

Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors Fra-2 in der Invasivität und Progression des humanen Mammakarzinoms

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

von
Dipl. Biol. Christine Schröder
aus Mechtersen

vorgelegt
dem Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. K. MILDE-LANGOSCH
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. E. PRATJE
Tag der Disputation: 26. Juni 2009

Hamburg, den 11. Juni 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

„Man kann ein Problem nicht mit der gleichen Denkweise lösen,
mit der es erschaffen wurde.“

Albert Einstein (1879-1955)

Für meine
Eltern und Jan-Peter

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 Einleitung	1
1.1 Das humane Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms	1
1.1.2 Anatomie der weiblichen Brust	2
1.1.3 Histopathologische Charakterisierung des Mammakarzinoms	3
1.1.4 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom.....	4
1.2 Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie.....	5
1.2.1 Die Fos-Proteine Fra-1 und Fra-2.....	8
1.3 Vorgänge der Tumorprogression.....	10
1.3.1 Die metastatische Kaskade.....	11
1.4 Adhäsionsmoleküle	14
1.4.1 Die Superfamilie der Cadherine	15
1.4.2 Die Superfamilie der Selektine.....	17
1.4.3 Die Superfamilie der Integrine	18
1.4.4 Die Immunglobulin-Superfamilie.....	19
1.5 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen	23
2.1.1.1 Verwendete Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.1.2 PCR-Primer.....	24
2.1.1.3 Plasmide	25
2.1.1.4 Antikörper.....	25
2.1.2 Zellbiologisches Material.....	26
2.1.2.1 Verwendete Zelllinien	26
2.1.3 Patientenmaterial.....	27
2.1.3.1 Tumorgewebe für die Genexpressionsstudien	27
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	28
2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur.....	28
2.2.1.2 Passagieren Zelllinien.....	28
2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	29
2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl.....	29
2.2.1.5 Bestimmung einer minimal-letalen Antibiotika-Konzentration in der Zellkultur.....	29
2.2.2 Stabile Transfektionen und Selektion der Zellklone	30
2.2.2.1 Transfektion	30
2.2.2.1.1 Lipofektamin-Transfektion	30
2.2.2.1.2 Magnet-Transfektion	31
2.2.3 Das Doxycyclin-regulierbare Expressionssystem TetON®	31
2.2.4 Proliferationsassay.....	33
2.2.5 Invasions- und Migrationsassays.....	33
2.2.6 Luciferase-Test-System	34
2.2.7 Adhäsion an verschiedene Matrixproteine (CytoMatrix™ Cell Adhesion-Assay).....	35
2.2.8 Zellfluss-Experimente.....	36
2.2.9 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	39
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.3.1 Protein-Extraktion aus Zelllinien.....	40
2.3.2 Protein-Extraktion aus Tumorgewebe.....	40
2.3.3 Konzentrationsbestimmung der extrahierten Proteine.....	41
2.3.4 Hämalaun/Eosin-Färbung von Paraffinschnitten	41
2.3.5 Western Blot-Verfahren.....	42
2.3.5.1 Detektion der Proteine	43
2.3.5.2 Entfernung von Antikörpern von Membranen („Reblot“)......	44
2.3.5.3 Densitometrische und semiquantitative Auswertung	44
2.3.6 TransAM-Assay	45
2.3.6.1 Bestimmung des Nuklear-Extraktes.....	46

INHALTSVERZEICHNIS

2.4	Molekularbiologische Methoden.....	47
2.4.1	Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen.....	47
2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	47
2.4.2.1	Photometrische Bestimmung der DNA und RNA	48
2.4.3	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese.....	49
2.4.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	50
2.5	cDNA Mikroarrays	51
2.6	Statistische Auswertung.....	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Protein-Expression von Fra-2 am klinischem Material.....	53
3.2	Funktionelle Analysen zur Rolle von Fra-2 in Mammakarzinom-Zelllinien	54
3.2.1	Auswahl der Zelllinien	54
3.2.2	Herstellung von stabilen und induzierbaren Mammakarzinom-Zelllinien mit Fra-2- Überexpression	55
3.2.2.1	Transfektion mit pTRE- Teton-Expressionsvektoren.....	55
3.2.2.2	Transfektion mit pIRES-Expressionsvektoren.....	59
3.2.2.2.1	MDA-MB231 mit pIRES Vektoren für Fra-2 und Fra-1.....	59
3.2.2.2.2	MCF-7 mit pIRES Vektoren Fra-1	60
3.2.3	Untersuchungen zur Bindungsaktivität an die AP-1 Consensussequenz	61
3.2.4	Untersuchungen der Proliferation.....	64
3.2.5	Invasivität und Motilität.....	66
3.2.6	Wirkung von Fra-2 auf den Fra-1 Promoter	69
3.3	Genexpressionsstudien	71
3.3.1	Validierung potentieller Zielgene mittels Western Blot-Analyse.....	78
3.3.2	FACS-Analyse zur Validierung potentieller Zielgene.....	79
3.4	Einfluss von Fra-2 auf die Adhäsion an Molekülen der extrazellulären Matrix.....	81
3.5	Untersuchung der Interaktion zwischen Fra-2 und E-Selektin.....	84
3.6	Untersuchungen von Fra-2 regulierten Adhäsionsmolekülen an klinischem Material.....	87
3.6.1	Das Adhäsionsmolekül L1CAM.....	88
3.6.1.1	Western Blot-Analyse von L1CAM an humanen Mammakarzinomen	88
3.6.1.2	Immunhistochemische Untersuchung von L1CAM an klinischem Material	91
3.6.1.3	Genexpressionsstudien von L1CAM an RNA-Daten von klinischem Material	91
3.6.1.3.1	Multivariate Analyse: Cox-Modell	94
3.6.1.3.2	Korrelationen der L1CAM mRNA-Expression mit biologisch-relevanten Markern.....	96
3.6.2	Das Adhäsionsmolekül ICAM-1	97
3.6.2.1	Western Blot-Analyse von ICAM-1 an humanen Mammakarzinomen	97
3.6.2.2	Genexpressionsstudien von ICAM-1 an RNA-Daten von klinischem Material	100
4	Diskussion.....	102
4.1	Expression von Fra-2 im klinischen Material.....	102
4.2	Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von Fra-2	103
4.3	Analyse Fra-2 regulierter Zielgene	108
4.4	Untersuchungen des Adhäsionsverhalten der Fra-2 überexprimierenden Zellen	115
5	Zusammenfassung.....	120
6	Literaturverzeichnis.....	122
7	Danksagung.....	146

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	<i>in vitro</i>	"im Reagenzglas" (lat. <i>vitrum, i, n</i> : das Glas)
µg	Mikrogramm	<i>in vivo</i>	"im Lebenden" (lat. <i>vivum, i, n</i> : das Lebendige)
µl	Mikroliter	kb	Kilobasen
µmol	Mikromol	kD	Kilodalton
Abb.	Abbildung	L1CAM	L1-cell adhesion molecule
Acc.	Accession (Nummer für Datenbankeintrag)	LCIS	lobuläres Karzinom <i>in situ</i>
allg.	allgemein	LK	Lymphknoten
AP-1	Activating protein-1	m	Milli
AS	Aminosäure	M	Molar
ATCC	American type culture collection	mA	Milli-Ampere
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor	MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
BCA	Bicinchonic acid	min	Minute
bp	Basenpaare	MMP	Matrix-Metalloproteinase
BRCA	Breast cancer gene	mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)	ng	Nanogramm
bzgl.	bezüglich	N-Terminus	Amino-Terminus
bzw.	beziehungsweise	NTP	Nukleosidtriphosphat
c	Konzentration	OD	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)	PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
CEACAM	Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule	PBS	Phosphatpuffer
CMV	Cytomegalovirus	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
C-Terminus	Carboxy-Terminus	pcsb1	Lysepuffer
Cx43	Connexin 43	PKC	Proteinkinase C
DCIS	duktales Karzinom <i>in situ</i>	PR	Progesteronrezeptor
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PVDF	Polyvinylidendifluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)	rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat	RT	Raumtemperatur
Dox.	Doxycyclin	s	Sekunde
E	Extinktion	s.	siehe
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SD	Standardabweichung
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)	SDS	Sodiumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SPSS	Statistical Package of the Social Sciences
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor	Tab.	Tabelle
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	TAD	transaktivierende Domäne
ER	Östrogenrezeptor	TBS-T	Tris-buffered saline -Tween20
<i>et. al.</i>	lat: <i>et aliter</i> (und weitere Autoren)	TEMED	N ⁺ ,N ⁺ ,N ⁺ ,N ⁺ -Tetramethylethylendiamin
EtOH	Ethanol	Tet.	Tetracyclin
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter	TetO	Operatorsequenz des Tetracyclin-Resistenzsystems
FCS	Fötales Kälberserum	TetON	Tetracyclin-abhängiges Expressionssystem
Fra-1	Fos-related antigen-1	TetR	Tetracyclin-Repressordomäne
Fra-2	Fos-related antigen-2	TRE	TPA-response element
G418	Geneticin	U	Unit
h	Stunde	u.a.	unter anderem
Her-2/ <i>neu</i>	Herceptin-Rezeptor-2/ <i>neu</i>	uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1	V	Volt
Ig	Immunglobulin	VEGF	Wachstumsfaktor des Gefäßendothels
IL	Interleukin	vgl.	vergleiche
		z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das humane Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Die häufigste Krebserkrankung der Frau ist mit einem Anteil von 28 % aller Krebsneuerkrankungen (Inzidenz) das maligne Mammakarzinom. Statistisch gesehen, erkrankt im Laufe ihres Lebens jede acht bis zehnte Frau an Brustkrebs. Nach den Angaben des Robert-Koch Instituts (GEKID, 2006) treten in Deutschland 57.230 Neuerkrankungen pro Jahr auf, was ca. 130 Fälle pro 100.000 Einwohner entsprechen. Weltweit sind es nach den Schätzungen des IARC (INTERNATIONAL ASSOCIATION ON RESEARCH OF CANCER) etwa 1,2 Millionen Frauen pro Jahr und ca. 410.000 sterben daran (FERLAY AND BRAY, 2002).

Die Brustkrebsinzidenz zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom Alter; so liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 63 Jahren und damit sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Etwa 40 % der Brustkrebsfälle treten vor dem 60. Lebensjahr auf. Für das Jahr 2002 betrug die Anzahl der Sterbefälle (Mortalitätsrate) in Deutschland etwa 42 Fälle pro 100.000 Frauen.

Wird die Inzidenzrate mit der Mortalitätsrate verglichen, lässt sich ein eindeutiger und starker Anstieg von Brustkrebs seit den siebziger Jahren erkennen. Während sich die Häufigkeit der Erkrankungen in den letzten dreißig Jahren nahezu verdoppelt hat, welches einem prozentualen Anteil von ca. 2,5 % pro Jahr entspricht, hat sich die Mortalität seit Mitte der neunziger Jahre leicht verringert. Eine Analyse der altersspezifischen Mortalität von 1990-1992 und 2000-2002 zeigt, dass der Rückgang besonders in den jüngeren Altersklassen ausgeprägt ist. Während sich in der Altersgruppe der über 75-Jährigen kein Rückgang zu verzeichnen ist, ging die Mortalität bei den unter 50-Jährigen um 20-30 %, in der Gruppe der 50 – 74-Jährigen um 10-15 % zurück (GIERSIEPEN AND MERZENICH, 2005). Durch die modernen Früherkennungsmaßnahmen und die stetige Weiterentwicklung der Hormon- und Chemotherapie konnte die Reduzierung der Mortalität in den letzten Jahren erreicht werden.

Durch viele wissenschaftliche Studien in epidemiologischer, molekularbiologischer sowie genetischer Hinsicht konnten in der Vergangenheit Faktoren herausgearbeitet werden, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert werden (RUBIN UND FARBER, 1999).

So werden als Risikofaktoren vor allem eine frühe erste Regelblutung (Menarche), Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt sowie der späte Eintritt in das Klimakterium (Menopause) diskutiert. Auch spielen bei der Entstehung des

Mammakarzinoms genetische Faktoren eine bedeutende Rolle, die zum Beispiel mit Mutationen des BRCA1- oder BRCA2-Gens (*breast cancer gene 1 oder 2*) oder des Tumorsuppressorgens p53 einhergehen. Frauen, in deren Verwandtschaft Brustkrebserkrankungen aufgetreten sind, tragen ebenfalls ein erhöhtes Risiko zu erkranken. Durch Beobachtungsstudien ist bekannt, dass auch ein erhöhter Verzehr tierischer Fette, erhöhtes Körpergewicht, Alkohol und Bewegungsarmut mit einem höheren Brustkrebsrisiko verbunden sind. Dabei lässt sich der Zusammenhang von Alkohol und Brustkrebsrisiko eindeutig quantifizieren (JASIENKA ET AL., 2005).

1.1.2 Anatomie der weiblichen Brust

Die weibliche Brust (lat.: *mamma*) besteht in ihrer Gesamtheit aus Drüsen (*Glandulae*), Fett- und Bindegewebe. Eigenes Muskelgewebe hat die Brust nicht, die Muskulatur liegt vielmehr hinter der Brustdrüse auf dem Brustkorb auf. Die Brustdrüse (*Glandula mammaria*) besteht aus 15-20 Einzeldrüsen (*Lobi*), die in radiär divergierender Form angeordnet sind und sich aus einer Vielzahl von Läppchen (*Lobuli*) zusammensetzen.

Die Brustdrüse entwickelt sich zur adulten Form unter dem Einfluss von Hormonen (Östrogen) mit Längenwachstum der Milchgänge (*Ductus*

lactiferi), Entfaltung der Gangepithelien und Bildung der Drüsenendläppchen (*Acini*). Durch das Hormon Progesteron kommt es zur Ausdifferenzierung der Acini. Gleichzeitig kommt es zur Ausformung der Mammille (*Papilla mammaria*) und des Warzenhofes (*Areola mammaria*) (GOERKE ET AL., 2008). Das Brustgewebe unterliegt einem hormonellen Einfluss während des monatlichen Zyklus, in der Schwangerschaft sowie in der Menopause. Studien der letzten Jahre zeigen, dass Proliferation und Funktion des Brustgewebes durch ein

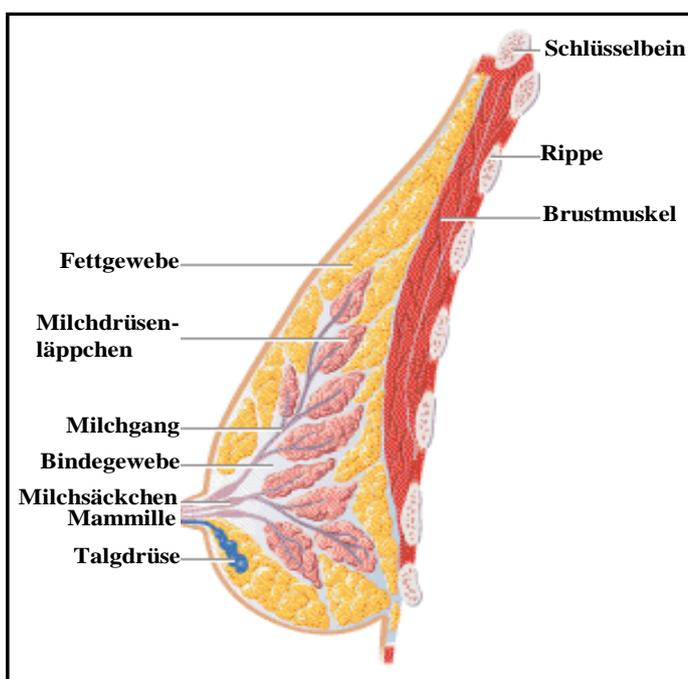


Abbildung 1.1.: Anatomischer Aufbau der weiblichen Brustdrüse. Die Milchdrüsenläppchen sind in dieser Abbildung zu groß dargestellt (modifiziert nach GOERKE ET AL., 2008).

kompliziertes Mosaik von Hormonen (endokrine Regulation) und lokal wirksamen inter- und intrazellulären Faktoren (autokrine und parakrine Regulation) dirigiert werden. Die Rolle der Hormonabhängigkeit der weiblichen Brustdrüse ist eine mögliche Erklärung für das vermehrte Auftreten von Mammakarzinomen bei Frauen.

1.1.3 Histopathologische Charakterisierung des Mammakarzinoms

Nach der derzeit gültigen WHO Klassifikation (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2002) gibt es eine Vielzahl benigner und maligner Tumore in der Brust. Unter dem Sammelbegriff Mammakarzinom wird eine sehr heterogene bösartige Erkrankung der weiblichen Brustdrüse zusammengefasst, die von den Epithelien ausgeht und Merkmale von Milchgängen (duktale Karzinome) oder von lobulären Drüsenläppchen (lobuläre Karzinome) besitzt. Der häufigste Tumortyp des Mammakarzinoms ist der duktale Typ mit ca. 80 % der Fälle, wohingegen der lobuläre Typ wesentlich seltener auftritt (10 - 15 %). Definitionsgemäß handelt es sich bei Tumoren, welche die Basalmembran der Milchgänge und Drüsenläppchen noch nicht durchbrochen haben und sich ausschließlich innerhalb des Drüsengewebes befinden, um so genannte *Carcinomata in situ* (CIS). Gelingt es den Tumorzellen, die umgebende Basalmembran zu durchbrechen und in das angrenzende Stroma vorzudringen, liegt ein *invasives* Karzinom vor. Das lobuläre Karzinom *in situ* (LCIS) geht wesentlich seltener in die invasive Form über als das duktale Karzinom *in situ* (DCIS) und ist damit mit einer besseren Prognose assoziiert.

