ergebnisse objektiv densitometrisch quantifiziert werden.

Trotzdem darf man folgenden Nachteil nicht vergessen: solche Vorgehensweisen (auf Proteinebene) stehen immer vor dem Problem, dass die an bestimmten Lokalisationen nachgewiesenen Faktoren nicht unbedingt schon eine Aussage über deren Funktion und Implikation in den pathogenetischen Prozess erlauben. Es werden Momentaufnahmen gemacht, die man extrapoliert und so ein möglicherweise verzerrtes Bild der dynamischen molekularen Prozesse erhält, weil es an einer Möglichkeit der Langzeitbeobachtung fehlt.

Letztendlich ist das komplexe Schema von Interaktionen zwischen Epithelzellen, Stromazellen, Tumorzellen und EZM-Komponenten der Grund für deutliche Unterschiede zwischen Systemen *in vitro* und den realen Gegebenheiten *in vivo*.

AP-1-Faktoren

Die Ergebnisse der AP-1-Transkriptionsfaktoren-Expression im Mammakarzinomgewebe im Vergleich mit klinischen Daten zeigten interessante Auffälligkeiten für FosB, Fra-1, Fra-2 und c-Fos.

FosB

Für FosB konnten wir eine inverse Korrelation zu dem Proliferationsmarker Ki67 und eine positive Korrelation zum Östrogenrezeptorstatus errechnen. Dieses bestätigt die Ergebnisse aus der Arbeit Milde-Langosch et al., 2000.

Im Gegensatz zu der vorausgegangenen Arbeit am kleineren Patientenkollektiv (Bamberger et al., 1999) konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation zu Progesteronrezeptorstatus oder Grading errechnet werden.

In immunhistochemischen Arbeiten wurde die FosB-Expression in Progesteronrezeptor-positiven Zellen und HER2/neu schwachen bis negativen Zellen beobachtet (Bamberger et al., 2000; Milde-Langosch 2003). Der Nachweis von FosB-mRNA gelang in Mamma-Normalgewebe und gut-differenzierten Tumoren, wobei in schlecht-differenzierten Tumoren die FosB-Expression schwach bis negativ ausfiel (Milde-Langosch 2003).

In Mammakarzinom-Zelllinien wurde von Bamberger et al. eine hohe FosB-Expression in der Steroidhormonrezeptor-positiven MCF-7 Zelllinie bei schwacher bis fehlender FosB-Expression in der Steroidhormonrezeptor-negativen, hoch invasiven MDA-MB-231 Zelllinie, eindrucksvoll dargestellt (Bamberger et al., 1999).

Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf erhöhte FosB-Expression in prognostisch günstigeren Tumoren hin.

Die Ki67-Expression in Tumoren beschreibt das Proliferationsverhalten des Gewebes, so dass eine starke Expression in prognostisch ungünstigeren Tumoren nachweisbar ist. Die von uns

errechnete inverse Korrelation von FosB zu Ki67 ist somit im Einklang mit den o.g. Arbeiten und unterstützt die Annahme, dass FosB in prognostisch günstigeren Tumoren vorhanden ist.

Fra-1

Für das Fra-1-Protein konnten verschiedene Phosphorylierungsstadien beobachtet werden. So ist die Expression von Fra-1 in der MDA-MB-231-Zelllinie auf Proteinbanden zwischen 33 kDa und 44 kDa erkennbar. In T47D-Zellen fehlten diese Banden (Bamberger et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit ließen sich im klinischen Material mit Hilfe des spezifischen Antikörpers für Fra-1 zwei Banden zwischen 33 kDa und 36,5 kDa darstellen. Die Spezifität des Antikörpers konnte mittels Blocking-versuche gesichert werden. In der Kenntnis, dass das Fra-1-Protein posttranslational durch Kinasen (PKA, PKC oder MAPK) phosphoryliert wird (Gruda et al., 1994) nehmen wir an, dass diese Banden Stadien geringerer Phosphorylierung in Tumoren repräsentieren. In der densitometrischen Auswertung von Fra-1 wurden zum einen die Gesamtproteinmenge und zum anderen die langsamer wandernde, phosphorylierte Fra-1-Form bestimmt und statistisch separat ausgewertet.

Die Fra-1-Expression war in Tumoren mit einem höheren Grading und erhöhter Ki67-Expression verstärkt nachzuweisen, beides Parameter in ungünstigeren Tumoren. Ausserdem bestand eine inverse Korrelation des Gesamtproteins und dem phosphorylierten Protein Fra-1 zu dem Östrogenrezeptorstatus. Auch dieses Ergebnis bestärkt die Annahme, dass die Anwesenheit von Fra-1 auf einen schlechter differenzierten, prognostisch ungünstigeren Tumortyp hinweist, denn ein positiver Östrogenrezeptor ist meist in gut-differenzierten Tumoren aufzufinden. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Arbeiten von Bamberger et al., 1999 und Milde-Langosch et al., 2000.

Neben den erwähnten Korrelationen zu klinischen Daten konnte in dieser Arbeit für das phosphorylierte Fra-1 eine positive Korrelation zum Lymphknoten-Status gezeigt werden. So beobachteten wir erhöhte Fra-1-Expression in Mammakarzinomen, welche einen Lymphknoten-Befall aufwiesen. Auch diese Beobachtung bestärkt die Annahme, dass die Fra-1-Expression in Mammakarzinomen mit prognostisch ungünstigeren Eigenschaften erhöht vorliegt.

Ähnliche Beobachtungen wurden in experimentellen Studien beschrieben. So war in menschlichen Brustkrebszelllinien die erhöhte Fra-1-Präsenz in aggressiveren Tumoren nachweisbar (Philips et al., 1998). In der „cDNA array“ Studie an vier hochinvasiven und neun schwach invasiven Brustkrebszelllinien gelang es Zajchowski et al., vierundzwanzig Gene zu identifizieren, welche unterschiedlich exprimiert wurden. Unter den hoch invasiven Zellen ließ sich eine signifikant höhere Expression von Fra-1 darstellen (Zajchowski et al., 2001).

In Transfektionsstudien an menschlichen Brustkrebszellen wurde die Invasionsfähigkeit von MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen durch verstärkte Fra-1-Expression deutlich gesteigert (Milde-Langosch et al., 2004).

Belguise et al. führten ebenfalls Transfektionsstudien an menschlichen Brustkrebszellen durch und konnten dieselben Beobachtungen machen. Auch sie sahen eine gesteigerte Invasionsfähigkeit in MCF-7-Zellen durch Fra-1. Aber noch eindrucksvoller war die reduzierte Invasionsfähigkeit nach Stilllegung von Fra-1-Aktivität in MDA-MB-231-Zellen mittels Antisense-mRNA (Belguise et al., 2005). Dieses unterstützt die Annahme aus unserer Arbeit, dass Fra-1 eine entscheidende Rolle in der Invasion von Mammakarzinomen einnimmt.

An dieser Stelle sollte allerdings kritisch erwähnt werden, dass die Menge an Fra-1 in dem von uns untersuchten klinischem Material nur gering war. Die elektrophoretische Auftrennung zeigt außerdem, dass das Fra-1-Protein im Tumorgewebe nicht so hoch-phosphoryliert vorliegt, wie in den Zelllinien.

Fra-2

In der Auswertung der Daten von Fra-2 wurden, ähnlich wie für Fra-1, die Gesamtproteinmenge von Fra-2 und eine phosphorylierte Form separat betrachtet.

Hierbei ergab sich für die phosphorylierte Form von Fra-2 eine signifikante positive Korrelation mit dem frühen Auftreten eines Rezidivs. Dieses könnte darauf hinweisen, dass hohe Expression von aktivem Fra-2 den Tumorprogress beeinflusst.

Unterstützend hierzu sind in der Arbeit von Milde-Langosch et al. positive Korrelationen von Fra-2 zu dem Zellzyklus-regulierenden Protein Cyclin E beschrieben, ein Protein, welches in Tumoren mit ungünstigerer Prognose verstärkt vorkommt (Milde-Langosch et al., 2000).