Die histologische Einteilung der Tumortypen erfolgt anhand der pathologischen TNM-Klassifikation (Staging) und der Bestimmung des Differenzierungsgrades (Grading). Gemäß der UICC (INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER) gibt das Staging die Tumorgöße (T), den Status der regionalen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose an. Die pathologischen Charakteristika der Tumorgöße und des Lymphknotenstatus, die nach der Operation bestimmt werden, besitzen die Bezeichnung pT (pTis- bis pT4), pN (pN0- und pN+) und pM (M0/M+ falls Fernmetastasen vorhanden sind). Das Grading fasst verschiedene histologische und zytologische Merkmale zusammen und wird in drei Differenzierungsstufen angegeben. Die Bezeichnung G1 stellt einen gut differenzierten, G2 einen mäßig differenzierten und G3/G4 einen schlecht differenzierten Tumor dar.

1.1.4 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Um eine rationale Abschätzung der Prognose bei einer Brustkrebserkrankung geben zu können, werden zunächst klinisch-pathologische Parameter, wie die zuvor beschriebene TNM-Klassifikation (Staging), der Differenzierungsgrad (Grading) und das Ausmaß der Metastasierung (Nodalstatus = Befall von Lymphknoten) herangezogen. Diese Parameter werden verwendet, um eine möglichst effektive und adäquate Therapie für jeden einzelnen Tumor zu planen. Des Weiteren sind auch das Alter der Patientin sowie der Steroidhormonrezeptorstatus von prognostischer und therapeutischer Bedeutung. Die Prognose ist als ungünstiger einzuschätzen, je größer der Tumor ist, je mehr Lymphknoten befallen sind, je höher das Grading und je jünger die Patientin ist.

Der Hormonrezeptorstatus (ER = Östrogenrezeptor und PR = Progesteronrezeptor) zählt zu den wichtigsten Selektionskriterien für die Planung einer adjuvanten hormonbasierten Therapie (BÄSSLER, 1997; FITZGIBBONS ET AL., 2000).

Neben den klassischen Prognosefaktoren stehen mittlerweile neuere molekularbiologisch bestimmte Prognosefaktoren zur Verfügung. Die Anforderungen an neue Prognosefaktoren, die sinnvoll in der Routinediagnostik zur Verfügung stehen sollen, sind hoch. So müssen diese statistisch einwandfrei und reproduzierbar in unabhängigen Studien belegt sein und eine unabhängige Relevanz in multivariaten Analyse zeigen (GRAEFF ET AL., 1997).

Diese Kriterien erfüllt zum Beispiel der tumorassoziierte Proteolysefaktor Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Inhibitor PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ 1) (MC GUIRE ET AL., 1991). Die beiden Faktoren uPA und PAI-1 tragen bedeutend zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen bei. Hohe Konzentrationen von uPA und PAI-1 im Primärtumor gehen mit einem erhöhtem Metastasierungsrisiko und einem kürzerem Gesamtüberleben einher (HAYES ET AL., 1996; LAKHANI ET AL., 2002). Nodalnegative Patientinnen mit niedrigem uPA und PAI-1 Wert im Tumor haben eine eher günstige Prognose, so dass eine adjuvante Chemotherapie bei diesen Patientinnen nicht indiziert scheint (HARBERG ET AL., 2002; JÄNICKE ET AL., 1993).

Als weiterer wichtiger Prognosefaktor dient das Onkogen *c-erbB-2* (Synonym: *HER2-neu* = *human epidermal growth factor receptor, type 2*), das als Mediator für Proliferation, Differenzierung und für metabolische Abläufe in der Zelle fungiert. Eine Amplifikation und Überexpression dieses Onkogens tritt bei ca. 20-30 % aller Mammakarzinom-Patientinnen auf und ist mit einem aggressiven Verlauf der Erkrankung assoziiert (CUMMINGS ET AL., 1999). Retrospektive Analysen deuten darauf hin, dass eine erhöhte Expression von *c-erbB-2* mit einer Resistenz gegen das Chemotherapeutikum Tamoxifen einhergeht. Eine frühzeitige

Bestimmung des so genannten *HER2*-neu-Status dient vor allem Patientinnen mit hämatogen metastasiertem Mammakarzinom, bei denen dann eine Immuntherapie mit Trastuzumab, einem humanisierten monoklonalem Antikörper, der gegen das Onkoprotein gerichtet ist, indiziert ist (SLAMON ET AL., 2001). Klinische Daten über Trastuzumab (Herceptin[®]) belegen signifikant seine Effektivität: Sowohl das mediane Überleben, als auch die mediane Zeit zur Progression waren durch die Kombination von Chemotherapie und Trastuzumab oder auch in der Herceptin[®]-Monotherapie deutlich verlängert (COBLEIGH ET AL., 1999; SLAMON ET AL., 2001).

Alle weiteren neueren Prognosefaktoren wie andere tumorassoziierte Proteolysefaktoren (z.B. Cathepsin D) oder zellkinetische Parameter (Ki-67, S-Phasefraktion, p53, c-myc, TGF α und TGF β) sind zurzeit noch Gegenstand wissenschaftlicher Studien. Nach dem derzeitigen Wissenstand kann keine allgemeingültige Empfehlung ausgesprochen werden, obwohl in einigen klinischen Zentren eine Bestimmung des nukleären Antigens Ki-67 oder des Tumorsuppressors p53 in der Routinebefundung durchgeführt wird (TUMORZENTRUM MÜNCHEN, 2005).

1.2 Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie

In einem vielzelligen eukaryontischen Organismus werden biologische Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose durch die Regulation spezifischer Gene koordiniert. Die differentielle Expression dieser Gene wird durch externe Stimuli, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Zytokine, Tumorpromotoren, Hormone oder chemische Agenzien moduliert.

Sie interagieren direkt mit der DNA bzw. binden an membranständige oder cytoplasmatische Rezeptoren und aktivieren Signaltransduktionskaskaden in der Zelle. Am Ende solcher Signaltransduktionskaskaden, die v.a. aus Proteinkinasen und Phosphatasen bestehen, stehen häufig Transkriptionsfaktoren. Binden die Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Bindungssequenzen oder treten mit dem RNA-Polymerase II-Initiationskomplex in Kontakt, aktivieren oder reprimieren sie die Transkription des jeweiligen Zielgens.

Die Mitglieder der AP-1 Familie (*activating protein-1*) sind solche Transkriptionsfaktoren, die angeregt durch externe Stimuli verschiedene Prozesse in der Zelle aktivieren (ANGEL ET AL., 1987b; LEE ET AL., 1987a; ANGEL UND KARIN ET AL., 1991; KARIN ET AL., 1997). Der AP-1 Komplex besteht aus Proteindimeren, die sich aus einer Kombination der verschiedenen

Mitglieder der Fos-, Jun- und ATF-Proteinfamilie zusammensetzen. Die Familie der Fos-Proteine besteht aus cFos, FosB, Fra-1 und Fra-2, die der Jun-Proteine aus cJun, JunB und JunD und die der ATF-Familie aus ATF-2, ATF-3/LRF-1 und BH-ATF (Übersicht: VOGT UND BOS, 1990; ANGEL UND KARIN, 1991; GOETZ ET AL., 1996, KARIN ET AL., 1997).

Anhand von Sequenzanalysen wurden den AP-1 Proteinen aufgrund von hoch konservierten charakteristischen Eigenschaften in die bZip-Proteinfamilie eingeordnet (LANDSCHULZ ET AL., 1988). Die bZip-Region besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten. Allen AP-1 Mitgliedern gemeinsam ist die basische Region, die sich aus 12 bis 14 Aminosäuren zusammensetzt und die Bindung an AP-1-Bindungsstellen in den Promotoren und Enhancern der Zielgene erlaubt, sowie die benachbarte Leucin-Zipper-Region. Der Leucin-Zipper ermöglicht die Dimerisierung der AP-1-Untereinheiten (VOGT UND BOS, 1990).

Die Proteine der Jun-Familie sind in der Lage sowohl stabile Homodimere als auch Heterodimere mit den Proteinen der Fos- und ATF-Familie zu bilden (KOUZARIDES UND ZIFF, 1988; NISHIZAWA ET AL., 1989; SMEAL ET AL., 1989; ZERIAL ET AL., 1989; MATSUI ET AL., 1990; ZIFF ET AL., 1990; HAI UND CURRAN, 1991; HSU ET AL., 1991; DORSEY ET AL., 1995).

Ähnliches gilt für die Mitglieder der ATF-Familie, die gleichfalls sowohl Homo- als auch Heterodimere formen können (ZIFF ET AL., 1990; HAI UND CURRAN, 1991), wohingegen es den Fos-Proteinen aufgrund der elektrostatischen Eigenschaften ihres Leucin-Zippers nicht möglich ist, Homodimere zu bilden. Sie können sich nur mit den Jun-Proteinen zu Heterodimeren vereinigen (HAI UND CURRAN, 1991).

Die gebildeten Dimere können mit hoher Affinität an eine asymmetrische Heptanukleotid-Sequenz TGA (C/G) TCA, der so genannten TRE-Sequenz (oder „*TPA responsive elements*“) binden, die in den palindromischen Abschnitten vieler regulatorischer Promotor- oder Enhancer-Regionen vorhanden sind. Ebenso binden die Dimere mit einer etwas abgeschwächten Affinität an eine symmetrische Oktanukleotid-Sequenz, die so genannte CRE oder „*cAMP-responsive elements*“. Durch die Möglichkeit, verschiedene Dimerformationen auszubilden, ergibt sich eine große Anzahl verschiedener Kombinationen der AP-1 Mitglieder untereinander. Je nach Spezifität der gebundenen Dimere sowie den benachbarten regulatorischen Regionen führt dies *in vitro* zu einer Förderung oder Inhibition der Transkription zahlreicher Gene (HAI UND CURRAN, 1991).

Hinsichtlich der DNA-Bindungsspezifität und der Fähigkeit zur Dimerisierung mit Jun oder Fos wurden weitere bZIP-Proteine identifiziert (Übersichtsartikel: KARIN, ET AL., 1997): die Maf-Proteine (v-Maf, c-Maf), das Genprodukt des neuralen retinaspezifischen Gens (NISHIZAWA, ET AL., 1989; SWAROOP ET AL., 1992), sowie die beiden Jun-

Dimerisierungspartner JDP1 und JDP2 (ARONHEIM ET AL., 1997). Für den direkten oder indirekten Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie weisen die AP-1-Proteine neben der basalen und Leucin-Zipper-Region eine dritte funktionelle Domäne auf, die Transaktivierungsdomäne, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Transkriptionsrate des Zielgens hat (ANGEL UND KARIN, 1991; BOHMANN ET AL., 1998).

Viele dieser AP-1 responsiven Gene sind mittlerweile bekannt, sie codieren unter anderem für Wachstumsfaktoren (z.B. *NGF*, HENGERER ET AL., 1990), Metalloproteinasen (z. B. *MMP-9*, GUM ET AL., 1996; CROWE AND BROWN, 1999; *Collagenase*, ANGEL ET AL., 1987 a; *Stromelysin*, KERR ET AL., 1988; *Urokinase (uPA und PAI-1)*, NERLOV ET AL., 1991), Zellzyklusregulatoren (z. B. *Cyclin D1*, ALBANESE ET AL., 1999; SABBAAH ET AL., 1999; BAKIRI ET AL., 2000; *p16*, PASSEGUE UND WAGNER, 2000; *p53*, SCHREIBER ET AL., 1999) und zelltypspezifische Genprodukte (z. B. *Involucrin*, NG ET AL., 2000; *Keratin 18*, OSHIMA ET AL., 1990; PANKOV ET AL., 1994; RHODES UND OSHIMA, 1998) (Übersichtsartikel siehe SHAULIAN, 2001).

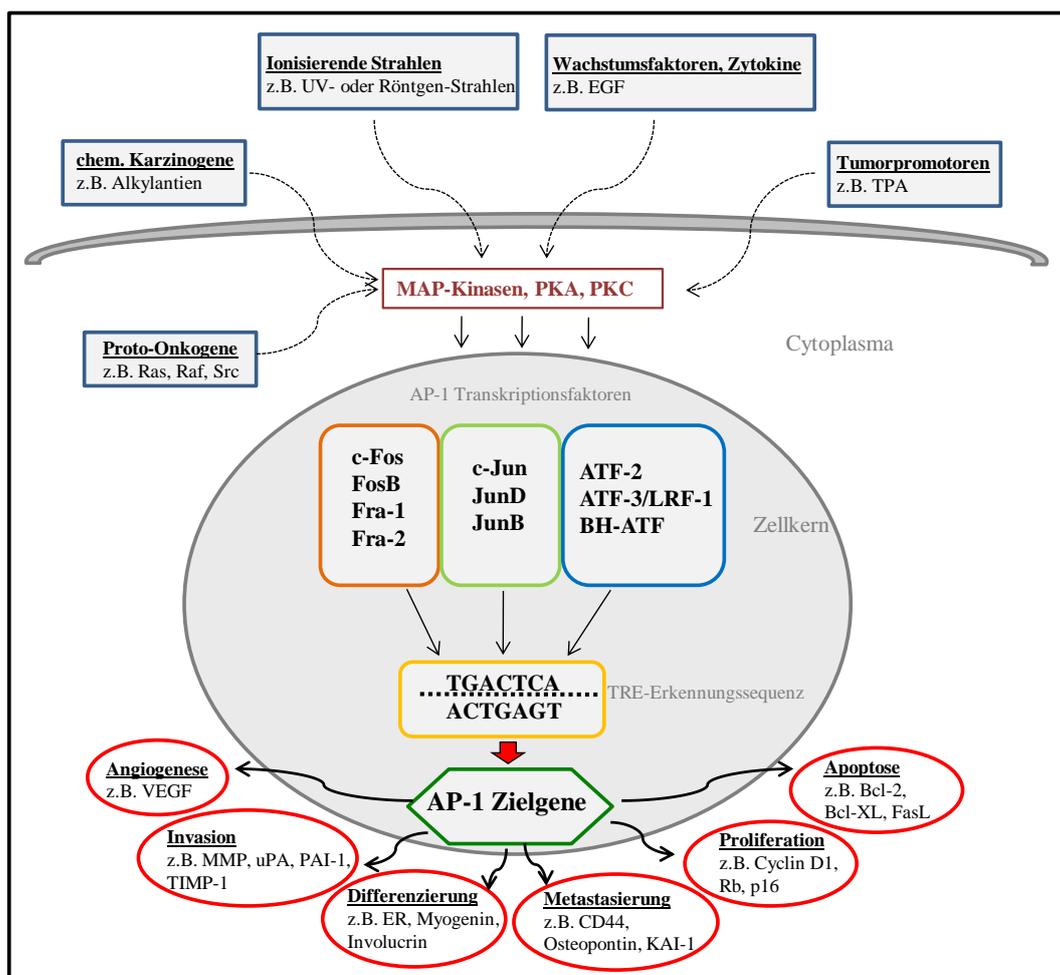


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade, die zur transkriptionellen Aktivierung von AP-1 abhängigen Zielgenen führt.

1.2.1 Die Fos-Proteine Fra-1 und Fra-2

Die Transkriptionsfaktoren Fra-1 und Fra-2 werden wie c-Fos und FosB zur Gruppe der Fos-Proteine der AP-1 Familie gezählt. Fra-1 (*Fos-related antigen-1*) wurde 1988 von COHEN und CURRAN als Mitglied der AP-1 Familie identifiziert und besitzt je nach Phosphorylierungsgrad ein Molekulargewicht von ca. 36-46 kDa (COHEN UND CURRAN,1988). Im Jahr 1990 wurde aufgrund seiner Homologie zu anderen Fos-Proteinen das 46 kDa schwere Gen-Produkt Fra-2 von NISHINA erstmals in Hühner-Fibroblasten als „*Fos-related antigen 2*“ beschrieben (NISHINA, 1990).

Die Fos-Protein-Familie lässt sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Mäuse- und Ratten-Fibroblasten zu transformieren, in zwei Kategorien einteilen (WISDON ET AL., 1993). Während c-Fos und FosB zu den transformierenden Proteinen gehören, werden Fra-1 und Fra-2 zur Kategorie der nicht-transformierenden Proteine gezählt.

Der strukturelle Aufbau der konservierten Bereiche dieser Familie zeigt, dass c-Fos und FosB im Gegensatz zu Fra-1 und Fra-2 in ihrem C-terminalen Bereichen transaktivierende Domänen enthalten, die für die Transformation von Zellen vermutlich von Bedeutung sind (WISDON ET AL., 1993, FUNK ET AL., 1997 und TULCHINSKY ET AL., 2000) (Abb. 1.3).

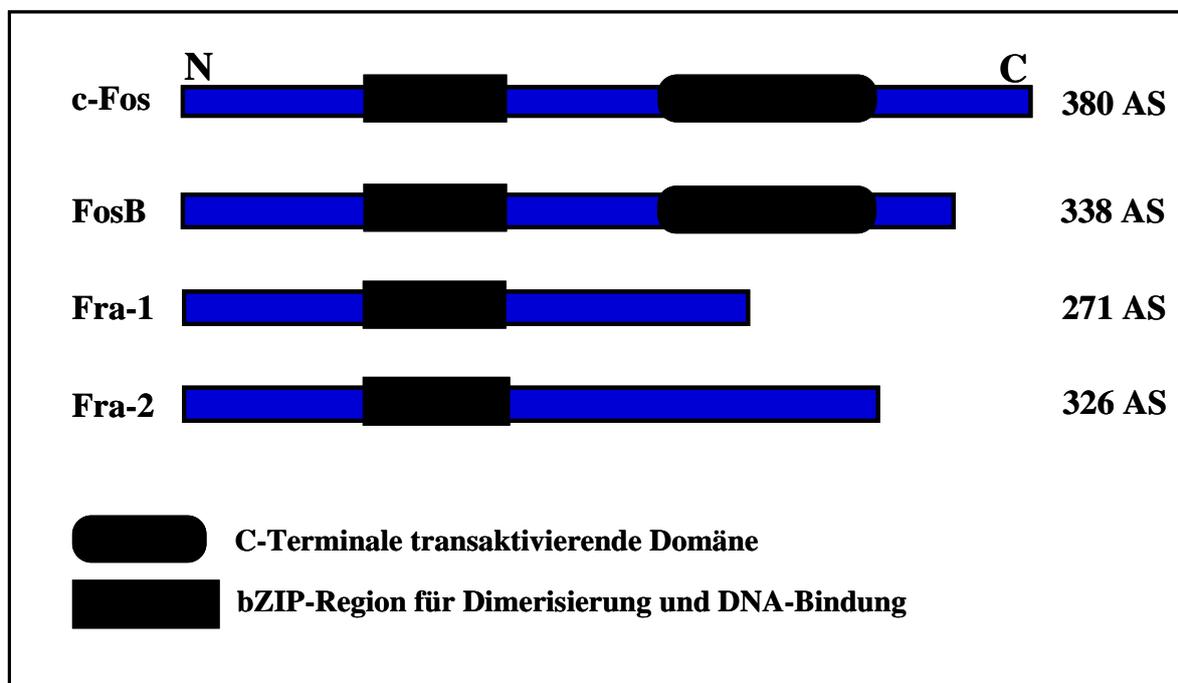


Abbildung 1.3.: Struktureller Aufbau der Fos-Proteine. Modifiziert nach TULCHINSKY ET AL., 2000.

Für die nicht-transformierenden Proteine Fra-1 und Fra-2 wurde zunächst postuliert, dass sie aufgrund der fehlenden C-terminalen transaktivierenden Domänen nicht zu einer effizienten

Transkriptionsaktivierung und Transformation befähigt sind (SUZUKI ET AL., 1991). Dennoch konnte in darauffolgenden Studien an vielen Beispielen gezeigt werden, dass gerade auch diesen Proteinen eine große Bedeutung für den Erhalt und das Fortschreiten von neoplastischen Transformationen in Zellen zukommt (MECHTA ET AL., 1997; TULCHINSKY ET AL., 2000).

ZOUMPOURLIS ET AL. (2000) legten dar, dass in einem Karzinogenese-Modell an der Haut von Mäusen Fra-1 und Fra-2 mit einem malignen Phänotyp korrelierten. Einen Zusammenhang zwischen der Fra-1 Expression und dem Grad der Malignität in Gewebematerial von Schilddrüsenhyper- und Schilddrüsenneoplasien konnte in einer immunhistochemischen Studie festgestellt werden. Dabei färbten sich alle untersuchten Karzinome stark an, wohingegen Adenome weniger oder nur teilweise eine Färbung und normales Gewebe überhaupt keine Fra-1 Immunreaktivität aufwies (CHIAPPETTA ET AL., 2000). In einer Untersuchung an Speicheldrüsen-Tumoren wurde Fra-2 als eines der Gene beschrieben, deren Überexpression die pleomorphen Adenome im Vergleich zum Normalgewebe charakterisierten (MARUYA ET AL., 2004). Allerdings war Fra-2 im Gegensatz zu Fra-1 und c-Fos nicht in der Lage, in epitheloiden CSML0-Zellen (murine Adenokarzinom-Zelllinie) eine morphologische Veränderung herbeizuführen oder Gene des Urokinase-Systems zu aktivieren oder, wie Fra-1, die motile Aktivität zu steigern (ANDERSEN ET AL., 2002; TKACH ET AL., 2003). Jedoch konnte in fibroblastoiden L929-Zellen durch Transfektion mit Fra-2 siRNA die Motilität gehemmt werden (TKACH ET AL., 2003).

In einigen weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass durch erhöhte Expression von Fra-2 in verschiedenen Zellsystemen die Transkription anderer Gene beeinflusst wird. So wurde in CSML0-Zellen eine verstärkte Expression von Thrombospondin-1, Osteopontin und CD44 durch Fra-2 beobachtet (ANDERSEN ET AL., 2002; TKACH ET AL., 2003). EFERL ET AL. (2008) postulierten, dass eine durch Fra-2 vermittelte verstärkte Osteopontin-Expression zur Gefäß-Erneuerung, chronischen Inflammation und sich anschließenden Fibrose im Lungengewebe von transgenen Mäusen und auch möglicherweise in Menschen führen kann. In colitis-assoziierten Karzinomen (CAC) ist ebenfalls eine erhöhte Fra-1 und Fra-2 Expression gefunden worden (HASSELBLATT ET AL., 2008). Für Fra-1 konnte durch BELGUISE ET AL. (2005) in MCF-7 Zellen gezeigt werden, dass durch einen erhöhten Fra-1 Expressions-Level viele Gene, die in Zell-Proliferation, Invasion und Motilität involviert sind, reguliert werden. Des Weiteren konnten die Ergebnisse von BELGUISE ET AL. darlegen, dass Fra-1 einen ausschlaggebenden Einfluss in der Progression von Brustkrebs-Zelllinien hat. LUO ET AL. zeigten bereits 2003, dass ein entwickelter Impfstoff gegen Fra-1 in einem Mausmodell das

Tumorwachstum und auch die Bildung von Metastasen hemmt (LUO ET AL., 2003). Die biologische Rolle von Fra-2 in der Karzinogenese ist dagegen noch nicht geklärt. In einer Arbeit von MILDE-LANGOSCH ET AL. (2000) konnte dargelegt werden, dass in Mammakarzinomgeweben Fra-2 positiv mit den Zellzyklus-Regulatoren Cyclin E und Cyclin D korreliert, was einen stimulierenden oder sogar onkogenen Effekt von Fra-2 vermuten lässt. Weitere Arbeiten von MILDE-LANGOSCH belegten, dass die Transkriptionsfaktoren c-Fos, Fra-1 und Fra-2 eine regulatorische Rolle in der Invasion von Mammakarzinomen einnehmen (MILDE-LANGOSCH ET AL., 2004, 2005).

1.3 Vorgänge der Tumorprogression

Bösartige Tumore, einschließlich der Mammakarzinome sind durch schnelleres Zellwachstum, der Fähigkeit zu invasivem und metastasierendem Wachstum und durch einen partiellen oder völligen Verlust der Differenzierung charakterisiert. HANAHAN UND WEINBERG definierten für eine große Anzahl an Karzinomen Gemeinsamkeiten in einigen grundlegenden Änderungen in ihrer Zell-Physiologie. So weisen transformierte Zellen sechs pathophysiologische Merkmale auf:

- Unabhängigkeit der Zelle von Wachstumsfaktoren
- Resistenz der Zelle gegenüber Wachstumsinhibitoren
- Potential der Zelle zur verstärkten Proliferation
- Fähigkeit zur Neoangiogenese des Tumors
- Eignung zur Gewebsinvasion und Metastasierung

Jede dieser Eigenschaften erlaubt einer transformierten Zelle, in den Prozess der malignen Progression einzutreten (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

1.3.1 Die metastatische Kaskade

Die Ausbildung von Tumormetastasen ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, bei dem es durch Veränderungen zahlreicher physiologischer Funktionen wie Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Matrix-Adhäsion, Zellpolarität und Zellmigration zur systemischen Ausbreitung von Tumorzellen kommt. In der Abbildung 1.4 ist der Ablauf der metastatischen Kaskade nach FIDLER ET AL. (2003) schematisch dargestellt.

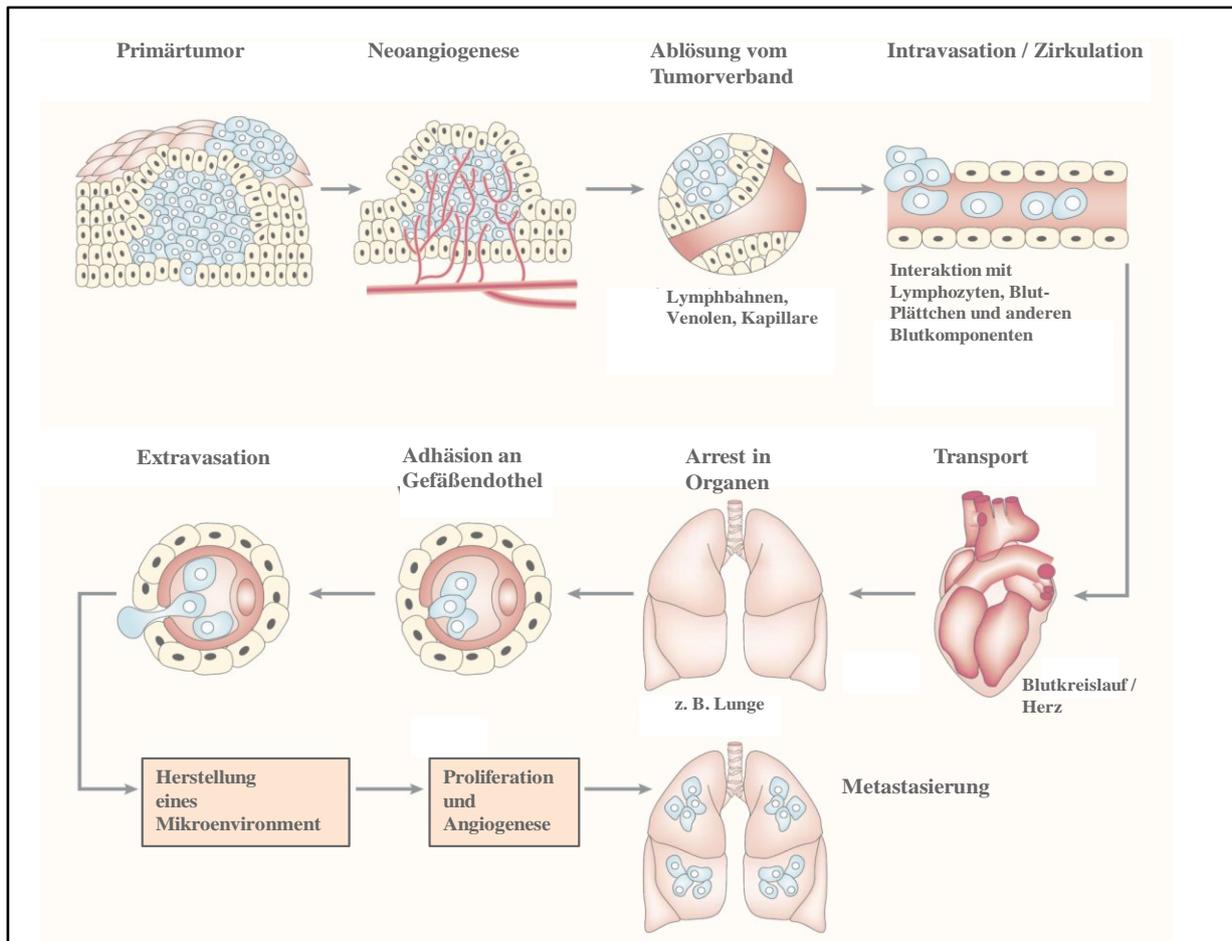


Abbildung 1.4.: Schema der Tumorzell-Metastasierungs-Kaskade. Verändert nach FIDLER ET AL. 2003.

In einem initialen ersten Schritt kommt es zur zellulären Transformation und zur Expansion der malignen entarteten Zelle. Normale Zellen benötigen, um in den proliferierenden Zustand zu gelangen, mitogene Wachstumsfaktoren. Signale solcher sezernierten Wachstumsfaktoren werden über Transmembran-Rezeptoren in die Zelle vermittelt (extrazelluläre Stimuli). Da Tumorzellen zur autokrinen Stimulation befähigt sind, können sie im Gegensatz zu normalen Zellen diese Wachstumsfaktoren in großer Anzahl autark produzieren. Diese „erworbene Wachstumsfaktoren-Autonomie“ wurde von FEDI ET AL. (1997) als erstes Charakteristikum für Tumorzellen beschrieben. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass auch die Expression

der Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z. B. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) in vielen Karzinomen einer Dysregulation unterliegt und es somit schon bei normaler Konzentration von Wachstumsfaktoren zu einer extremen Steigerung der Proliferationsrate kommt (FEDI ET AL., 1997).

Um über eine bestimmte Größe hinauswachsen zu können, müssen die Zellen ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden, so dass die Tumore die Fähigkeit zur Induktion von Gefäßneubildung (Neoangiogenese) besitzen (BOUCK ET AL., 1996; HANAHAN & FOLKMAN 1996; FOLKMAN 1997). Im zweiten Schritt kommt es somit zur Aussprossung neuer Blutgefäße im Tumorgewebe. Die Angiogenese wird durch eine Vielzahl von Induktoren (positiv-regulierende Signale) und Inhibitoren (negativ-regulierende Signale) im Gleichgewicht gehalten. Zu den Angiogenese-Induktoren werden z.B. die VEGF-Familie 1-4 („*v*ascular *e*ndothelial *g*rowth *f*actor“) und der bFGF („*b*asic *f*ibroblast *g*rowth *f*actor“), die Angiopoetin-Familie 1-4 und die Ephrine gezählt (MEYER ET AL., 1999; MANDRIOTTA & PEPPER 1997; ASPLIN ET AL., 2001; DAVIS ET AL., 1996; YANCOPOULOS ET AL., 2000). Zur Klasse der Angiogenese-Inhibitoren gehören beispielsweise Angiostatin und Endostatin (O'REILLY ET AL., 1994), sowie Thrombospondin-1 (DAMERON ET AL., 1994) und TGF- β (FRILING ET AL., 1996). Die Neoangiogenese ist ein essentieller Vorgang im Prozess der Metastasierung und wurde bereits vor vielen Jahren für das Wachstum von Tumoren verantwortlich gemacht (FOLKMAN, 1997).

Als nächstes Ereignis lösen sich die Tumorzellen von dem Zellverband des Primärtumors ab und müssen die Basalmembran durchdringen und die extrazelluläre Matrix (ECM = *e*xtracellular *m*atrix) degradieren (MCKINELL, 1999). Die ECM besteht aus mehreren Komponenten, von denen Kollagen (insbesondere Typ IV) neben Laminin, Fibronectin und Glycosaminoglycane den Hauptbestandteil ausmachen. Sie bildet sowohl Basalmembranen von 50 – 100 nm Dicke, als auch interstitielles Stroma und muss von den invadierenden Tumorzellen überwunden werden (MIGNATTI & RIFKIN, 1993). Für die Invasion ist es für die Tumorzellen zunächst wichtig, sich an die Basalmembranen anzuheften. Für diesen Vorgang sind Zelladhäsionsmoleküle und Integrine auf der Oberfläche der Tumorzellen verantwortlich (APLIN ET AL., 1998; LAUWAET ET AL., 2000). Nach erfolgreicher Anheftung ist es erforderlich, die Bestandteile der ECM zu degradieren. Hierfür sind die wesentlichen Parameter die extrazellulären Proteasen (COUSSENS & WERB, 1996; CHAMBERS & MATRISIAN, 1997). Die wichtigsten tumorassoziierten Proteasen sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die Cysteinproteasen (Cathepsin B, H und L) und Faktoren des Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA) (MAGDOLEN ET AL., 2002). Es ist allerdings nicht erforderlich, dass

die Tumorzellen diese Proteasen selbst exprimieren, vielmehr haben sie die Fähigkeit sezernierte Proteasen von umgebenen Zellen zu nutzen (WERB ET AL., 1997). HANAHAN UND WEINBERG (2000) formulierten, dass die Aktivierung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsproteinen sowie die Rekrutierung von extrazellulären Proteasen zentrale Prozesse in den frühen Schritten der Invasion und Metastasierung darstellen (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Am Ende einer erfolgreichen Invasion penetrieren die Tumorzellen in das Blutgefäßsystem, durch den Vorgang der Intravasation treten die Tumorzellen schließlich in den Blutkreislauf ein. Die im Blut zirkulierenden Tumorzellen sind dann mechanischen Scherkräften, immunologischen Interaktionen der natürlichen Immunabwehr ausgesetzt, so dass wahrscheinlich weniger als 1 Prozent diese Phase im Blutkreislauf überleben (LIOTTA & KOHN, 1990). Einer Hypothese von MUNDY ET AL. (1997) nach, besitzen Tumorzellen möglicherweise innerhalb eines gebildeten Komplex aus Blutplättchen einen Überlebensvorteil im Blut, da einzelne Zellen innerhalb dieses Aggregats vor Anoxie oder mechanischen Scherkräften geschützt sind.