Die Fra-2-Expression in den hochinvasiven MDA-MB-231-Zellen ist sehr stark, wohingegen sie in den T47D-Zellen sehr schwach zur Darstellung kommt (Bamberger et al., 1999).

Um die Rolle von Fra-2 im Tumorprogress weiter zu untersuchen, sind inzwischen auch Transfektionsstudien erfolgt. Hier konnte eine deutliche Steigerung der Invasionsfähigkeit von MDA-MB-231-Zellen und MCF-7-Zellen durch den Einfluss von Fra-2 beobachtet werden. Das Inhibieren der Fra-2-Expression mittels si-RNA in MDA-MB-231-Zellen führte zu einer deutlich rückläufigen Invasionsfähigkeit in der Zellkultur (Milde-Langosch et al., 2006).

Diese Ergebnisse lassen, vergleichbar mit Fra-1, annehmen, dass auch Fra-2 eine wichtige Rolle in der Invasivität der Zellen haben könnte.

c-Fos

Nach dem Nachweis von c-Fos in den untersuchten Mammakarzinomen konnte in der statistischen Auswertung eine signifikante positive Korrelation mit dem Tumorstadium und eine nicht-signifikante Assoziation mit einem positiven Lymphknotenbefall ($p= 0,056$) errechnet werden.

Somit lässt sich auch für c-Fos eine Assoziation mit eher prognostisch ungünstigeren Tumoren vermuten. Unterstützend zu unseren Ergebnissen zeigten vorherige Arbeiten positive Korrelationen von c-Fos zu Cyclin E, welches in Mammakarzinomen ein Marker einer ungünstigeren Prognose ist (Milde-Langosch et al., 2000).

In humanen Mammakarzinom-Zelllinien konnte eine starke c-Fos-Expression in den hochinvasiven MDA-MB-231-Zellen nachgewiesen werden, bei geringerer Expression in den Steroidhormonrezeptor-positiven T47D-Zellen (Bamberger et al., 1999).

In Transfektionsstudien konnte das invasive Potential sowohl der MDA-MB-231-Zellen, als auch der MCF-7-Zellen mittels Induktion durch c-Fos erheblich gesteigert werden (Milde-Langosch et al., 2004).

Insgesamt könnten diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass das c-Fos-Protein als Induktor, bzw. Regulator am Invasionsprozess von Mammakarzinomzellen *in vivo* beteiligt ist.

Der Beitrag dieser Arbeit wird es sein, Korrelationen zu invasionsaktiven Proteasen vorzunehmen.

MMP-1

Bei dem Nachweis von MMP-1 in den hier untersuchten Mammakarzinomen konnte eine Proenzym-Form von einer aktiven Form unterschieden werden. Die statistische Analyse ergab interessanterweise positive Korrelationen zwischen Pro-MMP-1 und FosB sowie der phosphorylierten Form von Fra-2.

Für die aktive Form von MMP-1 fanden sich negative Korrelationen zu c-Fos und eine positive Korrelation zu FosB und c-Jun. Somit ist eine hohe MMP-1-Aktivität mit schwacher Präsenz, bzw. Fehlen von c-Fos und starker Expression von FosB und c-Jun vergesellschaftet.

Die signifikanten Korrelationen, sowohl der Proenzym-Form als auch der aktiven Form von MMP-1 zu FosB waren für uns anfangs sehr überraschend, da die Expression von FosB eher in prognostisch günstigeren Tumoren nachweisbar war. Anhand der Datenlage (siehe weiter unten) haben wir die verstärkte Expression von MMP-1 in aggressiveren Tumoren mit prognostisch ungünstigerem Verlauf erwartet. Um zu prüfen, ob eine direkte Induktion der MMP-1-Expression durch FosB stattfindet, wurden Transfektionsversuche von Milde-Langosch et al. durchgeführt. Es konnte keine verstärkte MMP-1-Expression beobachtet werden (Milde-Langosch et al., 2004).

Die inverse Korrelation zu c-Fos und somit die schwache Expression von MMP-1 bei hoher c-Fos-Expression verstärkte aber in Anbetracht der Kenntnisse über c-Fos die Annahme, dass MMP-1 eher in weniger invasiven Tumoren vorkommt.

Die Korrelation zu c-Jun liess in dieser Arbeit keine Besonderheiten für die Prognose herleiten, da die Untersuchungen am c-Jun-Protein keine anderen statistischen Auffälligkeiten zu klinischen Daten oder anderen untersuchten Proteasen aufwiesen.

In der Literatur-Recherche lassen sich aber Untersuchungen finden, die mittels Transfektionsstudien gezeigt haben, dass der Induktion der MMP-1-Genexpression durch verschiedene Stimuli eine Induktion von c-Jun-mRNA vorausging. Ergänzend hierzu liess sich unter Expression von si-mRNA für c-Jun die MMP-1-Genexpression aufheben (Kähäri et al., 1997; Vincenti et al., 1996; Benbow et al., 1997). Außerdem ist c-Jun fähig als Jun/Jun Homodimer die MMP-1 Promoter-Aktivität zu induzieren (Chiu et al., 1989; Bergelson et al., 1994). Diese Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen passen gut zu der auffälligen Korrelation von c-Jun und MMP-1 in dieser Arbeit. So wäre eine Regulation des MMP-1-Promoters durch c-Jun in Mammakarzinomen durchaus denkbar. Um dieses genauer zu prüfen, wären Transfektionsversuche sinnvoll.

Untersuchungen an den hochinvasiven Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 zeigten nur schwache Expression von MMP-1, wohingegen die Steroidhormonrezeptor-positiven Zelllinien T47D und MCF-7 eine starke Expression aufwiesen.

Passend zu den Korrelationen von MMP-1 zu den AP-1-Faktoren ergaben sich im Vergleich mit den klinischen Daten ebenfalls positive statistische Beziehungen mit prognostisch günstigen Parametern des Mammakarzinomes. Somit waren unter den nodalnegativen Tumoren auffällig hohe Expressionswerte von MMP-1 nachweisbar.

Anders als in unserer Studie konnten Murray et al. besonders eindrücklich den Einfluss von MMP-1 auf die Tumorprogression bei kolorektalen Karzinomen mit eindeutiger und signifikanter Abhängigkeit von den Dukes Stadien zeigen, wobei eine erhöhte MMP-1-Expression mit einer deutlich schlechteren Prognose vergesellschaftet war (Murray et al., 1996). Ähnliche Beziehungen von MMP-1 zur Überlebensrate ist für viele verschiedene Karzinome beschrieben (Brinckerhoff et al., 2000), wobei die Beteiligung von MMP-1 in klinischem Material von **Mammakarzinomen** bislang nur wenig untersucht ist.

Divergierende Ergebnisse in Tumoren unterschiedlicher histogenetischer Herkunft sind immer wieder zu beobachten, was durch eine zell- und gewebsspezifische Wirkung der Matrixmetalloproteinasen erklärbar wäre.

So konnte inzwischen in Transfektionsstudien an MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen eine Induktion der MMP-1 Expression durch Fra-1 beschrieben (Belguise et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation zu Fra-1 nachgewiesen werden. Außerdem fanden sich hohe MMP-1-Expressionen in Tumoren mit weniger invasivem Potential und wie weiter oben beschrieben ist, führt die Überexpression von Fra-1 zu einer gesteigerten Invasivität der Zelllinien. So sind die *in vitro* an Zellkulturen gemachten Beobachtungen mit den von uns im klinischen Material beobachteten Ergebnissen nicht im Einklang. Die von uns gemachten Beobachtungen sollten in größeren Studien am klinischen Material von Mammakarzinomen kontrolliert werden.