In den weiteren Schritten können die überlebenden Tumorzellen durch Veränderung ihrer Adhäsionsausstattung an das Gefäßendothel anheften und das Gefäßsystem wieder verlassen. Dieser Vorgang wird als Extravasation bezeichnet und ermöglicht den Tumorzellen, in sekundäre Organe zu gelangen und dort durch Proliferation eine Metastase auszubilden oder auf unbestimmte Zeit ruhend (dormant) im Gewebe zu verbleiben (UHR ET AL., 1997). Die Ausbildung einer Metastase ist von verschiedenen und teilweise noch ungeklärten Einflüssen, wie zum Beispiel der Umgebung (Mikroenvironment) und Nährstoff-Versorgung, Wachstumsfaktoren und Proteasen abhängig. Gemäß der „Seed and Soil“ Theorie von PAGET 1889, entsteht eine Metastase nur, wenn sie für die Ansiedelung den „richtigen Boden“, sprich das richtige Nährstoff-Angebot und die nötigen histologischen Strukturen findet (PAGET, 1889).

Viele einzelne Aspekte der Metastasierung sind im Laufe der Jahre beleuchtet worden (FIDLER, 2003), dennoch sind die Faktoren, die in diesem komplexen Vorgang eine essentielle Rolle spielen noch immer nicht hinreichend geklärt. Die Metastasierung stellt gerade beim Mammakarzinom mit einem Anteil von 90 % immer noch die Todesursache der betroffenen Krebspatientinnen dar (GIBBS ET AL., 2003; PANTEL & BRAKENHOFF, 2004). Daher ist es unabdinglich, ein ausreichendes Verständnis für die bei der Metastasierung ablaufenden Ereignisse sowie die involvierten Moleküle zu erlangen (HUNTER ET AL., 2008), um neue Therapieformen zu entwickeln. Ein besonderer Aspekt kommt hierbei den

Adhäsionsmolekülen zu, da der Kern eines metastatischen Prozesses in der Veränderung der Adhäsionseigenschaften der Tumorzellen liegt. Im folgenden Kapitel wird daher auf die Familie der Adhäsionsmoleküle näher eingegangen.

1.4 Adhäsionsmoleküle

Die Adhäsionsmoleküle sind eine heterogene Gruppe von Molekülen, die auf Oberflächen von Zellen exprimiert werden. Die meisten Moleküle dieser Gruppe sind membranständige Glykoproteine, die aufgrund ihrer Aminosäuren-Primärstruktur in vier verschiedene Familien eingeteilt werden können (ALBERTS ET AL., 1994). Generell wird eine Gruppe von Proteinen, die mindestens 50 % Sequenzidentität untereinander haben, als Proteinfamilie bezeichnet. Dagegen wird unter einer Protein-Superfamilie eine Gruppe von Proteinen, die zwar eine statistisch signifikante Sequenzhomologie aufweisen, aber weniger als 50 % Sequenzidentität erreichen, verstanden (DAYHOFF ET AL., 1983).

Die Mehrheit der bisher bekannten Zelladhäsionsmoleküle (abgekürzt CAMs: „*cell adhesion molecules*“) kann in vier Protein-Superfamilien zusammengefasst werden (BOGENRIEDER & HERLYN, 2003):

- Cadherine
- Selektine
- Integrine
- Immunglobulin-Superfamilie

Für zahlreiche Mitglieder dieser Protein-Superfamilien konnte eine Beteiligung bei der Progression maligner Tumore nachgewiesen werden (CAVALLARO & CHRISTOFORI, 2001; HSU ET AL., 2002). Daneben gibt es eine Vielzahl weiterer Adhäsionsmoleküle auf Zelloberflächen, die nicht auf Grundlage ihrer Proteinstruktur eingeteilt werden, zu ihnen gehören u.a. der Hyaluronsäure-bindende Oberflächenrezeptor CD44 (PONTA ET AL., 2003; MARHABA & ZOLLER, 2004), die Familie der Sialomuzine und Claudine, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

In den folgenden Abschnitten wird in einer kurzen Übersicht auf die oben aufgezählten Protein-Superfamilien der Zelladhäsionsmoleküle eingegangen.

1.4.1 Die Superfamilie der Cadherine

Die Proteine dieser Superfamilie bilden eine große Gruppe von mehr als 80 Zelladhäsionsmolekülen (YAGI & TAKEICHI, 2000). Sie befinden sich auf den meisten Zelltypen, wobei einzelne Vertreter oft spezifische Expressionsmuster im Gewebe zeigen. Die Expression der Cadherine wird im Verlauf der Entwicklung dynamisch reguliert (GUMBINER ET AL., 2000).

Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige homophile Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, die in spezialisierten Membranbereichen, wie der *Zonula adherens* und den Desmosomen von Epithelzellen ubiquitär lokalisiert sind. Sie sind, abgesehen von einer kleinen Subgruppe, Zellmembran-Proteine vom Typ I, d.h. sie haben eine einzige Transmembrandomäne und einen extrazellulär lokalisierten Aminoterminus. Charakteristisch für die Cadherine sind mindestens fünf cadherintypische Domänen, die aus etwa 110 Aminosäuren bestehen. Die Cadherin-Superfamilie lässt sich aufgrund struktureller Merkmale in mehrere Subgruppen einteilen (BRÜMMENDORF, 2003):

- die „klassischen“ Cadherine (mehr als 25 Vertreter)
- die desmosomalen Cadherine (6 Vertreter)
- die Protocadherine (52 Vertreter)
- die atypischen Cadherine

Der zyttoplasmatische Abschnitt divergiert von Subgruppe zu Subgruppe, was zu unterschiedlichen intrazellulären Wechselwirkungen führt (SUZUKI ET AL., 1996; REDIES ET AL., 1997; WU & MANIATIS, 2000; YAGI & TAKEICHI, 2000).

Das zur Familie der „klassischen“ Cadherine zählende E-Cadherin (Uvomorulin, epitheliales Cadherin) ist das bisher am besten untersuchte Zell-Zell-Adhäsionsmolekül (GUMBINER ET AL., 2000). Da sich vom Epithelgewebe ca. 80 % aller humanen Tumore ableiten und der Prozess der Metastasierung häufig mit dem Verlust von Zelladhäsion einhergeht, kommt dem Protein E-Cadherin eine besondere Bedeutung zu. CHRISTOFORI und SEMB (1999) zeigten, dass in vielen der epithelialen Tumore die Funktion von E-Cadherin durch somatische Mutationen, transkriptionelle Repression, proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne oder veränderte Protein-Interaktionen gestört ist. Der Verlust oder die Reduktion der E-Cadherin Expression korreliert mit verstärkter Aggressivität und Dedifferenzierung in den meisten Karzinomen und fungiert als prognostischer Indikator (BEAVON ET AL., 2000). Interzellulär ist E-Cadherin über einen zyttoplasmatischen Schwanz mit α - und β -Catenin

assoziiert, welche die Bindung an das Aktin-Zytoskelett vermitteln. Sind durch Mutationen die Interaktionen des E-Cadherin/Catenin-Komplex gestört oder verändert, können diese als frühe Anzeichen einer Tumorerkrankung z. B. bei Kolon-, Magen oder Prostatakarzinomen gewertet werden (JIANG ET AL., 1996; BERX ET AL., 1998, GUILFORD ET AL., 1998, CHRISTOFORI & SEMB, 1999).

Die sechs Vertreter der desmosomalen Cadherine (Desmoglein-1, -2 und -3 sowie Desmocollin-1, -2 und -3) finden sich überwiegend, wie der Name impliziert, in den Desmosomen (GARROD ET AL., 1996; JOHNSON & TAKEICHI, 1999). Typische Desmosomen (*Maculae adherens*) sind in Epithelzellen, Kardiomyoceten, Menigothelzellen sowie in dendritischen Retikulumzellen der Lymphknotenfollikel zu finden (KARTENBECK ET AL., 1984; FRANKE ET AL., 1987; VAN DER LOOP ET AL., 1995). Da sie besonders in beanspruchten Geweben wie dem Herzen und der Haut vorhanden sind, wird ihnen eine primär stabilisierende Funktion zugeschrieben (KOCH & FRANKE, 1994; GARROD ET AL., 1996). Die Desmosomen einer Zelle interagieren mit gegenüberliegenden Desmosomen der benachbarten Zelle, diese Interaktionen werden durch trans-Interaktionen der Desmocolline und Desmogleine, die ihrerseits in zytoplasmatischen Plaques verankert sind, vermittelt (BRÜMMENDORF, 2003).

Die größte Gruppe innerhalb der Cadherin-Superfamilie mit ca. 52 Vertretern sind die Protocadherine. Im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen handelt es sich hier um eine sehr uneinheitliche Gruppe. So differiert die Anzahl der extrazellulären Cadherindomänen zwischen vier bei μ -Protocadherin und elf bei Protocadherin 15. Ebenfalls sehr heterogen sind die zytoplasmatischen Domänen der verschiedenen Protocadherine, wobei aber im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen bisher in keinem Fall eine β -Catenin-Bindestelle nachgewiesen werden konnte (WU & MANIATIS, 1999; YAGI & TAKEICHI, 2000). Aufgrund der großen Vielfalt lässt sich vermuten, dass Protocadherine zur Interaktion mit einer Vielzahl von verschiedenen Partnern befähigt sind. Darüber hinaus wird angenommen, dass Protocadherine neben homophilen auch heterophile Interaktionen eingehen zu können (FRANK & KEMMLER, 2002).

1.4.2 Die Superfamilie der Selektine

Die Superfamilie der Selektine gehört der Gruppe der C-Typ-Lektine an. Lektine sind Glycoproteine, deren charakteristische Eigenschaft in einem spezifischen Kohlenhydrat-Bindungsvermögen steht. Die Bezeichnung C-Typ deutet auf eine Ca^{2+} -abhängige Kohlenhydrat-Bindung hin. Bemerkenswert ist, dass die Selektine nicht wie die anderen Zelladhäsionsmoleküle mit Proteinliganden interagieren, sondern mit einer Tetrasaccharidstruktur Sialyl-Lewis^x (sLe^x), die auf etlichen Zelloberflächenproteinen vorkommt.

Selektine sind eine der kleinsten Genfamilie, die nur drei Mitglieder bisher umfasst:

- L-Selektin
- P-Selektin
- E-Selektin

Die Namensgebung erfolgte nach dem Ort ihrer ersten Entdeckung: auf Leukozyten L-Selektin, P-Selektin auf Blut-Plättchen und E-Selektin auf Endothelzellen. Die Selektine spielen bei entzündlichen Prozessen eine bedeutende Rolle, da sie während der so genannten Leukozytenkaskade die Interaktion von Leukozyten mit dem Gefäßendothel initiieren.

Das L-Selektin (LAM-1, LECAM-1) ist das einzige konstitutiv exprimierte Selektin und ist an der Rezirkulation bzw. Bewegung der Lymphozyten aus dem Blut- in das Lymphsystem beteiligt („*lymphocyte homing*“) (LEWINSOHN ET AL., 1987; BARCLAY ET AL., 1993). Es ist auf den Spitzen der Mikrovilli von allen Granulozyten, Monozyten und auf den meisten zirkulierenden Lymphozyten lokalisiert, so dass es trotz seiner geringen Größe für die Erkennung und Bindung gut zugänglich ist (PICKER ET AL., 1991; BRUEHL ET AL., 1996; ERLANDSEN 1996).

Das P-Selektin (MP-140, PADGEM) wurde als Membranprotein in den α -Speichergranula von Blut-Plättchen entdeckt (HSU-LIN ET AL., 1984; MCEVER ET AL., 1984). Es wird auch in funktionstüchtiger Form in den Weibel-Palade-Körperchen postkapillärer Endothelzellen gespeichert (MCEVER ET AL., 1989). Die Präsentation von P-Selektin wird über zwei verschiedene Wege reguliert. Werden die Zellen mit Histamin, Thrombin oder Phorbol ester stimuliert, wird P-Selektin aus den Speichergranula mobilisiert und erreicht innerhalb von zehn Minuten seine maximale Expressionsstärke an der Zelloberfläche (HATTORI ET AL., 1989; GENG ET AL., 1990). Da es im Gegensatz zu L-Selektin nicht konstitutiv exprimiert wird, wird es ähnlich wie E-Selektin durch Transkriptionsaktivierung z. B. durch $\text{TNF-}\alpha$

immer neu synthetisiert (WELLER ET AL., 1992). Die Internalisierung erfolgt innerhalb von 60 Minuten durch Endocytose und das Protein wird dann in die Speicher zurückgeführt oder in den Lysosomen degradiert (SETIADI ET AL., 1995; STRALEY ET AL., 2000).

Das E-Selektin wurde 1987 als induzierbares „*endothelial-leukozyte adhesion molecule-1*“ (ELAM-1) auf kultivierten humanen Endothelzellen gefunden (BEVILACQUA ET AL., 1987). Heute ist bekannt, dass E-Selektin auf allen aktivierten Kapillarendothelien exprimiert wird und dort an der Rekrutierung von Leukozyten bei entzündlichen Prozessen beteiligt ist. Die Expression auf der Zelloberfläche wird durch Aktivierung von Zytokinen (IL-1 oder TNF- α) oder Lipopolysacchariden dynamisch reguliert (BEVILACQUA ET AL., 1989). Die Transkriptionsaktivierung wird durch den Transkriptionsfaktor NF κ B gesteuert (SCHINDLER ET AL., 1994).

1.4.3 Die Superfamilie der Integrine

Die Integrine bilden eine Familie heterodimerer Transmembranproteine, die einerseits als zelluläre Rezeptoren für Komponenten der ECM dienen und andererseits als Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle fungieren. Sie bestehen aus nicht-kovalent miteinander verbundenen α - und β -Untereinheiten, deren C-Terminus zytoplasmatisch lokalisiert ist und deren N-Terminus extrazellulär gelegen ist. Die α -Untereinheit beinhaltet eine extrazelluläre I-Domäne mit einer Metallionen-Bindungsstelle. Nach HYNES ET AL. (2002) ist die Adhäsion von Integrinen an die unterschiedlichen Liganden abhängig von der Bindung zweiwertiger Kationen an diese Metallionen-Bindungsstelle MIDAS („*metal ion dependent adhesion site*“). Die β -Untereinheit weist eine ähnliche Domänenstruktur auf, ist aber im Gegensatz zur α -Untereinheit weniger variabel. Sie besitzt ebenfalls eine Metallionen-Bindungsstelle für zweiwertige Kationen, diese ist aber in etwa 100 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt und wird daher auch I-ähnliche Domäne genannt (BERMAN ET AL., 2003). Bisher wurden 18 α - bzw. 8 β -Untereinheiten identifiziert und von den theoretisch denkbaren 128 α - β -Kombinationen wurden bisher nur 24 Heterodimere beschrieben (VAN DER FLIER & SONNENBERG, 2001).

Die I-Domäne existiert in zwei verschiedenen Strukturformen, die jeweils eine aktive-offene-hochaffine bzw. eine inaktive-geschlossene-niedrigaffine Konformation darstellt. Die Konformationsänderung ist abhängig von der Ligandenbindung, der Aktivierung durch Antikörper oder Mn²⁺ und wird über Interaktionen des Metallions an der MIDAS-Region, das

für die Bindung eines Liganden benötigt wird, gesteuert. Nur die offene Konformation ist in der Lage, einen Liganden zu binden. Für die Erkennung des Liganden durch das Integrin ist ein Glutamat- oder Aspartatrest ebenfalls essentiell (EMSLEY ET AL., 2000; FRELINGER ET AL., 1991; LEE ET AL., 1995; XIONG ET AL., 2000). Des Weiteren dient das Tripeptid RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) als Erkennungssequenz der Liganden Fibronektin, Vitronektin, Kollagen, Thrombospondin und Fibrinogen (RUOSLATHI & PIERSCHBACHER, 1987; BUCK & HORWITZ, 1987).

Die Integrine haben wichtige Funktionen im gesamten Zellorganismus, so haben sie z. B. Einfluss auf das Zellüberleben, die Verhinderung von Apoptose, die Zellproliferation, die Zellmotilität, die Organisation des Zytoskeletts und auf die Transkription der Zelle. Nach VAN DER FLIER und SONNENBERG (2001) sind viele der Integrine nicht immer aktiv, sondern sind in einem inaktiven Zustand auf der Zelloberfläche exprimiert. Der Aktivitätszustand wird durch Interaktionen der zytoplasmatischen Domäne der α - und β -Untereinheiten reguliert (DU ET AL., 1993). Diese Eigenschaft ist besonders wichtig für Integrine, die sich auf zirkulierenden Blutzellen (Leukozyten) befinden. Integrine sind auf der Oberfläche von ruhenden Leukozyten inaktiv, können aber im Falle einer Entzündungsreaktion schnell aktiviert werden, um ihre immunologischen Funktion wahrzunehmen. Diese β_2 -Integrine auf der Oberfläche von Leukozyten können auch Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie wie z.B. ICAM-1 bis -5 („*intercellular cell adhesion molecule-1*“) oder das VCAM-1 („*vascular cell adhesion molecule-1*“) binden (DIAMOND ET AL., 1991).

1.4.4 Die Immunglobulin-Superfamilie

Die zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) gehörigen Moleküle zeichnen sich durch das gemeinsame Merkmal der Immunglobulin (Ig)-Domäne aus. Dieses Protein-Faltungsmotiv umfasst ca. 100 Aminosäuren und ist im Wesentlichen aus zwei übereinander liegenden β -Faltblättern in antiparalleler Anordnung aufgebaut (WILLIAMS & BARCLAY, 1988). Die dreidimensionalen Faltblattstrukturen der Ig-Domäne werden häufig durch eine Disulfidbrücke stabilisiert. Es sind Vertreter dieser Superfamilie bekannt, die nur eine einzige Ig-Domäne enthalten, wie zum Beispiel die Proteine Thy-1 oder P₀, aber auch solche mit 17 Domänen, wie das Sialoadhesin (BRÜMMENDORF, 2003). Die Ig-Domäne stellt eine strukturell autarke Faltungseinheit dar und eignet sich deshalb sehr gut für den modularen Aufbau von Proteinen. Nach OWENS ET AL. (1987) existieren tatsächlich von vielen Proteinen der IgSF

mehrere Spleißvarianten, die sich häufig in der Anzahl der extrazellulären Ig-Domänen unterscheiden. Ein großer Teil der Mitglieder der IgSF sind Membranproteine, so treten sowohl Transmembranformen mit zytoplasmatischer Domäne als auch Moleküle auf, die über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an die Membran gebunden sind. Ein intrazellulärer Anteil ermöglicht sowohl die Verknüpfung der betreffenden Moleküle mit dem Zytoskelett der Zelle als auch die Ausübung von Signalfunktionen über ihren transmembranen Anteil. Ähnlich wie die bereits besprochenen anderen Mitglieder der Zelladhäsionsmoleküle spielen die Mitglieder der IgSF in der Entwicklung und im gesamten adulten Organismus eine bedeutende Rolle. Sie fungieren dabei als Rezeptoren und als Liganden bei Zell-Zell-Wechselwirkungen, als Rezeptoren für Komponenten der ECM, aber auch als Rezeptoren für lösliche Polypeptide wie Wachstumsfaktoren. So ist zum Beispiel bekannt, dass viele Vertreter das kontaktabhängige axonale Wachstum in der Gehirnentwicklung regulieren, bei der Kommunikation verschiedener Zelltypen des Immunsystems und bei der Adhäsion von Leukozyten an das Kapillarendothel von entscheidender Bedeutung sind (BARCLAY ET AL., 1993; CLARK & LEDBETTER, 1994; SPRINGER, 1994; BRÜMMENDORF & RATHJEN, 1995; TESSIER-LAVIGNE & GOODMAN, 1996; SONDEREGGER ET AL., 1998).

Des Weiteren vermitteln einige Mitglieder dieser Familie wie zum Beispiel das ICAM-1 oder VCAM-1 durch Interaktion mit den Leukozyten-Integrinen MAC-1 und LFA-1 oder VLA 1-6 die stabile Adhäsion von inflammatorischen Zellen an das Endothel (ISSEKUTZ ET AL., 1999). Das Zelloberflächenprotein ICAM-1, auch als CD54 bezeichnet, gilt als der Prototyp endothelialer Integrin-bindender IgSF-Rezeptoren (BRÜMMENDORF, 2003). Es wird primär von Endothelzellen aber auch von anderen Zelltypen exprimiert. Die Expression ist auf Transkriptionsebene regulierbar und wird bei Entzündungsprozessen durch verschiedene Mediatoren wie TNF α , Interleukin-1 und Interferon- γ induziert (BRÜMMENDORF, 2003).

Viele Proteine der IgSF weisen neben homophilen auch heterophile Bindungseigenschaften auf (WILLIAMS & BARCLAY, 1988; CROSSIN & KRUSHEL, 2000; ROUGON & HORBERT, 2003). Bei der homophilen Interaktion stellt ein Protein sowohl den Liganden als auch den Rezeptor dar, bei der heterophilen Interaktion sind unterschiedliche Moleküle am Verbindungsaufbau beteiligt. Hierbei kann eine Ligandenbindung sowohl in der *trans*- (Interaktion benachbarter Moleküle gegenüberliegender Zellmembranen bzw. ECM) als auch in *cis*-Ebene (Interaktion benachbarter Moleküle einer Zellmembran) erfolgen. Zu der Gruppe, die auch heterophile Bindungen eingehen können, zählen die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM, L1CAM, NRCAM und CHL-1 (COLE & AKESON, 1989; HILLENBRAND ET AL., 1999; TUVIA ET AL., 1997).

NCAM („*n*eural *c*ell *a*dhesion *m*olecule“) ist eines der ersten identifizierten Mitglieder der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle (CUNNINGHAM ET AL., 1987) und ist in zahlreiche Prozesse des Nervensystems wie Zellmigration, Zellproliferation, Neuritenwachstum, Axonfaszikulierung und synaptische Plastizität involviert (WALSH & DOHERTY, 1997; ROUGON & HORBERT, 2003). Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM gehört zu einer Subfamilie, die auch als L1-Familie bezeichnet wird. Zu ihnen gehört u.a. das CHL-1 („*c*lose *h*omologue of *L*-1“), Neurofascin, NgCAM („*n*euron-*g*lia *c*ell *a*dhesion *m*olecule“) und NrCAM („*n*euron-*g*lia *c*ell *r*elated *c*ell *a*dhesion *m*olecule“) (BRÜMMENDORF & RATHJEN, 1996; CROSSIN & KRUSHEL, 2000). L1CAM hat während der Entwicklung des Nervensystems sowie im adulten Gehirn vielfältige Funktionen. Es wird von postmitotischen Neuronen und unreifen Astrozyten exprimiert (FUSHIKI & SCHACHNER, 1986; SAAD ET AL., 1991). Nach LINDNER ET AL. ist das neuronale L1CAM an der Migration von Neuriten beteiligt (LINDNER ET AL., 1983, THELEN ET AL., 2002). Des Weiteren wird L1CAM auch auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen wie Knochenmarkszellen, reifen Thymozyten und peripheren B- und T-Lymphozyten in der Maus gefunden (KOWITZ ET AL., 1992, 1993). In verschiedenen Studien konnte eine L1CAM-Expression auf Endothelzellen nachgewiesen werden (PANCOOK ET AL., 1997; VOURA ET AL., 2001; PREVOST ET AL., 2002; THIES ET AL., 2002; KAIFI ET AL., 2006a). Daneben wird L1CAM auch auf unterschiedlichen Tumorentitäten wie Melanomen, Neuroblastomen, Gliomen, Bronchial-, Nierenzell- und Pankreaskarzinomen sowie gastrointestinalen und kolorektalen Tumoren exprimiert und geht häufig mit einer schlechten Prognose einher (THIES ET AL., 2002; ALLORY ET AL., 2005; BOO ET AL., 2007; FOGEL ET AL., 2003b; GAVERT ET AL., 2005; KAIFI ET AL., 2006b, 2007; MELI ET AL., 1999; SENNER ET AL., 2002). Während L1CAM im Nervensystem gut charakterisiert ist, ist über die funktionelle Bedeutung von L1CAM im Immunsystem und Tumorgewebe noch wenig bekannt.

1.5 Zielsetzung

Bisherige Studien konnten darlegen, dass der Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 entscheidend an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist, die mit der Tumorprogression in Verbindung stehen.

Da die einzelnen AP-1 Mitglieder keine redundanten, sondern zum Teil spezifische Funktionen ausüben, ist es wichtig die Bedeutung von einzelnen AP-1 Proteinen näher zu charakterisieren. Bisher ist nur wenig bekannt über die Funktion der AP-1 Untereinheit Fra-2. Die Rolle dieses Transkriptionsfaktors sollte daher im Rahmen dieser Arbeit in Hinblick auf seine mögliche Bedeutung beim metastasierenden Mammakarzinom eingehend analysiert werden.

Nach Etablierung von stabil transfizierten Zelllinien, die gegenüber der verwendeten Ursprungszelllinie (MDA MB231 und MCF-7) eine erhöhte Expression von Fra-2 aufweisen, sollte anhand von Untersuchungen zur Proliferation, Invasivität und Motilität der biologische Einfluss von Fra-2 charakterisiert werden.

Weiterhin sollten mit Hilfe von Gen-Expressionsanalysen (cDNA-Mikroarrays) Gene identifiziert werden, die einer potentiellen Regulation durch Fra-2 unterliegen.

Im Anschluss daran sollte die Validierung und nähere Analysen vielversprechender Zielmoleküle erfolgen. Hiermit sollten Informationen gewonnen werden, die zur Aufklärung der Rolle von Fra-2 im Mammakarzinom beitragen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden hauptsächlich von folgenden Lieferanten bezogen: Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg i. B.), Riedel-de-Haen (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Wässrige Lösungen für Puffer wurden mit Wasser, welches über ein Milli-Q-Reinstwasser System der Firma Millipore (Schwalbach) entsalzt wurde, in sterilen Glasgefäßen angesetzt und autoklaviert.

2.1.1.1 Verwendete Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1.: Verwendete Reagenzien.

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid	Isopropanol
Agar	Kaliumchlorid
Agarose Seakam®	Kaliumchlorid KCl
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Kaliumhydrogenphosphat K ₂ HPO ₄
Ampicilin	L-Glutamin 200 mM
Aqua (ad injectabilia)	Magermilchpulver (Blotting grade Non-Fat dry)
Bovines Serum Albumin	Magnesiumchlorid
Bromphenolblau	4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Methanol
Di-Natriumcarbonat	Natriumacetat
Di-Natriumhydrogenphosphat	Natriumchlorid
2'-3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate	Natriumcitrat
2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Dithiothreitol (DTT)	Nukleosid-5'-Triphosphat
DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium)	Pellet Paint
DNA-Längenstandards	Penicillin/Streptomycin
Doxycyclin	Proteinasen-Inhibitor-Cocktail
EDTA (Diethylen-Diamin-Tetraessigsäure)	Protein-Längenstandards
Entellan	Puromycin
Eosin G-Lösung (0,5 %)	RNase A
Essigsäure 96% Eisessig	Propidium-Jodid
Ethanol	Saccharose
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Salzsäure 25%
FBS Fötale Kälberserum für TetON-Zellen	β-Mercaptoethanol
Formaldehydlösung 37%	TEMED
Formamid, deionisiert	Tricine
Fötale Kälberserum	Triton X-100
Geneticin	Trizma Base
Glycin	Trizol
HAM F12 Nutrient Mixture	Trypsin-EDTA 10x
Hämalaun	Tween 20
Insulin	Xylencyanol

MATERIAL & METHODEN

Zur besseren Standardisierung einzelner Arbeiten wurden kommerziell erhältliche Fertigkits verwendet, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 2.2.: Verwendete Fertigkits mit Herstellerangaben.

Kit-Bezeichnung	Vertrieb
2-D Quant Kit	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
GeneAmp PCR Gold Puffer 10x	Applied Biosystems Mannheim
AmpliTaq Gold (5 U/μl)	Applied Biosystems Mannheim
BCA-Protein Assay	Pierce, Rockford, IL, USA
Biocoat Matrigel Invasion/Control chambers	Becton & Dickinson Labware, Heidelberg
CytoMatrix™ Cell Adhesion-Assay	Chemicon, International, Temecula, CA, USA
DAB-Substrat-Kit SK4100	Linaris, Wertheim
Diff-Quick Färbeset	Dade Behring, Marburg
ECL Enhanced Chemilumineszenz Kit	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
LipofectAMINE® 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Magnet Assisted Transfection-Kit MaTRA™	IBA GmbH, Göttingen
MTT-Labeling Reagent	Roche, Mannheim
Nuclear-Extraction-Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Reblot-Solution mild	Chemicon, International, Temecula, CA, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript First Strand cDNA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal West Pico Chemiluminescent	Pierce, Rockford, IL, USA
Taq DNA Mastermix Kit	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Qiagen, Hilden
TransAM™ Assay	Active Motif, Rixensart, Belgien
TriZOL-Reagenz®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Vectastain Elite ABC-Kit	Linaris, Wertheim
VenorGem® Mycoplasmandetektionskit	Minerva-Biolabs, Berlin

Einmal-Plastikartikel wurden von verschiedenen Firmen wie Greiner BioOne (Frickhausen), Becton & Dickinson (Heidelberg), Sarstedt (Nürnbrecht), Falcon (B & D; Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg) bezogen und wurden nicht im Einzelnen aufgezählt.

2.1.1.2 PCR-Primer

Die aufgeführten PCR-Primer wurden für die PCR-Reaktion verwendet.

Tabelle 2.3.: Verwendete PCR-Primer.

pTRE2 Sequenzierungs- und PCR-Primer

5'-Primer: 5'-CGCCTGGAGACGCCATCC-3'
 3'-Primer: 5'-CATTCTAAACAACACCCTG-3'

2.1.1.3 Plasmide

Die aufgeführten Plasmide wurden für die Transfektionen der Zelllinien verwendet.

Tabelle 2.4.: Verwendete Plasmide.

<i>Plasmid</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Quelle</i>
pTetON	Expression des Tet-Regulators rtTA	BD Biosciences, Pharmingen
pTRE2luc	Induzierbarer Expressionsvektor mit Luciferase-Reportergen in Teton-Zelllinien	BD Biosciences, Pharmingen
pTRE2pur	Reporterplasmid für die induzierbare Expression in Teton-Zelllinien	BD Biosciences, Pharmingen
Fra-2-pTRE2Pur	Induzierbarer Expressionsvektor für Fra-2 in Teton-Zelllinien	Diese Arbeit
Fra-1-pTRE2Pur	Induzierbarer Expressionsvektor für Fra-1 in Teton-Zelllinien	Diese Arbeit
pIRES-P	bicistronischer Expressionsvektor mit Puromycin-Resistenz	Dr. Assmann, UKE Hamburg
pFra-2-Flag-pIRES-P	Expressionsvektor für Fra-2 mit Flag-Epitop in pIRES-P	Milde-Langosch/ Bamberger 2004
pFra-1-Flag-pIRES-P	Expressionsvektor für Fra-1 mit Flag-Epitop in pIRES-P	Milde-Langosch/ Bamberger 2004
cFos-pIRES-P	Expressionsvektor für cFos in pIRES-P	Milde-Langosch/ Bamberger 2003

2.1.1.4 Antikörper

Die aufgeführten Antikörper wurden für Western Blot- oder FACS-Analysen verwendet.

Tabelle 2.5.: Verwendete Antikörper mit Herstellerangaben.

<i>Antikörper-Bezeichnung</i>	<i>Vertrieb</i>
anti-Actin (goat polyclonal; sc-1616)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-Alcam (mouse monoclonal; NCL-CD166)	Novocastra, Newcastle upon Tyne
anti-Cx43 (rabbit monoclonal; C6219)	Sigma Aldrich, USA
anti-ER (mouse monoclonal; NCL-ER-6F11)	Novocastra, Newcastle upon Tyne
anti-FosB (rabbit polyclonal; sc-48)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-Fra1 (rabbit polyclonal; sc-605)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-Fra2 (rabbit polyclonal; sc-604)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-goat HRP-conjugated (donkey; sc-2020)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-HCAM (CD44) (mouse monoclonal; sc-9960)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-human CD44 FITC	Diaclone Research
anti-ICAM-1 (mouse monoclonal; sc-8439)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-ID3 (rabbit polyclonal; sc-490)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-mouse HRP-conjugated (goat; sc-2005)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-NCAM-L1 (mouse monoclonal; UJ12711; sc-53386)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
anti-rabbit HRP-conjugated (goat; sc-2004)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
goat-anti-mouse Ig APC	BD Biosciences Pharmingen
Isotype Control Human IgG1	Dianova, Hamburg
Isotype Control Mouse IgG1 FITC (130-092-213)	Miltenyi Biotec
Isotype Control Mouse IgG1 PE	eBiosciences
Isotype Control Mouse IgG2a (130-091-835)	Dako, Dänemark
Isotype Control Rat IgG2a PE (Clone eBioALC-48)	eBiosciences
PE-anti-human CD15 (130-91-375)	Miltenyi Biotec
PE anti-human ICAM-1 (CD54)	eBiosciences
PE anti-human CD171 L1CAM (Clone eBio 5G3)	eBiosciences
recombinant human E-Selektin/Fc Chimera (724-ES)	R&D Systems, Europe

Tabelle 2.6.: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben.