MMP-9

MMP-9 konnte bereits in verschiedenen Studien als negativer prognostischer Indikator des Mammakarzinomes gedeutet werden (Kupfermann et al., 2000; Toi et al., 1998). Auch Daidone et al. konnten eine immunhistochemische Überexpression von MMP-9 entdecken, die mit einem loko-regionalen Rezidiv bei nodalnegativen Mammakarzinom-Patienten positiv korrelierte (Daidone et al., 1991). Somiari et al. konnten erhöhte MMP-9-Serumkonzentrationen bei Vorliegen eines prognostisch ungünstigeren Mammakarzinomes nachweisen (Somiari et al., 2006).

In dieser Arbeit konnten diese Beobachtungen unterstützt werden. Es waren Korrelationen zwischen der Überexpression von MMP-9 mit einem positiven Lymphknotenbefall nachweisbar, was darauf hinweist, dass MMP-9 an der Invasion von Mammakarzinomen beteiligt ist. In der statistischen Analyse mit den einzelnen AP-1-Faktoren ergaben sich positive Korrelationen zu c-Fos, der phosphorylierten Form von Fra1 und Fra2, JunD und eine inverse Beziehung zu FosB. Vor dem Hintergrund der bisherigen Erkenntnisse über AP-1-Proteine in Mammakarzinomen (s.o.), spricht die genannte Konstellation dafür, dass die

MMP-9-Expression in eher prognostisch ungünstigeren Tumoren erhöht ist und die Regulation durch c-Fos, Fra-1, Fra-2, junD oder FosB möglich ist.

Um eine direkte Induktion des MMP-9-Promoters durch die genannten Fos-Proteine zu überprüfen, sind Transfektionsstudien erfolgt. Es konnte keine up-Regulation der MMP-9-Expression durch Fra-1, Fra-2 oder FosB beobachtet werden. Nur die Cotransfektion mit c-Fos führte zu einer 1,7fachen Steigerung der MMP-9-Promoter-Aktivität in MCF-7-Zellen, wohingegen diese Veränderung in MDA-MB-231-Zellen nicht beobachtet werden konnte (Milde-Langosch et al., 2004). Die von uns beobachteten Korrelationen im klinischen Material von Mammakarzinomen sind wahrscheinlich nicht durch eine direkte Transaktivierung am MMP-9-Promoter durch die Fos-Proteine entstanden, sondern als Resultat einer gemeinsamen up-Regulation durch einen komplexeren Mechanismus während des Tumorprogresses zu verstehen.

Plasminogenaktivator-System

In dieser Arbeit wurde die Expression von PAI-1 in den Mammakarzinom-Gewebeproben und den einzelnen Zelllinien bestimmt. Eine separate Darstellung des uPA-Moleküles gelang trotz intensiver Bemühungen und Austestung mit verschiedenen Antikörpern nicht. Stattdessen konnte die Menge des stabilen PAI-1/uPA-Komplexes densitometrisch und statistisch ausgewertet werden, wobei die Menge des PAI-1/uPA-Komplexes bei ausreichender Expression von PAI-1 möglicherweise einen Hinweis auf die Stärke der uPA-Expression gibt.

Erhöhte uPA-Konzentrationen in Mammakarzinomen deuten auf eine schlechte Prognose (Foekens et al, 2000). Inzwischen konnten klinische Studien zeigen, dass erhöhte Konzentrationen von PAI-1 sogar eine stärkere Aussagekraft hinsichtlich einer schlechten Prognose von Mammakarzinomen haben als uPA. Hierfür werden vor allem die nicht-proteolytischen Eigenschaften von PAI-1 (s. Kapitel A.1.4.2.) verantwortlich gemacht (Deng et al., 1996; Chazaud et al., 2002). Für den PAI-1/uPA-Komplex konnte ebenfalls eine prognostische Aussagekraft nachgewiesen werden. So konnten Manders et al. in einer retrospektiven Studie an 576 Mammakarzinom-Fällen eine signifikante Korrelation von dem PAI-1/uPA-Komplex zu Prognoseparametern (Steroidhormonrezeptor, Grading) nachweisen,

die für eine ungünstige Tumorprogression stehen. Tumoren mit erhöhter PAI-1/uPA-Komplex-Menge hatten eine erhöhte Gefahr der Lymphknotenmetastasierung (Manders et al., 2004).

Entgegen diesen Beobachtungen zeigten die Ergebnisse der Westernblotanalyse für PAI-1 und den PAI-1/uPA-Komplex in dieser Arbeit keine signifikanten Korrelationen mit klinischen Prognoseparametern wie Hormonrezeptorstatus, Tumorgrading, Lymphknotenbefall, Ki67 oder Rezidivbildung.

Im Vergleich der Proteasen untereinander konnte eine inverse Korrelation von PAI-1 zu der aktiven Form von MMP-1 gezeigt werden. Auf Grund der Annahme, dass erhöhte MMP-1-Expression in dieser Arbeit in Tumoren mit prognostisch günstigerem Verlauf vorliegt, bedeutet dieses Ergebnis, dass die Anwesenheit von PAI-1 auf prognostisch ungünstigere Tumortypen hinweist. Desweiteren bestand eine positive Korrelation von PAI-1/uPA-Komplex zu MMP-9. Die Expression von MMP-9 war in dieser Arbeit in prognostisch ungünstigeren Tumoren erhöht, so dass eine gemeinsame Induktion dieser beiden invasionsfördernden Proteasen möglich ist.

Im statistischen Vergleich mit den AP-1-Faktoren konnten signifikante Korrelationen für beide messbaren Formen von Fra-2 (Gesamtprotein und phosphoryliertes Protein) sowohl mit PAI-1, als auch mit dem PAI-1/uPA-Komplex nachgewiesen werden.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit erhöhte Fra-2-Expression in Mammakarzinomen mit einer erhöhten Rezidivrate nachgewiesen werden konnten, überrascht dieses Ergebnis nicht. So wird es interessant sein in Transfektionsstudien zu überprüfen, ob diese statistische Auffälligkeit auf eine direkte Promoter-Induktion am PAI-1-Gen durch Fra-2 zurückzuführen ist.

F. Zusammenfassung

Die Identifizierung von molekularen Regulationsmechanismen während der Tumorzell-Invasion und Metastasierung in Mammakarzinomen stellt eine Möglichkeit zur Verbesserung sowohl diagnostischer als auch therapeutischer Ansätze in der Behandlung von Brustkrebs dar. Als Beitrag für das Verständnis dieser Regulationsmechanismen konnten in der vorliegenden Arbeit einige interessante Ergebnisse zur Rolle der Transkriptionsfaktoren der Fos-Familie beobachtet werden:

Im statistischen Vergleich der einzelnen AP-1-Proteine mit klinischen Daten von Mammakarzinomen liess sich eine erhöhte FosB-Expressionen in gut differenzierten, prognostisch günstigeren Tumoren nachweisen. Im Gegensatz hierzu war Fra-1 in nodalpositiven Mammakarzinomen vermehrt aufzufinden, und Fra-2 war assoziiert mit dem frühen Auftreten eines Rezidives. C-Fos zeigte eine signifikante positive Korrelation mit dem Tumorstadium und eine nicht-signifikante Assoziation mit einem positiven Lymphknotenbefall. Somit war die Expression der drei letzteren genannten AP-1-Proteine in prognostisch ungünstigeren Tumoren erhöht.

Die Untersuchung der Invasions-assoziierten Proteine MMP-1, MMP-9 und PAI-1 zeigte eine vermehrte Expression von MMP-1 in nodalnegativen Tumoren, MMP-9 war dagegen in nodalpositiven Karzinomen erhöht nachweisbar. Für PAI-1 oder den PAI-1/uPA-Komplex ergaben sich keine statistischen Auffälligkeiten mit klinischen Daten.