<i>Gerät-Bezeichnung</i>	<i>Vertrieb</i>
Analysenwaage Satorius	MS Laborgeräte, Heidelberg
Autoradiografie-Kassetten	Protec Medizingeräte
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Bioluminenzgerät Bioluminat LB 9507	Berthold, Wildbad
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Blotting Paper	Bio-Rad Laboratories München
Compact2 x-Ray Film Hyper-Processor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Densitometer GS700	Bio-Rad Laboratories München
DVD Panasonic IQ M800	Panasonic, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS600	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FACScalibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Geldokumentation-System GeneGenius 2	Syngene, Cambridge UK
Hoefler Standard Vertical Slab Unit SE600	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefler Transphor Unit TE 42	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm ECL Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore, Eschborn
Magnetrührer RO5	Ikawerke Janke und Künkel, Staufen
Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau
Micro-Dismembrator	Braun Biotech, Melsungen
Mikroskop Axiovert 40c	Zeiss, Jena
Mini Vac power	Peqlap Biotechnologies, Erlangen
Nanodrop ND1000	Delaware, USA
pH-Meter	inoLap WTW, Heidelberg
Pipettus Brand accujet pro	Brand, Wertheim
Sunrise TECAN Elisagerät	Tecan, Crailsheim
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Thermocycler Peltier Cycler PTC-200	Biozym, Oldendorf
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Heidolph	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Wärmeplatte für Mikroskop Zellkultur HT200	Minitüb GmbH
Wasserbad	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wide Mini Sub Elektrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories München
Zeiss Axiovert 200 + Videocamera-Modul	Zeiss, Jena
Zellkultur-Mikroskop Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
Zellkulturschränke HeraCell	Thermo Scientific; Dreieich
Zell-Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Zellbiologisches Material

2.1.2.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 2.7.: Humane Mammakarzinom-Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

<i>Zelllinie</i>	<i>Herkunft / Eigenschaft</i>	<i>Quelle</i>
MDA-MB231	HTB 26; humane Brust-Adenokarzinom Zelllinie; ER und PR negativ, mesenchymal	ATCC, Rockville, USA
MCF-7	HTB 22; humane Brust-Adenokarzinom Zelllinie; ER und PR positiv, epithelial	ATCC, Rockville, USA

2.1.3 Patientenmaterial

2.1.3.1 Tumorgewebe für die Genexpressionsstudien

Das analysierte Mammakarzinomgewebe wurde von der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde nach der operativen Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das verwendete Kollektiv für die Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Fra-2 Expression bestand aus Mammakarzinomgewebe von 75 Patienten, wobei die Tumore von 74 weiblichen und einem männlichen Patienten entstammten. Die Patienten erhielten im Zeitraum von 1991 bis 2001 in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eine operative Therapie und von 56 Patientinnen konnten Verlaufsdaten (Follow-up-Daten) erhoben werden. Der mittlere Beobachtungszeitraum betrug im Median 66 Monate (6 – 125 Monate). Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 58 Jahre (25 – 90 Jahre).

Für die Western Blot-Analyse der Adhäsionsmoleküle L1CAM und ICAM-1 wurde ein Kollektiv von 106 Patientinnen ($n = 106$) herangezogen, die im Zeitraum von 1991 bis 2002 in der Frauenklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt worden sind. Für 93 der 106 behandelten Fälle lagen Follow-up Daten vor, der mittlere Beobachtungszeitraum betrug 84 Monate (8 – 169 Monate). Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 57 Jahre (25 – 90 Jahre).

Für die Genexpressionsanalyse anhand von cDNA Microarrays stand ein Kollektiv von 167 Patientinnen ($n = 167$) zur Verfügung, die im Zeitraum von 1991 bis 2002 in der Frauenklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt worden sind. Die Genexpressionsanalyse wurden mit dem cDNA-Microchip HG U133A (Affymetrix; Santa Clara, USA) und dem GeneChip SystemTM von Dr. Ralph Wirtz von der Firma Siemens Healthcare Diagnostic, Köln durchgeführt. Für 165 der 167 untersuchten Fälle lagen Follow-up Daten vor, der mittlere Beobachtungszeitraum betrug 84 Monate (8 – 169 Monate). Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 56 Jahre (29 – 85 Jahre). Eine Überlappung von 24 Fällen bestand zwischen den beiden untersuchten Kohorten.

Von jeder Patientin in den verwendeten Kohorten sind folgende klinische und tumorbiologische Parameter erfasst: Alter, Tumor-Stadium, Nodalstatus, histologisches Grading und Steroidhormon-Rezeptorstatus (Östrogen und Progesteron).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen fanden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturarbeitsbank statt. Die Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, in Zellkulturflaschen (T25 bzw. T75 cm²) bzw. Zellkulturschalen (6-, 12-, 24- oder 96-well-Plates) kultiviert.

2.2.1.2 Passagieren Zelllinien

Die Zellen wurden entweder in DMEM/HAM F12 –Medium im Verhältnis 1:1 mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin / 100 U/ml Streptomycin bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Die *pTetOn* stabil transfizierten MDA MB 231- bzw. MCF-7-Teton-Zellen wurden unter Zusatz von 400 µg/ml G418 (Neomycin-Analogon Geneticin) und nach der zweiten stabilen Transfektion mit den *pTRE*- Vektoren zusätzlich mit 1 µg/ml Puromycin kultiviert. Die mit dem Expressionsvektor pIRES transfizierten Zellen wurden mit 1µg/ml Puromycin kultiviert.

Zum Passagieren wurden die Zellen bei 70 – 90 % iger Konfluenz mit temperaturadaptierten PBS (37°C) gewaschen mit Trypsin/EDTA versetzt und bis zum vollständigem Ablösen der Zellen auf einer Wärmeplatte (37°C) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden daraufhin in frischem Kulturmedium resuspendiert und in adäquater Verdünnung in eine neue T25 Kulturflasche ausgesät.

Verwendete Kulturmedien:

Kulturmedium für MDA MB231:

Dulbecco´s Modified Essential Medium (DMEM)
HAM F12 Nutrient Mixture
Fötale Kälberserum (FBS) 10 %
L-Glutamin 1 %
Penicillin/Streptomycin 1%

Kulturmedium für MCF-7:

Dulbecco´s Modified Essential Medium (DMEM)
HAM F12 Nutrient Mixture
Fötale Kälberserum (FBS) 10 %
L-Glutamin 1 %
Penicillin/Streptomycin 1%
Insulin 0,1 %

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beim Passagieren mit PBS gewaschen, trypsiniert und abzentrifugiert. Dann wurden sie in eiskaltem FCS-haltigen Medium mit 2 % DMSO resuspendiert und die Suspension unverzüglich in ein Kryoröhrchen überführt, bei -80 °C eingefroren und für die längerfristige Lagerung und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die tiefgekühlten Kryoröhrchen unter Schwenken in der Hand aufgewärmt. Dann wurde die Zellsuspension in kaltes Kulturmedium überführt und durch Zentrifugation (1200 rpm, 4 min bei RT) pelletiert. Anschließend wurde das im Überstand befindliche DMSO abgesogen und das Pellet in entsprechenden Kulturmedium aufgenommen. Nach ca. 24 h wurde das Medium zur Entfernung von weiteren DMSO-Resten gewechselt und bei Bedarf die Selektionsantibiotika zugesetzt.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zahl der in einer Suspension befindlichen Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren mit der Pipette vereinzelt. Ca. 20 µl der Zellsuspension wurden in eine Zählkammer nach Fuchs/Rosenthal (16 Großquadrate mit je 1 mm Seitenlänge und einer Kammerhöhe von 0,2 mm) überführt. Durch Auflegen des Deckglases auf die zuvor angefeuchteten Träger und die in die Zählfelder eingravierten Linien ergibt sich ein definiertes Volumen, in dem die Lebendzellzahl durch Auszählung von 3 Großquadraten unter einem Lichtmikroskop bestimmt werden kann.

2.2.1.5 Bestimmung einer minimal-letalen Antibiotika-Konzentration in der Zellkultur

Vor jeder Transfektion der Zellen musste die Überlebensfähigkeit der verwendeten Zelllinien in verschiedenen Konzentrationen des Selektionsantibiotikums getestet werden. Bei Verwendung einer zu geringen Konzentration des Antibiotikums findet keine Selektion potentieller Transfektanten statt, wohingegen eine zu hohe Konzentration zum Absterben der transfizierten Zellen führen. Für die Versuchsreihe wurden die Zellen vor der Transfektion in 6-well-Kulturplatten bis zu einer Konfluenz von 80 % - 90 % angezogen und dann mit unterschiedlichen Antibiotika-Konzentrationen für zwei weitere Wochen kultiviert. Für die Transfektionen mit dem Expressionsvektor pIRES-p wurde das Antibiotikum Puromycin in einer Konzentrationsreihe von 250 ng/ml bis 1000 ng/ml getestet. Für die Transfektionen mit dem induzierbaren Teton-Vektor pTRE2 wurde das Antibiotikum Geneticin (G418) in einer

Konzentrationsreihe von 200 µg/ml bis 400 µg/ml getestet. Im Abstand von drei Tagen wurde das Medium mit der entsprechenden Konzentration an Antibiotika gewechselt. Als Selektions-Druck nach den Transfektionen wurde die Antibiotika-Konzentration gewählt, bei der nach Ablauf der zwei Wochen alle Zellen in dem well abgestorben waren (400 µg/ml G418, 1 µg/ml Puromycin).

2.2.2 Stabile Transfektionen und Selektion der Zellklone

Die stabilen Transfektionen wurden mit Lipofectamine[®]2000 oder durch Magnet-Transfektion (MATra[™]) durchgeführt. Einen Tag nach der Transfektion wurden den Zellen das entsprechende Selektionsantibiotikum zugeben und weiter kultiviert, bis Einzelzellklone von etwa 100 Zellen erkennbar waren. Diese wurden nach Trypsinierung unter dem Mikroskop durch Einsaugen mit einer 100 µl-Pipettenspitze isoliert und in Zellkulturplatten mit 96 wells angezogen.

2.2.2.1 Transfektion

Für die Transfektion der MDA MB231 bzw. MCF-7 Zellen wurden verschiedene Transfektionsprotokolle etabliert. Da die MDA MB 231 mesenchymal wachsen, hatte sich die mit Lipofektamin-vermittelte Transfektion als die Methode der Wahl herausgestellt. Alle Transfektionen erfolgten 24 – 48 h nach Aussaat in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen, die dazu in der Regel in Zelldichten von 10^5 pro cm^2 Kulturfläche ausgesät wurden. Die Zellzahlen und DNA-Mengen abhängig von der Fläche der Zellkulturschale wurden wie im jeweiligen Protokoll angegeben gewählt.

2.2.2.1.1 Lipofektamin-Transfektion

Bei dem Transfektionsreagenz LipofectAMINE[®]2000 handelt es sich um eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids in Kombination mit einem neutralen Colipid (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Es bewirkt die Bildung kompakter Lipid/DNA-Komplexe und ermöglicht somit eine effiziente Aufnahme in eukaryontischen Zellen. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 12 Vertiefungen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 60 % kultiviert. Zur Komplexbildung wurden Lösungen von 2 µg zu transfizierender Plasmid-DNA in entsprechender Menge DMEM/HAM F12-Medium (serum- und antibiotikumfrei) sowie 10 µl LipofectAMINE[®]2000 in entsprechender Menge des gleichen

Mediums gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 400 µl serumfreies Medium zugefügt. Nach Zugabe des Plasmid-DNA/Lipid-Komplexes und 3-stündiger Inkubation wurden 0,5 ml serumhaltiges Medium (20 % FCS) zugesetzt. Nach 48 h erfolgte die Zugabe eines mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Mediums.

2.2.2.1.2 Magnet-Transfektion

Die MATra™-Methode („Magnet Assisted Transfection“/ IBA GmbH, Göttingen) wurde zur Zelltransfektion von epithelartig wachsenden Kulturen wie MCF-7-Zellen verwendet. Mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln (MagTag™) konnte eine hocheffiziente Transfektion ermöglicht werden. Mit dieser Technik wurde die entsprechende Plasmid-DNA in einem ersten Schritt an die Magnetpartikel gebunden. Durch die Einwirkung eines Magnetfeldes wurde die gesamte Nukleinsäuredosis schnell zu den Zellen hin und in die Zellen hinein transportiert (Abb.2.1). Das Magnetfeld wurde mit Hilfe einer 24er-Magnet-Platte erzeugt.

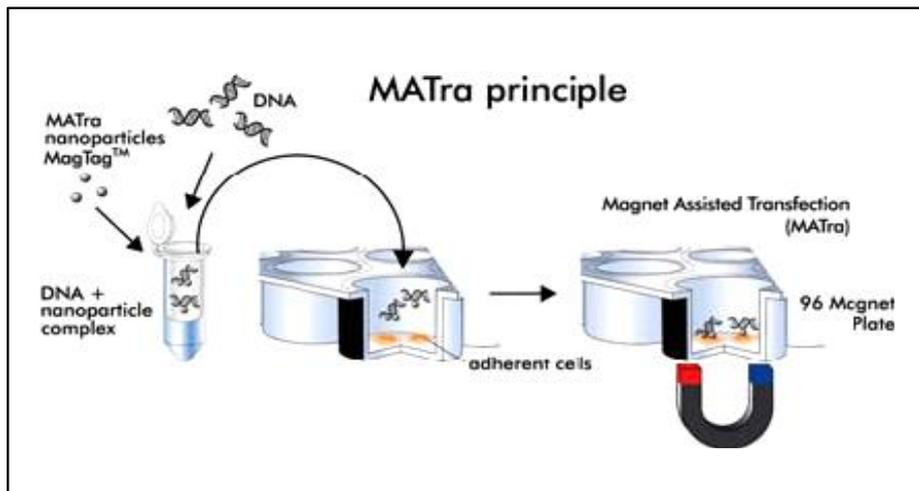


Abbildung 2.1: Prinzip der Magnet-Transfektion der Firma IBA GmbH,

2.2.3 Das Doxycyclin-regulierbare Expressionssystem TetON®

Zur Herstellung stabiler Mammakarzinom-Zelllinien wurde die cDNA des Transkriptionsfaktor Fra-2 in ein pharmakologisch durch das Tetracyclin-Derivat Doxycyclin regulierbares Expressionssystem (TetON®) subkloniert. Gossen und Bujard (1992) entwickelten aus dem Tetracyclin-Resistenz-Operon (Tn10 Transposon) aus *E.coli* ein induzierbares Expressionssystem für eukaryote Zellen. In dem so genannten Tet-System wird

durch Zugabe (TetON[®]) oder Entfernung (TetOFF[®]) von Doxycyclin die Expression des subklonierten Gens an- oder ausgeschaltet. Für das Tet-System werden doppelt stabile Zelllinien benötigt, die zum einen mit dem Regulatorplasmid *pTetON* und zum anderen mit dem Responseplasmid *pTRE2pur* (enthält die cDNA des interessierenden Gens) transfiziert werden. Das *pTetON*-Plasmid enthält eine Neomycin-Resistenz unter einem SV40-Promotor, so dass eine Selektion potentieller Transfektanten mit Hilfe des Neomycin-Analogon Geneticin (G418) erfolgen kann. Das Regulatorplasmid kodiert für einen reversen Tet-Repressor (tetR), der unter der Kontrolle eines minimalen CMV-Promotors ($P_{\min CMV}$) steht und somit konstitutiv exprimiert wird. Das Responseplasmid (*pTRE2pur*) enthält ein Puromycin-Resistenzgen und die regulatorische Domäne TRE (Tetracyclin Responsive Element), die den minimalen CMV-Promotor kontrolliert. Die TRE-Domäne besteht aus einer siebenfachen Wiederholung der 42 bp–umfassenden tet-Operator-Sequenz tetO. In Abwesenheit von Doxycyclin ist der reverse Tet-Repressor (tetR) zusammen mit Transkriptions-Transaktivator (tTA) an die TRE-Domäne gebundenen und das zu untersuchende, einklonierte Gen kann nicht abgelesen werden. Die Transkription des zu untersuchenden Gens kann erst durch einen reversen Transaktivator (rtTA), der sich in vier Aminosäuren von dem tTA unterscheidet, aktiviert werden. In Anwesenheit von Doxycyclin bindet der reverse Transaktivator rtTA an die TRE-Domäne und initiiert die Transkription (Abb. 2.2).

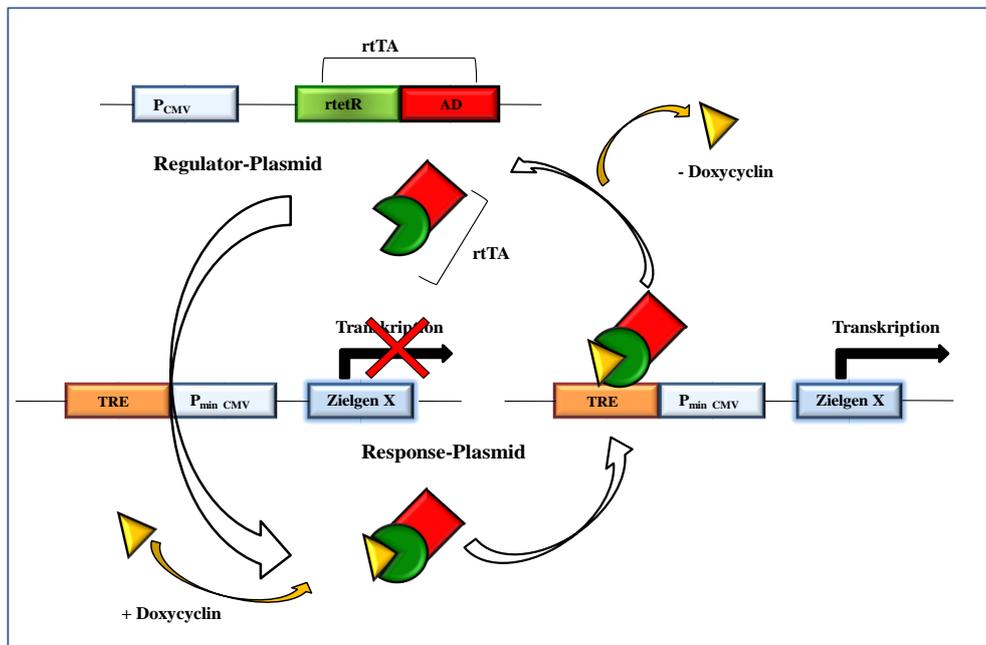
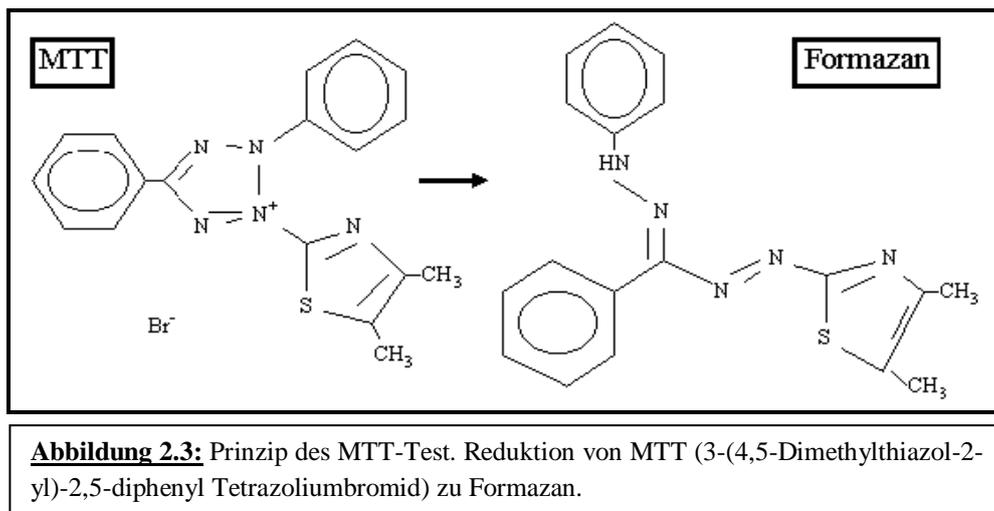


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des TetON[®] Systems. Abkürzungen: P_{CMV} : Promotor vom Cytomegalie-Virus; *rtetR*: reverser Tetracyclin-Repressor; *AD*: Aktivierungsdomäne; *rtTA*: reverser Tetracyclin-abhängiger Transaktivator; *TRE*: Tetracyclin-abhängige Domäne; $P_{\min CMV}$: Minimal-Promotor vom CMV (verändert nach <http://www.clontech.com>).

2.2.4 Proliferationsassay

Das Prinzip eines Proliferationsassay besteht darin, dass lebende Zellen die Fähigkeit haben, Tetrazolium-Salze wie MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid) oder XXT (Natrium-3'-(1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium)-Bis(4-Metoxy-6-Nitro)-Benzen-Sulfonsäurehydrat) in der Atmungskette zu Formazan umzusetzen (Abb. 2.3). Die mitochondrialen Dehydrogenasen reduzieren das gelbfarbene Tetrazoliumsalz MTT zu violettfarbenen Formazankristallen, die dann in einem Elisa-Reader (TECAN Sunrise) spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 540 nm (Referenzwellenlänge bei 650 nm) erfasst werden können. Hierfür wurden die Zellen auf ein 96-well-Plate ausgesät, nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von MTT-Lösung in die jeweiligen wells und weitere vier Stunden später wurde Solubilizationslösung hinzugefügt. Schließlich wurde die Platte im Elisa-Reader gemessen. Im Abstand von weiteren 24 Stunden, d.h. 48 h und 72h nach dem ersten Test erfolgten weitere Messungen. Je Zelllinie mit 5000 Zellen pro Ansatz wurden mindestens vier Einzelmessungen mit einer Doppelbestimmung durchgeführt.



2.2.5 Invasions- und Migrationsassays

Nähere Untersuchungen zum Invasions- bzw. Migrationsverhalten von Tumorzellen bietet der so genannte Invasionsassay. Diese *in-vitro* Methode wurde erstmals von ALBINI (1987) als „Boyden chamber assay“ beschrieben und kann zur Quantifizierung des Invasionspotenzials von Tumorzellen herangezogen werden.

Unter Invasion wird die Durchwanderung der Basalmembran, eines spezialisierten Teils der extrazellulären Matrix, durch Tumorzellen verstanden, eine Voraussetzung für die Metastasierung von Tumoren. Die Basalmembran erfüllt in der Zelle vielfältige Funktionen:

Sie bietet den Zellen einerseits eine Haftfläche und kann somit das Wachstums-, Regenerations- und Differenzierungsverhalten beeinflussen und andererseits fungiert sie aufgrund ihrer selektiven Permeabilität zusätzlich als Filtrationsschranke. Die wichtigste strukturelle Komponente der Basalmembranen ist das Kollagen IV, welches sich von den anderen Kollagentypen (I, II und III) hinsichtlich der Zusammensetzung sowie der Flexibilität als auch der Elastizität unterscheidet.

Der Versuchsaufbau eines Invasionsassay besteht aus zwei Kammern, die durch eine künstliche Basalmembran (Matrigel[®]) voneinander getrennt sind. Das Matrigel[®] ist ein lösliches Basalmembran-Extrakt des Engelbreth Holm-Swarm Maus-Sarkom, welches bei Temperaturen um 37°C geliert und in der Zusammensetzung, Struktur und physikalischen Eigenschaft einer natürlichen Basalmembran ähnelt. Die Hauptbestandteile der Matrigel[®]-Matrix sind Kollagen IV, Laminin, Entacin und Heparansulfat-Proteoglykan.

Diese Kammern sind kommerziell erhältlich und können von der Firma Becton & Dickinson Labware, Bedford (Biocoat Matrigel Invasion chamber 24 wells) bezogen werden.

Das Migrationsassay erfolgte analog zum Invasionsassay, hierbei kann die alleinige Migration der Zellen erfasst werden. Die porösen Böden der Kammern sind nicht mit dem Matrigel[®] beschichtet und somit kann ausschließlich die Migrationsfähigkeit der Zellen von Ober- zu Unterseite beurteilt werden. Diese Kammern sind ebenfalls bei der Firma Becton & Dickinson Labware, Bedford (Biocoat Control Inserts 24 wells) erhältlich. Die Durchführung des Invasionsassay erfolgte gemäß Protokoll des Herstellers (B & D Biosciences, Heidelberg). Im Falle der MDA MB231 Zellen wurden pro well 50000 Zellen ausgesät und für die MCF-7 Zellen wurden pro well 100000 Zellen verwendet.

2.2.6 Luciferase-Test-System

Die Firefly-Luciferase ist ein 61 kDa schweres Proteinmonomer, das keine posttranslationale Veränderung für seine Enzymaktivität benötigt. Somit kann es als genetischer Reporter sofort nach erfolgter Translation fungieren. Die Lichtemission wird durch Oxidation des Käfer-Luziferins in einer Reaktion, die ATP, Mg²⁺ und O₂ benötigt, erreicht. Unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Oxidation durch ein Luciferyl-AMP-Zwischenprodukt, das sehr langsam umgesetzt wird. Dadurch entsteht ein Lichtblitz, nachdem Substrat und Enzym gemischt wurden. Die Kinetik der Reaktion liefert ein während der Messung nur langsam

abnehmendes Lumineszenzsignal. Diese genetischen Reportersysteme sind weit verbreitet, um eukaryontische Genexpression und zelluläre Physiologie zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde das ‐Luciferase Assay System‐ von Promega verwendet, um zum einen geeignete induzierbare Teton-Zellen zu generieren und zum anderen wurde in transienten Transfektionen mit verschiedenen Promotorkonstrukten überprüft, ob der Transkriptionsfaktor Fra-2 einen Einfluss auf die Fra-1 Expression ausübt. Hierfür standen dank einer Kooperation mit Dr. S.P. Reddy von Johns Hopkins University in Baltimore Luciferase-Reporter-Konstrukte mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten von Fra-1 zur Verfügung (ADISESHAIHAH ET AL., 2003).

Zellen, die mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt transient transfiziert waren, wurden nach 24 oder 48 Stunden geerntet und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Sämtliche Arbeitsschritte waren auf Eis durchzuführen, da die Luciferase ein wärmelabiles Enzym ist. Die Zellen wurden bei 5000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µl Harvesting-Puffer (50 mM NaMES pH 7.8, 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 2 % Triton X-100 und 10 mM DTT) resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 13000 rpm und 4°C für weitere 5 min zentrifugiert. Die Luciferase-Aktivitätsbestimmung erfolgte in einem Biolumineszenzgerät der Firma Berthold (Berthold, Lumat LB 9501), das auf zehnhundertstel Sekunden lange Messung programmiert wurde. In Sarstedt-Meßröhrchen wurde durch Zugabe von 100 µl Luciferase-Assay-Puffer (125 mM NaMES pH 7.8, 125 mM Tris-HCl pH 7.8, 25 mM MgAc, 2 mg/ml ATP) zu 20 µl Zelllysat nach Durchmischung die Reaktion im Luminometer gestartet. Die enzymatische Reaktion wurde unter Angabe von RLU (relative light units) gemessen.

2.2.7 Adhäsion an verschiedene Matrixproteine (CytoMatrix™ Cell Adhesion-Assay)

Für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens an Substanzen der extrazellulären Matrix wurde der CytoMatrix™ Cell Adhesion-Assay (Chemicon, International, Temecula, CA, USA) verwendet, bei dem 96-well-Platten mit vier verschiedenen Proteinen (Fibronectin, Vitronectin, Collagen I und Collagen IV) der extrazellulären Matrix beschichtet waren. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurden 100 µl der Zellsuspension (10^5 Zellen/ml) in jedes well der 96 well-Platte eingebracht und die Platten 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand mit den nicht-adhären Zellen

abgenommen, die wells der 96 well-Platte gewaschen, mit Kristallviolett gefärbt und anschließend im Elisagerät (TECAN Sunrise) bei einer Absorption von 578 nm ausgewertet. Mit BSA beschichtete wells in den Platten dienten als Negativ-Kontrolle und die Werte dieser Kontrollen wurden als Hintergrund von allen anderen Werten abgezogen.

2.2.8 Zellfluss-Experimente

Mit Hilfe von Zellflussexperimenten kann der physiologische Zustand in postkapillären Venolen simuliert werden und so die Interaktion von E-Selektin als Endothelmarker und den Fra-2 überexprimierenden Zellen analysiert werden. Mit dieser Methode werden dynamische Bedingungen geschaffen, wie sie im physiologischen Zustand bei der Interaktion zwischen Zellen im Blutstrom und Gefäßendothelzellen in den Venolen vorherrschen. Anhand eines Mikroskops mit integrierter Videokamera wird zum eine eine genaue Beobachtung dieser Interaktion gewährleistet und zum anderen durch Videoaufzeichnung eine quantitative Auswertung ermöglicht. Für diese Arbeit stand ein System von der Arbeitsgruppe Prof. Udo Schumacher (Institut für Anatomie; UKE Hamburg) zur Verfügung. In der folgenden Abbildung ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt (Abb. 2.4).

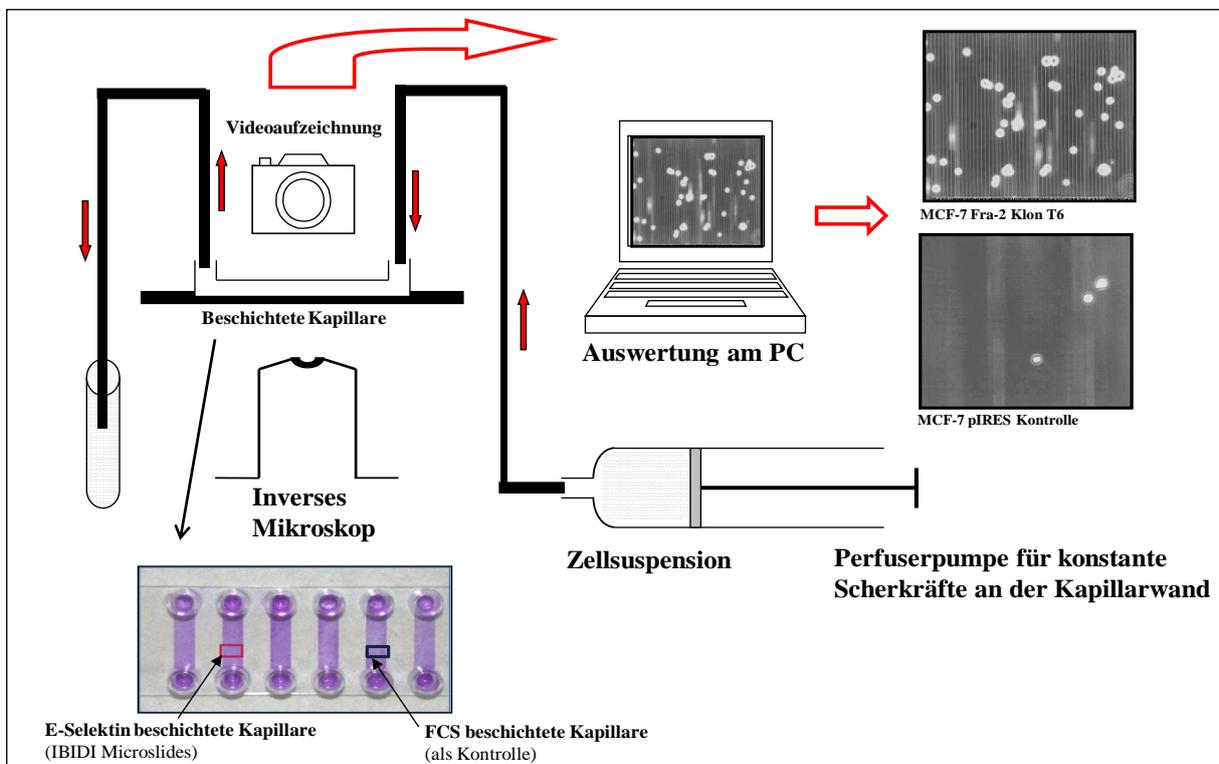


Abbildung 2.4: Aufbau des Zellflussexperiments unter Echtzeit-Beobachtung.

Als Kapillare kamen Microslides der Firma IBIDI (IBIDI GmbH; Martinsried) zum Einsatz. Die Microslides vom Typ IV bestehen aus einem Kunststoffträger, auf dem sich sechs parallel zueinander angeordnete Kapillare befinden (Abb. 2.4). Sie besitzen einen Querschnitt von $0,4 \times 3,8$ mm und erfassen ein Volumen von $30 \mu\text{l}$. In diesen Kanälen lässt sich dann eine streng laminare Strömung erzeugen. Die Kanäle werden mit verschiedenen Beschichtungen kommerziell angeboten, aber für die Beschichtung mit E-Selektin wurde die ibiTreat-Beschichtung verwendet. Hierzu wurde rekombinantes humanes E-Selektin (Fc-Chimere, R&D Systems) in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ in PBS eingesetzt. Die Kapillaren wurden 30 min vor Versuchsbeginn mit $30 \mu\text{l}$ dieser E-Selektin-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Kontrollansätze wurden unspezifische Bindungsstellen in den Kapillaren mit FCS (10 %) ebenfalls für 30 min geblockt. Pro Versuchsansatz wurden die Zelllinien durch zwei Kapillare perfundiert, zunächst durch eine mit FCS behandelte als Kontrollansatz und dann durch die mit E-Selektin beschichtete Kapillare. Zur Perfusion der Kapillaren mit der Zellsuspension wurde eine Perfuserpumpe eingesetzt, mit der definierte Flussraten und damit genaue und konstante Scherkräfte erzeugt wurden und ohne Flussunterbrechung variiert werden konnten. Der Flussvorgang wurde mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 200) verfolgt. Die Auswertung erfolgte mit einem speziell für solche Anwendungen entwickeltem Programm (CapImage, Dr. Zeintl; Heidelberg), dessen Grundprinzip der Geschwindigkeitsmessung von fließenden Zellen auf der Erzeugung von so genannten Line-Shift-Diagrammen (LSD) basiert (Abb.2.5).

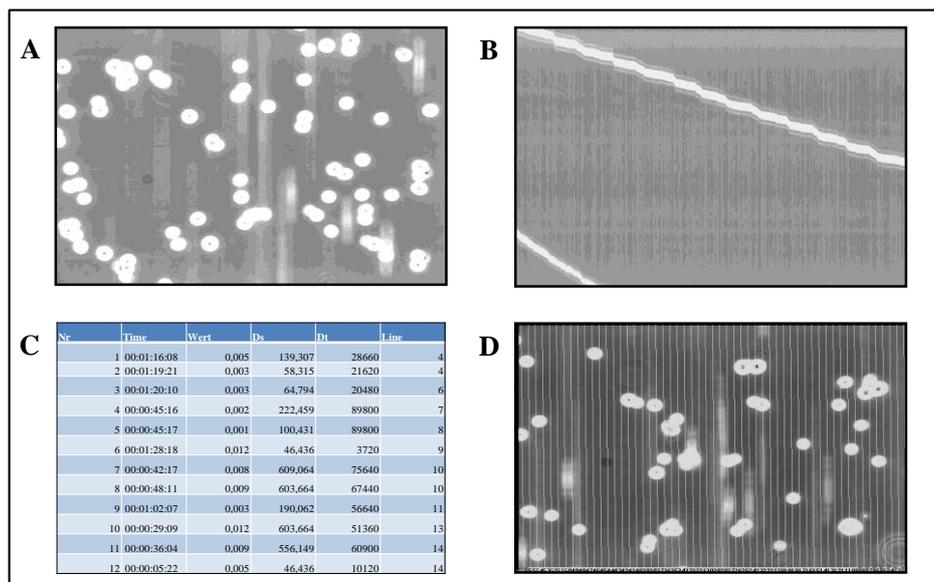


Abbildung 2.5 A-D: Zellflussexperiment mit Echtzeitbeobachtung bei einer Scherkraft von 5 dyn/cm^2 auf E-Selektin-beschichteten Kapillaren. **A:** Momentaufnahme rollender Zellen; **B:** LSD-Darstellung der Hilfslinie eines E-Selektin-vermittelten Zellrollens; **C:** Beispiel eines LS-Diagramms; **D:** Darstellung des Gitters von Hilfslinien über rollende Zellen.