Der statistische Vergleich mit einzelnen AP-1-Proteinen ergab für MMP-1 eine positive Korrelation zu FosB und eine negative Korrelation zu c-Fos. Für MMP-9 ergaben sich positive Korrelationen zu Fra-1 und Fra-2 und eine inverse Beziehung zu FosB. Für PAI-1 und den PAI-1/uPA-Komplex liessen sich positive Korrelationen mit Fra-2 nachweisen. Dies spricht für eine direkte oder indirekte Aktivierung der MMP9- und PAI-1-Expression durch Fra-1 oder Fra-2 in prognostisch ungünstigeren Tumoren.

Insgesamt liefern die hier dargestellten Ergebnisse Hinweise darauf, wie es durch Veränderungen in der Expression von AP-1-Transkriptionsfaktoren der Fos-Familie zur Regulation von Invasions-assoziierten Proteinen und damit zu einer Tumorprogression kommen kann.

G. LITERATURVERZEICHNIS

Allan JA, Hembry RM, Angal S, et al. (1991) Binding of latent and high M_r active forms of stromalysin to collagen is mediated by the C-terminal domain. *J Cell Sci.*, 99: 789-795

Andreasen PA, Sottrup-Jensen L, Kjøller L, Nykjær A, Moestrup SK, Munch C, Petersen and Gliemann J (1994) Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett.* 338: 293-245

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

Andreasen PA, Egelund R and Petersen HH (2000) The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57: 25-40

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

Appella E and Blasi F (1990) Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J* 9: 467-474

Arai, Y, Kubota T, Nakagawa T, Kabuto M, Sato K and Kobayashi H (1998) Production of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI 1) in human brain tumours. *Acta Neurochir*, 140(4): p.377- 85

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut (2004) Krebs in Deutschland-Häufigkeiten und Trends. 4.überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken

-
- Astedt B and Holmberg L (1976) Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature* 261: 595
- Aumailley M, Gayraud B (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix *J Mol Med*, 76: 253-65
- Baker EA, Bergin FG and Leaper DJ (2000) Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. *Mol. Pathol.* 53: 307-312
- Bamberger AM, Methner C, Lisboa BW, Städtler C, Schulte HM, Löning T, Milde-Langosch K (1999) Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor positive phenotype. *Int J Cancer* 84: 553-558
- Bamberger AM, Milde Langosch K, Schulte HM, et al. (2000) Progesterone receptor isoforms PR-B and PR-A in breast cancer: correlations with clinico-pathologic tumour parameters and expression of AP-1 factors. *Hormone Res* 54: 32-37
- Bamberger AM, Milde-Langosch K, Rössing E, et al. (2001) Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlation with cell cycle regulators. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127: 545-550
- Bani MR, Nicoletti MI, Alkharouf NW, et al. (2004) Gene expression correlating with response to paclitaxel in ovarian carcinoma xenografts. *Mol Cancer Ther* 3: 111-121
- Baragi VM, Fliszar CJ, Conroy MC, et al. (1994) Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. C-terminal truncated stromelysin and matrilysin exhibit equally compromised binding affinities as compared for full-length stromelysin. *J Biol Chem*, 269: 12692-12697
- Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq JP and Rio MC (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol*, 15: 535-541

-
- Belguise K, Kersual N, Galtier F, Chalbos D (2005) Fra-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene* 24: 1434-1444
- Benbow U and Brinckerhoff C (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about? *Matrix Biol* 15: 519-526
- Beers WH, Strickland S and Reich E (1975) Ovarian plasminogen activator: relationship to ovulation and hormonal regulation. *Cell*, 6(3): p.387-94
- Bergelson S and Daniel V (1994) Cooperative interaction between ets and AP-1 transcription factors regulates induction of glutathione S-transferase Ya gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 290-297
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z and Hanahan D (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis, *Nat.Cell Biol.* 2: 737-744
- Berthelsen J, Vandekerkhove J and Blasi F (1996) Purification and characterization of UEF3, a novel factor involved in the regulation of the urokinase and other AP-1 controlled promoters. *J Biol Chem* 271: 3822–3830
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, et al. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250
- Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, et al. (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*, 55: 434-9
- Blankenstein MA (1997) Biochemical assessment of tissue prognostic factors in breast cancer. *Breast* 6: 31-37
- Böcker W, Denk, Heitz (1997) Pathologie. Verlag Urban & Schwarzenberg, 1997

- Bohuslav J, Horejsi V, Hansmann C, Stöckl J, Weidle UH, Majdic O, Bartke I, Knapp W and Stockinger H (1995) Urokinase plasminogen activator receptor, β 2-integrin and src-kinases within a single receptor complex of human monocytes.
J Exp Med 181: 1381-1390
- Bolon I, Gouyer V, Devouassoux M, Vandebunder B, Wernert N, Moro D, Brambilla C and Brambilla E (1995) Expression of c-ets-1, collagenase 1 and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* 147: 1298-1310
- Bolon I, Brambilla E, Vandebunder B, Robert C, Lantuejoul S and Brambilla C (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
- Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.*, 342: 525-33
- Brinckerhoff CE, Rutter JL and Benbow U (2000) *Clin. Cancer Res.* 6: 4823-4830
- Brown PD (1998) Synthetic inhibitors of matrix metalloproteinases.
In: Parks WC, Mecham RP eds. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego, CA: Academic Press: 1998; 243-62
- Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Löning T, Herbst H (1999): Matrix-metalloproteinase 1, 2 and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 453: 566-573
- Bundesministerium für Gesundheit, Pressemitteilung vom 22. September 2006, Nr.110
- Carrere S, Verger A, Flourens A, Stehelin D and Duterque-Coquillaud M (1998) Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* 16: 3261- 3268

-
- Chambers AF and Matrisian LM (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.*, 89: 1260-1270
- Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Vague P and Juhan-Vague I (2000) Formation, inhibition and clearance of plasmin in vivo. *Haemostasis*, 30(4): p.204
- Chapman HA (1997) Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. Review, 67 refs. *Curr. Opin. in Cell Biology*, 9: 714-724
- Chazaud B, Ricoux R, Christov C, Plonquet A, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G (2002) Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. *Am J Pathol*, 160: 237-246
- Chiu R, Angel P and Karin M (1989) Jun-B differs in its biological properties from and is a negative regulator of c-jun. *Cell* 59: 979-986
- Cirillo G, Casalino L, Vallone D, Caracciolo A, De Cesare D, Verde P (1999) Role of distinct mitogen-activated protein kinase pathways and cooperation between Ets-2, ATF-2, and Jun family members in human urokinase-type plasminogen activator gene induction by Interleukin-1 and tetradecanoyl phorbol acetate. *Molec. and cell. Biol.* Sept. 1999, p.6240-6252
- Clark IM, Powell LK and Cawston TE (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) stimulates the secretion of collagenase from human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 203(2): p.874-80
- Clavel C, Chavanel G and Birembaut P (1986) *Cancer Res* 46: 5743
- Cohen DR and Curran T (1988) Fra 1: A serum inducible cellular immediate early gene that encodes a Fos-related antigen. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2063-2069
- Conese M, Nykjaer A, Petersen CM, Cremona O, Pardi R, Andreasen PA, Gliemann J, Christensen EI and Blasi F (1995) *J. Cell Biol.* 131: 1609-1622

-
- Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA and Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization, *J.Immunol.* 161 [12]: 6845-6852
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations, *Science*, 295 (5564): 2387-92. Review
- Crawford HC and Matrisian LM (1996) Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enz. Prot.*, 49: 20-37
- Cubellis MV, Wun TC and Blasi F (1990) Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *Embo J*, 9: 1079-1085
- Daidone MG, Silvestrini R, D'Errico A, Di Fronzo G, Benini E, Mancini AM, Garbisa S, Liotta LA and Grigioni WF (1991) Laminin receptors, collagenase IV and prognosis in node- negative breast cancer. *Int. J. Cancer*, 48: 529-532
- Dang CV and Semenza GL (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trend Biochem Sci* 24: 68-72
- Danø K, Andreasen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS and Skriver L (1985) Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44: 139-266
- De Cesare D, Palazzolo M and Blasi F (1996) Functional characterization of COM, a DNA region required for cooperation between AP-1 sites in urokinase gene transcription. *Oncogene* 13: 2551-2562
- De Cesare D, Palazzolo M, Berthelsen J and Blasi F (1997) Characterization of UEF-4, a DNA-binding protein required for transcriptional synergism between two AP-1 sites in the human urokinase enhancer. *J. Biol. Chem.* 272: 23921-23929

-
- DeClerck YA, Yean TD, Lee Y, et al. (1993) Characterization of the functional domain of tissue inhibitor of metalloproteinases- 2 (TIMP-2). *Biochem. J.*, 289: 65-69
- Deng G, Waltz DA, Navaneetha R, Drummond RJ, Rosenberg S and Chapman HA (1994) Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J. Biol. Chem.* 169: 32380-32388
- Deng G, Curriden A, Wang A, Rosenberg S and Loskutoff DJ (1996) Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J. Cell Biol.* 134: 1563-1571
- Dong Z, Kumar R, Yang X and Fidler IJ (1997) *Cell* 88: 801
- D’Orazio D, Besser D, Marksitzer R, Kunz C, Hume DA, Kiefer B and Nagamine Y (1997) Cooperation of two PEA3/AP1 sites in uPA gene induction by TPA and FGF-2. *Gene* 201: 179–187
- Doyle GAR, Pierce RA and Parks WC (1997) Transcriptional induction of collagenase-1 in differentiated monocyte-like (U937) cells is regulated by AP-1 and an upstream C/EBP- β site. *J. Biol. Chem.* 272: 11840-11849
- Dublin E, Hanby A, Patel NK, Liebman R and Barnes D (2000) Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma. Fibroblastic expression has strong associations with tumor pathology. *Am J Pathol.* 157(4): p.1219-27
- Duffy MJ, O’Grady P, Devaney D, O’Siorain L, Fennelly JJ and Lijnen HJ (1988) Urokinase plasminogen activator, a marker for aggressive breast cancers. Preliminary report. *Cancer (Phil.)*, 62: 531-533
- Duffy MJ, Reilley D, O’Sullivan C, O’Higgins N, Fennelly JN and Andreasen P (1990) Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.* 50: 6827-6829
- Duffy MJ (1996): Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res* 2: 613-618

- Dumler I, Petri T and Schleuning WD (1993) Interaction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) with its cellular receptor (u-PAR) induces phosphorylation on tyrosine of a 38 kDa protein. *FEBS Lett.* 322: 37-40
- Dumler I, Petri T and Schleuning WD (1994) Induction of c-fos in human ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* 343:103-106
- Dumler I, Weis A, Mayboroda OA, Maasch C, Jerke U, Haller H and Gulba DC (1998) The JAK/ STAT pathway and urokinase receptor signaling in human vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273: 315-321
- Dumler I, Kopmann A, Weis A, Mayboroda OA, Wagner K, Gulba DC and Haller H (1999) Urokinase activates the Jak/Stat signal transduction pathway in human vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 290-297
- Ellis V, Wun TC, Behrendt N, Ronne E and Dano K (1990) Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen-activator inhibitors. *J Biol Chem*, 265(17): p.9904-8
- Ellis V, Behrendt N and Dano K (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 12752- 12758
- Ellis V and Dano K (1992) The urokinase receptor and the regulation of cell surface plasminogen activation. *Fibrinolysis* 6: 27
- Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410
- Engel CJ, Bennet ST, Chambers AF, Doig GS, Kerkvliet N and O'Malley FP (1996) Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for dukes staging. *Am J Surg Pathol* 20(10): 1260-65

-
- Erickson LA, Ginsberg MH and Loskutoff DH (1984) Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J. Clin. Invest.* 74: 1465-1472
- Erickson LA, Hekman CM and Loskutoff DH (1985) The primary plasminogen activator inhibitors in endothelial cells, platelets, serum and plasma are immunologically related. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8710-8714
- Estreicher A, Muhlhauser J, Carpentier JI, Orei L and Vassalli JD (1990) *J. Cell Biol.* 111: 783-792
- Fernö M, Borg A, Killander D, Hirschberg L, Brundell J (1994) Urokinase plasminogen activator as prognostic factor in breast cancer: measured with a novel immunoluminometric assay suited for routine use. *Breast cancer Res Treat* 32: 30
- Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE (1998) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: Parks WC, Mecham RP, eds. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego, CA: Academic Press, 1998: 300-56
- Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Bontebal M, Jänicke F and Klijn JGM (1992) Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res.* 52: 6101-6105
- Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Jänicke F and Klijn JGM (1994) Plasminogen activator inhibitor-1 and breast cancer metastasis. *J Clin Oncol* 12: 1648-1658
- Foekens JA, Peters HA, Look MP, et al. (2000) The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res*; 60: 636-643
- Folkman J and Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-34
- Giancotti FG and Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science*, 285: 1028-32

- Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ (2003) Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 21: 3357–3365
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H and Thorgereisson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 74: 111-22
- Goretzki L, Schmitt M, Mann K, Calvete J, Chuchulowski N, Kramer M, Günzler WA, Jänicke F and Graeff H (1992) Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett.* 297: 112-118
- Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE (1996) Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J. Biol. Chem.*, 271: 30375-30380
- Grøndahl-Hansen J, Lund LR, Ralfkiaer E, Ottevanger V and Danø K (1988) Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. *J Invest Dermatol*, 90(6): p.790-5
- Grøndahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Danø K, Blichert-Toft M (1993) High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res.*, 53: 2513-21
- Gross J and Lapiere CM (1962): Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 48: 1014-1022
- Gruda MC, Kovary K, Metz R, et al. (1994) Regulation of fra-1 and fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene*, 9: 2537-2547

-
- Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M and Boyd D (1996) Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J. Biol. Chem.*, 271: 10672–10680
- Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP and Biswas C (1997) Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 272(1): p.24-27
- He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ and Goldberg GI (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2632-2636
- Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA and Rodgers WH (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am. J. Pathol.*, 149: 273-282
- Herz J, Clouthier DE and Hammer RE (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71: 411-421
- Hirai SI, Ryseck RP, Mechta F, Bravo R, Yaniv M (1989) Characterization of JunD: a new member of the jun proto-oncogene family. *The Embo Journal* Vol.8, No.5, 1433-1439
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR and Weiss SJ (1998) Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins, *Cell* 95 [3]: 365-377
- Hoffman O (2003) Zelluläre und molekulare Mechanismen der Tumormetastasierung in den Knochen. *J. Miner. Stoffwechs.* 10(2): 12-15
- Høyer-Hansen G, Behrendt N, Ploug M, Danø K and Preissner KT (1997) The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: receptor cleavage prevents ligand interaction. *FEBS Lett.* 420: 79-85

-
- Huhtala P, Chow LT and Tryggvason K (1990) Structure of the human type IV collagenase gene. *J. Biol. Chem.*, 265: 11077-11082
- Hurd TW, Culbert AA, Webster KJ, et al. (2002) Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (Fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation. *Biochem J*, 368: 573-580
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25
- Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD and Okada Y (1997) Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor- β 1 release. *Biochem J*, 322(Pt 3): 809-14
- Inuzuka K, Ogata Y, Nagase H and Shirouzu K (2000) Significance of coexpression of urokinase-type plasminogen activator, and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) and -9 (gelatinase B) in colorectal carcinoma. *Journal of Surgical Research*, 93: 211-218
- Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M and Nagamine Y (1999) The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 56: 104-32
- Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H and Itohara S (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 58: 1048-1051
- Jänicke F, Schmitt M, Ulm K, Gössner W, Graeff H (1989) Urokinase- type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet II*: 1049
- Jänicke F, Schmitt M, Hafter R, Holrieder A, Babic R, Ulm K, Gössner W, Graeff H (1990) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 4: 69-78

-
- Jänicke F, Schmitt M and Graeff H (1991) Clinical relevance of the urokinase-type and the tissue-type plasminogen activators and of their inhibitor PAI-1 in breast cancer. *Sem. Thromb. Hemost.* 17: 303-312
- Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H.(1993) Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, 24: 195-208
- Jochum W, Passegué E, Wagner EF (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20: 2401-2412
- Johansson N, Airola K, Grénman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U and Kähäri VM (1997) Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am. J. Pathol.* 151: 499-508
- Johansson N, Vaalamo M, Grénman S, Hietanen S, Klemi P, Saarialho-Kere U and Kähäri VM (1999) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* 154: 469-480
- Johnson M, Lund LR, Romer J, Almholt K and Dano K (1998) Cancer invasion and tissue remodelling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 667-71
- Kähäri VM and Saarialho-Kere U (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6: 199-213
- Kanse SM, Kost C, Wilhelm OG, Andreasen PA and Preissner KT (1996) The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 244: 344-353
- Karin M, Liu ZG, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-246

-
- Kawano T, Morimoto K and Uemura Y (1968) Urokinase inhibitor in human placenta.
Nature 217: 253-254
- Kerkelä E, Saarialho-Kere U (2003): Matrix Metalloproteinases in tumor progression: Focus on basal and squamous cell skin cancer. Exp Dermatol (12): 109-125
- Kim J, Yu W, Kovalski K and Ossowski L (1998) Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. Cell 94: 353-362
- Kleiner DE, Tuutila A, Tryggvason K, Stetler-Stevenson WG (1993) Stability analysis of latent and active 72 kDa type IV collagenase: the role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). Biochemistry 32: 1583-1592
- Kleiner DE and Stetler-Stevenson WG (1999) Cancer Chemother Pharmacol 43 Suppl, S.42
- Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ, McGuire WL (1977) Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. Cancer Res. 37: 4669-71
- Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chuchulowski N, Calvete J, Kramer M, Günzler WA, Jänicke F and Graeff H (1991) Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). J. Biol. Chem. 266: 5147-5152
- Konakova M, Hucho F and Schleuning WD (1998) Downstream targets of urokinase-type plasminogen-activator-mediated signal transduction. Eur J Biochem, 253 (2): p.421-429
- Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ (2003) Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 95: 142-153

- Koop S, Khokha R, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Chambers AF and Groom AC (1994) Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res.* 54: 4791-4797
- Korzus E, Nagase H, Rydell R and Travis J (1997) The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signaling pathways are required for an oncostatin M-responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J Biol Chem*, 272(2): 1188-96
- Kruithof EKO, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattaliano RJ and Bachmann F (1986) Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J. Biol. Chem.* 261: 11207-11213
- Kuhn W, Schmalfeldt B, Reuning U, Pache L, Berger U, Ulm K, Harbeck N, Späthe K, Dettmar P, Höfler H, Jänicke F, Schmitt M and Graeff H (1999) Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Brit. J. Cancer* 79: 1746-1751
- Kupfermann ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ (2000) Matrix metalloproteinase-9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am. J. Pathol.* 157: 1777-1783
- Kustikova O, Kramerow D, Grigorian M et al. (1998) Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and mobility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 18: 7095-7105
- Kute TE, Grohndahl-Hansen J, Shao SM, Long R, Russell G, Brünner N (1998) Low cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols defines a group of node negative breast cancer patients with low risk of recurrence. *Breast Cancer Res Treat* 47: 9-16
- Lee SW, Ellis V and Dichek DA (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 2411-2418

-
- Lee JS, See RH, Deng T and Shi Y (1996) Adenovirus E1A downregulates c Jun- and Jun B-mediated transcription by targeting their coactivator p300.
Mol. Cell. Biol. 16: 4312-4326
- Legrand C, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, Birembaut P and Tournier JM (1999) Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodelling. J Cell Biol. 146: 517-529
- Leppa S, Saffrich R, Ansorge W and Bohmann D (1998) Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. EMBO J. 17: 4404-4413
- Lewis TS, Shapiro PS and Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv. Cancer Res. 74: 49-129
- Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, Di GH, Liu G, Li FM, Ou ZL, Jie C, Shen ZZ, et al. (2004) Prognostic value of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma.
Breast Cancer Res Treat 88: 75-85
- Lijnen HR, Van Hoef B, Lupu F, Moons L, Carmeliet P and Collen D (1998) Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 18(7): 1035-45
- Liotta LA, Steeg PS and Stettler-Stevenson WG (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 64: 327-336
- Loskutoff DJ, Curriden SC, Hu G and Deng G (1999) Regulation of cell adhesion by PAI-1. APMIS 107: 54-61
- Magdolen V, Rettenberger P, Koppitz M, Goretzki L, Kessler H, Weidle UH, König B and Graeff H (1996) Systematic mutational analysis of the receptor-binding region of the human urokinase-type plasminogen activator. Eur. J. Biochem. 237: 743-751

-
- Manders P, Tjan-Heijnen VCG, Span P, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot A, van Tienoven DTH, Beex LVAM, Sweep FCGJ (2004) Complex of urokinase-type plasminogen activator with its type-1 inhibitor predicts poor outcome in 576 patients with lymphnode-negative breast carcinoma.
American Cancer Society, Vol 101, Nr.3: 486-494
- Matrisian LM (1992): The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463
- Mazzieri R, Maseiro L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S and Mignatti P (1997) Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J.* 16: 2319
- McGuire WL (1986) Prognostic factors in primary breast cancer. *Cancer Surv.* 5: 527-36.
- Mignatti P, Robbins E and Rifkin DB (1986) Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47: 487-498
- Mignatti P and Rifkin DB (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Reviews* 73: 161-195
- Mikula M, Gotzmann J, Fischer A, et al. (2003) The proto-oncogene c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis. *Oncogene*, 22: 6725-6738
- Milde-Langosch K, Bamberger AM, Methner C, Rieck G, Löning T (2000) Expression of cell-cycle-regulatory proteins Rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, Cyclin D1 and Cyclin E in breast cancer: correlation with expression of activating protein-1. *Int. J. Cancer*: 87: 468-472
- Milde-Langosch K, Kappes H, Riethdorf S, et al. (2003) FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas. *Breast Cancer Res Tr*, 77: 265-275

-
- Milde-Langosch K, Röder H, Andritzky B, et al. (2004) The role of the transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Tr*, 86: 139-152
- Milde-Langosch K, Stanislava J, Wagner I, Schröder C, Streichert T, Bamberger AM, Jänicke F, Löning T (2006) Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility. *Breast Cancer Res Treat* DOI 10.1007/s10549-007-9559-y
- Minden A and Karin M (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochem Biophys Acta* 1333, F85-104
- Mundy GR (1997) Mechanisms of bone metastasis. *Cancer*, 80 (Suppl): 1546-56
- Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJP (1991) Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J* 277: 277-279
- Murphy G and Docherty AJ (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol*, 7: 120-125
- Murphy G and Knäuper V (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the `haemopexin` domain? *Matrix Biol* 15: 511-518
- Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT and Fothergill JE (1996) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat. Med.* 2: 461-462
- Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Kataoka H und Koono M (1999) Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol Histopathol* 14 [4]: 1183-1197

- Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Okada Y, Itoh Y, Seiki M und Koono M (2000)
Front-cell-specific expression of membrane-type-1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Cancer Res* 60 [13]: 3364-3369
- Nagase H (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.
Biol Chem 378: 151-160
- Nagase H and Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274(31): 21491-4
- Nakanishi K, Kawai T, Sato H, Aida S, Kasamatsu H, Aurues T and Ikeda T (2000)
Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Hum.Pathol.* 31: 193-200
- Nerlov C, Rørth P, Blasi F and Johnsen M (1991) Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity.
Oncogene 6: 1583–1592
- Nerlov C, De Cesare D, Pergola F, Caracciolo A, Blasi F, Johnsen M and Verde P (1992)
A regulatory element that mediates cooperation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *EMBO J*, 11: 4573–4582
- Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato M, Iba H (1990) Isolation and characterization of fra 2, an additional member of the fos gene family.
Proc Natl Acad Sci USA, May, 87(9): 3619-23
- Nykjaer A, Petersen E, Møller CM, Jensen PH, Moestrup SK, Holtet TL, Etzerodt M, Thorgersen HC, Much M, Andreasen PA and Gliemann J (1992) Purified α 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. *J Biol Chem* 276: 14543-14546

-
- Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremora O, Gliemann J and Blasi F (1997)
Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes.
EMBO J, 16: 2610-2620
- Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakanishi I, Iwata K, Yamashita K and Hayakawa T
(1992) J Biol Chem, 267: 21712-21719
- Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, et al. (1995)
Localization of matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV
collagenase=gelatinase B) in osteoclasts; implications for bone resorption.
Lab Invest, 72: 311-22
- Olman MA, Hagood JS, Simmons WL, Fuller GM, Vinson C and White KE (1999) Fibrin
fragment induction of plasminogen activator inhibitor transcription is mediated by
activator protein-1 through a highly conserved element. Blood, 94: 2029-2038
- Ossowski L, Biegel D and Reich E (1979) Mammary plasminogen activator: correlation with
involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic
tissue. Cell, 16(4): 929-40
- Ossowski L and Aghuirre-Ghiso JA (2000) Urokinase receptor and integrin partnership:
coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth.
Curr. Opin. in Cell Biol., 12: 613-620
- Pannekoek H, Veermaan H, Lambers H, Diergaarse P, Verweij CL, Van Zonneveld AJ and
Van Mourik JA (1986) Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): A new
member of the serpin gene family. EMBO J. 5: 2539-2544
- Patterson BC and Sang QA (1997) J Biol Chem 272: 28823
- Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Danø K and Skriver L (1988) One-chain urokinase-type
plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no
intrinsic activity. J Biol Chem. 263(23): 11189-95

- Philips A, Teyssier C, Galtier F et al. (1998) Fra-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.*, 12: 973-985
- Prechtel A, Harbeck N, Thomssen C, Meisner C, Braun M, Untch M, Wieland M, Lisboa B, Cufer T, Graeff H, Selbmann K, Schmitt M, Jänicke F (2000) Tumor-biological factors uPA and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node-negative breast cancer. *Int J Biol Markers*, 15: 73-8
- Preissner KT, Kanse SM, Chavakis T and May AE (1999) The dual role of the urokinase receptor system in pericellular proteolysis and cell adhesion: implications for cardiovascular function. *Basic Res Cardiol*, 94(5): 315-21
- Prusty BK, Das BC (2005) Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer*, 113: 951-960
- Ragno P, Montuori N and Rossi G (1995) Urokinase-type plasminogen activator/type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes are not internalized upon binding to the urokinase-type plasminogen-activator receptor in THP-1 cells. Interaction of urokinase-type plasminogen-activator/type-2 plasminogen-activator inhibitor complexes with the cell surface. *Eur J Biochem*. 233: 514-518
- Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Joffe EB, Puricelli L (2003) Plasma MMP-9 (92-kDA-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 106: 745-51
- Rasmussen HS, McCann PP (1997) Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on Batimastat and Marimastat. *Pharmacol Ther*, 75: 69-75
- Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD and Starzl TE (1980) Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science*, 208(4447): 1036-7

-
- Ravanti L and Kahari VM (2000) *Int J Mol Med Oct.*; 6(4): 391-407
- Resnati M, Guttinger M, Valcamonica S, Sidenius N, Blasi F and Fazioli F (1996)
Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. *EMBO J*, 15: 1572-1582
- Reunanen N, Westermarck J, Hakkinen L, Holmstrom TH, Elo I, Eriksson JE and Kahari VM (1998) Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 273(9): 5137-5145
- Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H and Schmitt M (1998)
Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (Review). *Int J Oncol* 13: 893-906
- Rinehart-Kim J, Johnston M, Birrer M and Bos T (2000) Alterations in the gene expression profile of MCF-7 breast tumor cells in response to c-Jun. *Int. J. Cancer*, 88: 180-190
- Robinson MJ and Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways.
Curr Opin Cell Biol. 9: 180-186
- Rørth P, Nerlov C, Blasi F and Johnsen M (1990) Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol ester.
Nucleic Acids Res. 18: 5009–5017
- Rosenberger SF, Finch JS, Gupta A, et al. (1999) Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of JunD and FosB is required for ocadaic acid-induced activator protein 1 activation. *J Biol Chem.* 274: 1124-1130
- Ryder K, Lau LF and Nathans D (1988) A gene activated by growth factors is related to the oncogen v-jun. *Pro Natl Acad Sci USA.* 85: 1487-91

-
- Ryder K, Lanahan A, Perez-Albuerne E and Nathans D (1989) Jun D: A third member of the Jun gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol 86: 1500-1503
- Ryseck RP and Bravo R (1991) c-jun, Jun B, Jun D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of fos proteins. *Oncogene* 6: 533-542
- Sato H and Seiki M (1993) Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8: 395-405
- Sato H, Kita M and Seiki M (1993) v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*. 268: 23460-23468
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E and Seiki M (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*. 370: 61-65
- Schafer BM, Maier K, Eickhoff U, Todd RF and Kramer MD (1994) Plasminogen activation in healing human wounds. *Am J Pathol*. 144(6): 1269-80
- Schmalfeldt B, Kuhn W, Reuning U, Pache L, Dettmar P, Schmitt M, Jänicke F, Höfler H and Graeff H (1995) Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and 2. *Cancer Res*. 55: 3958-3963
- Schmitt M, Jänicke F and Graeff H (1992) Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis* (6 Suppl) 4: 3-26
- Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F and Graeff H (1997) Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost*. 78: 285-296

-
- Schmitt M, Wilhelm OG, Reuning U, Krüger A, Harbeck N, Lengyel E, Graeff H, Gänsbacher B, Kessler H, Bürgle M, Stürzebecher J, Sperl S and Magdolen V (2000) The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy. *Fibrin & Proteol.* 14: 114-132
- Schön D, Bertz J, Görsch B et al. (2004) Die Dachdokumentation Krebs. In: Gesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2004
- Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG (1991): Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem.* 266: 7870-7875
- Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 10: 602-608
- Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y and Yates PR (1997) The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol.* 12: 1371-1387
- Shaulian E and Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 20: 2390- 2400
- Sidenius N, Sier CF and Blasi F (2000) Shedding and cleavage of urokinase receptor (uPAR): identification and characterization of uPAR fragments in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 475: 52-56
- Simon C, Hicks MJ, Nemecek AJ, Meetha R, O'Malley BW, Goepfert H, Flaitz CM and Boyd D (1999) PD 098059, an inhibitor of ERK1 activation, attenuates the in vivo invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer,* 80: 1412-1419
- Somiari SB, Shriver CD, Heckman C, Olsen C, Hu H, Jordan R, Arciero C, Russell S, Garguilo G, Hooke J, Somiari R (2006) Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. *Cancer Lett.* 233: 98-107

- Somiari SB, Somiari RI, Heckmann CM, Olsen CH, Jordan RM, Russell SJ and Shriver CD (2006) Circulating MMP-2 and MMP-9 in breast cancer–Potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories. *Int J Cancer*, 119: 1403-1411
- Spyratos F, Martin PM, Hacene K, Romain S, Andrieu C, Ferrero-Pous M, Deytieux S, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Brunet M (1992): Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 84: 1266-1272
- Stähle-Bäckdahl M, Parks WC (1993): 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 142: 995-1000
- Stefansson S and Lawrence DA (1996) The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature.* 383(6599): 441-3
- Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ and Werb Z (1999) The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*, 98: 137-146
- Sternlicht MD and Werb Z (2001) How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17: 463-516
- Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, Levy AT, Liotta LA (1990) Tissue inhibitors of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J. Biol. Chem.* 265: 13933-13938
- Strömblad S and Cherech DA (1996) Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 6: 462-468
- Sugiura Y, Shimada H., Seeger RC, Laug WE, DeClerck YA (1998) Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res.* 58: 2209-2216

- Tecimer C, Doering DL, Goldsmith LJ, Meyer JS, Abdulhay G and Wittliff JL (2000)
Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor
type 1 in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 10: 372-381
- Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamts (RKI 23.Juni 2007)
- Toi M, Ishigaki S, Tominaga T (1998) Metalloproteinases and tissue inhibitors of
metalloproteinases. *Breast Cancer Res. Treat.* 52: 113-124
- Tulchinsky E (2000) Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic
transformation. *Histol Histopathol.* 15: 921-928
- Tyczynski JE (2002) Breast Cancer in Europe. Fact Sheet, European Network of Cancer
Registries ENCR <http://www.encl.com.fr/breast-factsheets.pdf>
- UICC (2002) TNM classification of malignant tumours.
Wiley-Liss, Inc., New York, 6.Auflage
- van Dam H, Castellazzi M (2001) Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimmers in
oncogenesis. *Oncogene*, 20: 2453-2464
- Vassalli JD, Baccino D and Belin D (1985) A cellular binding site for the M 55000 form of
the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol.* 100: 86-92
- Vassalli JD, Sappino AP and Belin D (1991) The plasminogen activator/plasmin system.
J. Clin. Invest. 88: 1067-1072
- Verde P, Boast S, Franze A, Robbiati F and Blasi F (1988) An upstream enhancer and a
negative element in the 5' flanking region of the human urokinase plasminogen
activator gene. *Nucleic Acids Res.* 16: 10699–10716
- Vial E, Marshall CJ (2003) Elevated ERK-MAP kinase activity protects the Fos family
member Fra-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells.
J Cell Sci. 116: 4957-4963

- Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U and Brinckerhoff CE (1996)
Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase):
mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability.
Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp. 6: 391-411
- Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991) Genetic manipulation of
E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role.
Cell, 66: 107-19
- Waltz DA and Chapman HA (1994) Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to
urokinase receptor occupancy. J. Biol. Chem. 269: 14746-14750
- Wang Y (2001) The role and regulation of urokinase- type plasminogen activator receptor
gene expression in cancer invasion and metastasis. Med. Res. Rev. 21: 146-170
- Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S and Chapman HA (1994)
J. Biol. Chem. 269: 32380-32388
- Werb Z, Mainardi CL, Vater CA and Harris ED Jr. (1977) N. Engl. J. Med. 296: 1017-1023
- Werb Z, Banda MJ and Jones PA (1980) J.Exp. Med. 152: 1340-1357
- Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandebunder B and Stehelin D
(1992) c-ets-1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells
during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans.
Am. J. Pathol. 140: 119-127
- Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, Dupressoir T, Seitz G,
Vandebunder B and Stehelin D (1994) Stromal expression of c-Ets 1 transcription
factor correlates with tumor invasion. Cancer Res. 54: 5683-5688
- Westermarck J, Seth A and Kähäri VM (1997) Differential regulation of interstitial
collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors.
Oncogene, 14: 2651-2660

-
- Westermarck J and Kähäri VM (1999) FASEB J. 13: 781
- WHO (2003) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. In: Tavassoli FA, Devilee P (eds). IARC Press, Lyon, p.9-112
- Williams JRB (1951) The fibrinolytic activity of urine. Br. J. Exp. Pathol. 32: 530-539
- Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL and Matrisian LM (1997) Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 94: 1402-1407
- Wisdom R, Verma IM (1993) Transformation by fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. Mol Cell Biol. 13: 7429-7438
- Woessner JFJ (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. FASEB J. 5: 2145-2154
- Woessner JF (1998) The matrix metalloproteinase family. In Matrix Metalloproteinases. (Parks WC and Mecham RP, eds.) pp.1-14, Academic Press, San Diego
- Wu S, Murrell GA, Wang Y (2002) Interferon-alpha (Intron A) upregulates urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression. Cancer Immunol Immunother. 51(5): 248-54
- Yokoo T and Kitamura M (1996) Dual regulation of IL-1 β -mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF- κ B and AP-1. Am J Physiol. 270: 123-130
- Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF (2001) When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. J Clin Oncol. 19: 2334-2356

Yoneda T, Williams P, Myoi A, Michigami T, Mbalaviele G (1999) Cellular and molecular mechanisms of development of skeletal metastases. In: Body JJ (ed). Tumor Bone Diseases and Osteoporosis in Cancer Patients. Marcel Dekker Inc., New York, 41–69

Zerial M, Toschi L, Ryseck RP, Schuerman M, Müller R and Bravo R (1989)
The product of a novel growth factor activated antigen, fos B, interacts with Jun proteins enhancing their DNA binding activity. EMBO J. 8: 805-813

Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, Beauheim C, Harvey S, Ethier SP and Johnson PH (2001) Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. Cancer Res. 61: 5168-5178

Danksagung

Ganz herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. T. Löning für die Bereitstellung des Themas und der freundlichen Unterstützung während der Bearbeitung dieser Dissertation.

Besonders danke ich Frau Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung und Gestaltung dieser Arbeit. Ich konnte stets durch ihre hervorragende wissenschaftliche Betreuung und wohlwollende Förderung auf ihre Unterstützung vertrauen und hatte in ihr immer eine Ansprechpartnerin. Mit grossem Zeitaufwand und persönlichem Engagement haben ihre wertvollen Verbesserungsvorschläge erst die Fertigstellung dieser Dissertation ermöglicht. Endlich ist es geschafft!

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Gabriele Riek und Bianca Kelp für ihre ausgezeichnete Einarbeitung in die Labortechniken und Unterstützung bei dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit bedanken. Ich denke oft und gerne an die lustigen Abende im „Keller der Pathologie“ zurück.

Besonders möchte ich mich nochmals bei Bianca Kelp bedanken, ohne sie wäre diese Arbeit nie aufs Papier gekommen und ohne diese Arbeit wäre unsere wertvolle Freundschaft nicht entstanden-ich danke Dir vor allem für die freundschaftliche Unterstützung!

Danke auch an alle meine Freunde. Sevda, Katja, Sariye und Derya danke ich für die unerlässliche Stütze und Hilfe in vielen Lagen. Ihr habt mir geholfen das Leben neben der Doktorarbeit zu geniessen!

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir immer gegeben haben. Abschliessend danke ich ganz herzlich meinen beiden Brüdern Halis und Okan für ihre stets Kraft gebenden und motivierenden Worte und dass sie es immer schaffen, mir ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern!

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

Name	Bahriye Aslan
Geburtsdatum	03.04.1976
Adresse	Richardstrasse 40 22081 Hamburg
Geburtsort	Hamburg
Staatsbürgerschaft	Deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schulbildung:

1982 - 1986	Grundschule Horn, Hamburg
1986 - 1995	Gymnasium Hamm, Hamburg, Abitur

Hochschulbildung

April	1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
März	1998	Physikum
März	1999	1. Staatsexamen
September	2001	2. Staatsexamen
November	2002	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

Okt. 2001 - Feb. 2002	Innere Medizin	AK Barmbek, Hamburg
Feb. 2002 – Juni 2002	Chirurgie	AK St. Georg, Hamburg Ege- Universitätsklinikum. Izmir, Türkei
Juni 2002 - Sept. 2002	Gynäkologie	Ev.Amalie-Sieveking Krankenhaus, Hamburg

Ärztin im Praktikum

April 2003 – September 2004 in der Allgemein-, Gefäß-, und Unfallchirurgie im Krankenhaus Buchholz

Assistenzärztin der Chirurgie

Oktober 2004 – heute Allgemein-, Gefäß- und Unfallchirurgie im Krankenhaus Buchholz

Wissenschaftliche Veröffentlichung

In: Breast Cancer Research and Treatment 86: 139-152

Karin Milde-Langosch, Heike Röder, Birte Andritzky, Bahriye Aslan, Gabriele Hemminger, Anja Brinkmann, Christoph M. Bamberger, Thomas Löning and Ana-Maria Bamberger (2004)

The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich 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.

Bahriye Aslan