Hierbei wird zunächst im Bildfeld, das vom Monitor erstellt wird, eine Hilfslinie in Richtung des Zellflusses von dem Punkt, an dem die Zelle das erste Mal im Bildfeld auftaucht, bis zum Punkt des Verschwindens gezogen. Anschließend wird die Aufnahme abgespielt und die betrachtete Zelle läuft entlang der Hilfslinie durch das Bildfeld (Abb. 2.5 B).

Parallel dazu wird ein LS-Diagramm erstellt, dessen x-Achse die Untersuchungszeit (2 min) und die y-Achse die Länge der untersuchten Strecke (Länge der Hilfslinie) darstellt. Das Programm setzt nun zeitlich aufeinander folgende Abbildungen der Länge der Hilfslinie und der Breite eines Bildpunktes nebeneinander. Da die Kamera 25 Bilder pro Sekunde erzeugt, decken 3000 nebeneinander gesetzte Abbildungen einer Hilfslinie den Untersuchungszeitraum von 2 min ab (Abb. 2.5 C). Eine Zelle, die sich zum Zeitpunkt $t = 0$ am Anfang der Hilfslinie befindet erzeugt eine Weißfärbung. Bewegt sich die Zelle gradlinig gleichförmig weiter, wandert im gleichen Zuge auch die Weißfärbung Richtung Ende der Hilfslinie. Werden anschließend die Hilfslinien in ihrer zeitlichen Abfolge aneinander gesetzt, ergeben die Weißfärbungen eine Gerade, die mit einer bestimmten Steigung diagonal im LS-Diagramm verläuft. Die Steigung der Geraden repräsentiert dabei mit $v = \frac{s}{t}$ die

Geschwindigkeit der erfassten Zelle. Um entsprechend jede einzelne Zelle, die im Bildfeld erscheint, zu dokumentieren, wird nicht nur eine einzige, sondern ein Gitter von 55 gleichmäßig verteilten Hilfslinien erzeugt, so dass letztlich pro Versuch 55 LS-Diagramme erzeugt werden (Abb. 2.5 D).

Für den Zellflussversuch wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach Erreichen der Zelldichte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Cell Dissociation Buffer (Gibco; Invitrogen) von der Kulturflasche abgelöst. Da das üblicherweise verwendete Trypsin-EDTA die Oberflächenstrukturen von Zellen angreift, wurde dieses Reagenz durch den Cell Dissociation Buffer ersetzt. Für die Perfusion durch die Kanäle wurden 100.000 Zellen pro ml eingesetzt.

2.2.9 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) dient der Untersuchung von Zellen und Zellpopulationen im Hinblick auf Zellgröße, Granularität sowie auf die Expression bestimmter (Oberflächen-) Moleküle. Dazu werden in einem FACS-Gerät die Zellen einer Zellsuspension einzeln in einer Kapillare an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und vermessen. Während Größe und Granularität der Zellen direkt aus der Extinktion bzw. der Streuung des Laserstrahls vom Gerät berechnet werden, bedarf es zur Detektion bestimmter Oberflächenmoleküle einer Vorbehandlung mit spezifischen Antikörpern. Diese sind entweder direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, oder ein fluoreszierender sekundärer Antikörper bindet an den Fc-Teil des molekülspezifischen primären Antikörpers. Die vom Gerät detektierte Fluoreszenzintensität steht in Relation zur Menge des gebundenen Antikörpers und ist damit ein Maß für den Expressionslevel des untersuchten Moleküls. Um falsch negative und falsch positive Detektionen zu vermeiden, werden bei jeder Untersuchung Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt: Zur Positivkontrolle verwendet man einen Antikörper, der sicher an die zu untersuchenden Zellen bindet und in jedem Fall eine positive Fluoreszenz hervorrufen muss. Zur Negativkontrolle bedient man sich solcher Antikörper, deren Epitop nicht auf den Zellen zu finden ist (Isotyp-Kontroll-Antikörper). Zellen wurden mit einem Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC, PE, APC) markiert ist, angefärbt und im FACSCalibur von Beckton & Dickinson detektiert. Tote Zellen werden durch Zugabe von Propidiumjodid markiert, besitzen daher einen geringen "Forward Scatter" und wurden durch Festlegen eines Rasters von der Analyse ausgeschlossen. Pro Probe wurden zwischen 5000 und 10000 Ereignisse (Events) gezählt. Die Erfassung der Daten erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson), zur Auswertung wurden die Programme WinMDI und PowerPoint (Microsoft Office) verwendet.

Verwendeter Puffer:

FACS-Puffer:

1 % FCS

0,04 % Na-Azid in PBS

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Protein-Extraktion aus Zelllinien

Die Protein-Extraktion aus Zelllinien erfolgte in allen durchgeführten Schritten auf Eis. Zunächst wurde aus den Zellkulturflaschen oder den Wells vorsichtig das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen oder die Zellkulturplatte auf eine mit Eis gefüllte Schale platziert und je nach Konfluenzgrad der Zellen mit einer entsprechenden Menge eiskaltem Lysepuffer (pcsb1) gefüllt. Nach ca. einer Minute wurden dann die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Kulturgefäßes durch mehrmaliges Schaben abgelöst und mit einer Pipette in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Zellüberstand wurde durch wiederholtes Resuspendieren mit der Pipette homogenisiert. Anschließend konnten die Proben zur Konzentrationsbestimmung herangezogen oder bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert werden.

Verwendeter Puffer:

Lysepuffer pcsb1:

50 mM Tris/HCl (pH 6.8)

10 % Saccharose

1 % SDS

2.3.2 Protein-Extraktion aus Tumorgewebe

Die Protein-Extraktion aus Tumorgewebe erfolgte in allen durchgeführten Schritten auf Eis. Alle benötigten Materialien (Homogenisatoren und der Lysepuffer pcsb1) wurden vor der Verwendung vorgekühlt. Mit einem sterilen Skalpell wurde ein definiertes gefrorenes Gewebstück vom Tumor entnommen und auf einer gekühlten Unterlage in kleinere Stücke zerteilt. Die Tumorstücke wurden in mit Stickstoff vorgekühlte Teflongefäße mit Wolfram-Kugeln in einem Homogenisator (Mikro-Dismembrator) für 2 x 45 sec bei 2000 U dismembriert. Das entstandene Pulver wurde in Lysepuffer pcsb1 aufgenommen und durch mehrmaliges Resuspendieren gelöst. Das Tumorlysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung der extrahierten Proteine

Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe der Bicinchoninsäure-Methode durchgeführt. Diese BCA-Methode beruht auf dem Prinzip der Biuretreaktion, bei der Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung zu Cu^{1+} -Ionen reduziert werden und mit Proteinen in Gegenwart von Bicinchoninsäure einen blauvioletten Komplex bilden, der quantitativ in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm ermittelt werden kann. Mit Hilfe eines BSA-Proteinstandards wurde zuvor eine Eichgerade mit bekannten Konzentrationen (25 – 1000 $\mu\text{g/ml}$) angefertigt. Die Protein-Extrakte wurden mit dem Lysepuffer pcsb1 im Verhältnis 1:5 verdünnt, mit 1 ml der BCA-Lösung versetzt und für 30 min bei 37°C und 800 rpm im Thermomixer inkubiert. Die verwendete BCA-Lösung besteht aus 50 Teilen der Lösung A des Kits (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Bicinchoninsäure und Na-Tartat in 0,2 N NaOH) und einem Teil der Lösung B (4 % ige Cu_2SO_4 -Lösung), die unmittelbar vor der Durchführung miteinander vermischt werden. Anhand der vorher erstellten Eichgeraden konnten anschließend die Konzentrationen der gewonnenen Proteinextrakte im Photometer errechnet werden.

2.3.4 Hämalaun/Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Im Falle einer Hämalaun/Eosin immunhistochemischen Färbung handelt es sich um eine kombinierte Kern- und Plasmafärbung. Das positivgeladene Hämalaun geht in stark saurem Milieu mit den Nukleinsäuren des Chromatins kovalente Bindungen ein und dieses führt nach Erhöhung des pH-Wertes über 3 zu einer blauen Färbung des Zellkerns. Der Farbstoff Eosin färbt das Plasma rot. Die über Nacht bei 56°C „gebackenen“ Paraffinschnitte wurden zuerst zweimal für 10 min in Xylol entparaffiniert und dann in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 % und 80 % Ethanol) hydriert. Nach einem kurzen Spülen mit Wasser wurden die Schnitte für 7 min in Mayer's Hämalaun Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine weiteres Spülen mit H_2O und dann eine Ansäuerung der Schnitte mit HCl/Ethanol. Vor der Eosin-Färbung wurden die Schnitte für 10 min in H_2O gespült und dann für ca. 30 Sekunden in Eosin-Lösung inkubiert. Nach einem weiteren Spülen mit H_2O wurden die Schnitte einer aufsteigenden Ethanolreihe (80 %, 96 % und 100 % Ethanol) auf dem Objektträger fixiert und nach einer zweimaligen fünfminütigen Xylol-Inkubation mit Entellan eingedeckelt.

2.3.5 Western Blot-Verfahren

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) modifiziert nach LAEMMLI (LAEMMLI, 1970). Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zu einer Ladungsänderung der Proteine und zum anderen durch Zugabe von β -Mercaptoethanol unter Hitze zur Auflösung der Tertiär- und Quartärstrukturen. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe können dann im elektrischen Feld größenabhängig aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der meisten Proteine verhält sich dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer molekularen Masse (HASHIMOTO ET AL., 1983). Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte anhand eines Protein-Längenstandards (*Rainbow coloured protein molecular weight marker* von Amersham). Für den Aufbau der Western Blot-Aparatur wurden zwei Spacer zwischen zwei Glasplatten gelegt, mit Klammern fixiert und auf ein Fußteil geschraubt, damit die eingeführte Polyacrylamid-Lösung nicht ausläuft. Anschließend wurde ein 6 % iges Trenngel gegossen, und nach einer Polymerisationszeit von 30 – 60 min bei Raumtemperatur wurde auf das Trenngel das in der Zwischenzeit vorbereitete Sammelgel pipettiert. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden die durch einen eingesetzten Kamm entstandenen Taschen mit Wasser von Gelresten gesäubert, die Glasplatten wurden in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und mit frisch angesetztem Kathodenpuffer überschichtet. Die vorher vorbereiteten und mit pcsb1 und pcsb2 Puffer versetzten Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert, die Apparatur in die mit Anodenpuffer befüllte Elektrophoresekammer gesetzt und die Elektrophorese für ca. 18 h bei 55 - 65 V gestartet.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Immobilon-P-Membran transferiert, um dann in einer nachfolgenden Antikörperreaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht zu werden. Die Immobilon-P-Membran besteht aus PVDF und hat daher hydrophobe Eigenschaften. Es ist essentiell, die Membran vor der Benutzung kurz in Methanol zu schwenken, mit H₂O zu spülen und mit Transferpuffer zu äquilibrieren. Der Transfer auf die Membran wurde mit Hilfe eines Nass-Blot-Verfahrens durchgeführt. Hierfür wurde die Membran mit dem darüber liegenden Gel zwischen jeweils zwei Lagen feuchten Whatman 3MM-Papier auf jeder Seite gelegt. Der horizontale Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Immobilon-P Membran erfolgte in der mit Transferpuffer gefüllten Nass-Blot-Apparatur für 2 bis 4 Stunden bei 140 mA. Die Membran kann nach dem Blotten entweder eingeschweißt in Folie bei -20°C gelagert oder

sofort weiter verwendet werden. Dafür muss die getrocknete Membran dann vor den nächsten Schritten wieder mit Methanol aktiviert werden.

Im Falle der sofortigen Verwendung wurde die Membran in einer 5 % iger TBST-Milchpulver-Lösung für 1 h oder über Nacht auf einem Taumelschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran bei der Detektion zu verhindern. Nach dem Abdecken der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 2 x in Wasser gewaschen und anschließend für 1h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper in 1,5 % iger TBST-Milchpulver-Lösung inkubiert. Nach Inkubation mit der Antikörper-Lösung wurde die Membran 3 x für 10 min in 5 % iger TBST-Milchpulver-Lösung gewaschen, um überschüssigen nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. In einer weiteren Inkubationszeit von 1 Stunde wurde die Membran mit dem zweiten, an eine Peroxidase gekoppelten Antikörper in 1,5 % iger TBST-Milchpulver-Lösung überschichtet. In einem abschließenden Schritt wurde die Membran wiederum 4 x für 10 min in 1,5 % iger TBST-Milchpulver-Lösung gewaschen.

Verwendete Puffer:

pcsb2:

50 mM Tris-HCl (pH 6.8)
10 % β -Mercaptoethanol
10 % Saccharose
3 % SDS
0,01 % Bromphenol-Blau

Trenngel:

37,5 % AA/Bis-AA
Glycerin
10 % SDS
3 x Gelpuffer
H₂O
TEMED/APS

Sammelgel:

37,5 % AA/Bis-AA
10 % SDS
3 x Gelpuffer
H₂O
TEMED/APS

3 x Gelpuffer:

3 M Tris-HCl (pH 8.45)
0,3 % SDS

Kathoden-Puffer:

0,1 M Tris-HCl (pH 8.25)
0,1 M Tricine
0,1 % SDS

Anoden-Puffer:

0,2 M Tris-HCl (pH 8.9)

Transferpuffer:

100 mM Tris
193 mM Glycin

TBST:

20 mM Tris-HCl (pH 7.6)
137 mM Natriumchlorid
0,05 % Tween 20

2.3.5.1 Detektion der Proteine

Die Chemilumineszenzreaktion (ECL) ist eine nicht-radioaktive Methode, um die auf einer Membran immobilisierten spezifischen Antigene zu detektieren. Diese müssen dazu direkt oder indirekt an Peroxidase-markierte Antikörper gebunden sein. Das Prinzip dieser Reaktion besteht aus der Oxidation von Luminol in alkalischer Lösung, katalysiert durch die Peroxidase

und H₂O₂. Dabei sendet das angeregte Luminolmolekül Licht einer Wellenlänge von 428 nm aus. Diese Reaktion erreicht ihr Maximum nach 5 bis 20 min mit einer Halbwertszeit von ungefähr 1 Stunde. Die mit 1,5 % iger TBST-Milchpulver-Lösung gewaschene Membran wurde je nach Größe mit 10 ml oder 20 ml der ECL-Detektionslösung (Lösung 1 und 2 aus dem Chemilumineszenz-Kit, 1:1 gemischt) bedeckt. Die Membran wurde dann in eine passende Folie eingeschweißt, in eine Röntgenfilmkassette überführt und ein Röntgenfilm in der Dunkelkammer für wenige Minuten aufgelegt. Dieser Film wurde sofort in einer Entwicklungsmaschine (Hyperprocessor) entwickelt und auf der Basis dieses Ergebnisses wurden weitere Expositionszeiten abgeschätzt und eventuell erneute Filme aufgelegt.

2.3.5.2 Entfernung von Antikörpern von Membranen („Reblot“)

Um eine Membran mehrmals zu verwenden, müssen die zuvor detektierten Primär- und Sekundär-Antikörper wieder von der PVDF-Membran entfernt werden. Für diesen Vorgang wurde die Membran zweimal für 5 min mit H₂O gewaschen und anschließend für weitere 30 min mit 20 ml „Reblot-Solution mild“ von Chemicon, Temecula, USA unter leichtem Schwenken auf dem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Blockierungsschritt für 5 bis 10 min mit 5 % iger TBST-Milchpulver-Lösung, bevor die Inkubation mit einem neuen Primär-Antikörper gestartet wurde.

2.3.5.3 Densitometrische und semiquantitative Auswertung

Die quantitative Messung der spezifischen Proteinbanden auf den Röntgenfilmen wurde mit Hilfe des Densitometers GS700 von Biorad und der dazu gehörigen Bearbeitungssoftware Quantity One (Biorad) durchgeführt. Anhand des „Band Analysis Quick Guides“ und der Funktion „Volume Rect Tool“ wurden um die einzelnen Banden Rechtecke gleicher Größe gelegt und die Intensität jeder Bande (Pixeldichte) bestimmt. Als Parameter diente die relative Pixeldichte innerhalb der Rechtecke. Um Konzentrationsdifferenzen zwischen den einzelnen Proben auszuschließen, erfolgte eine Normalisierung der Werte mit den Werten von Actin, welches konstitutiv in jeder Zelle exprimiert wird.

2.3.6 TransAM-Assay

Die Bindung der an AP-1 beteiligten Untereinheiten wurde mittels des TransAM Assay (Active Motif, Rixensart, Belgien) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der spezifischen Bindung von AP-1-Untereinheiten an die TRE-Consensus-Sequenz (5'-TGAGTCA-3'). Hierfür wurde ein 96-well-plate verwendet, das mit einer Oligonukleotid-Sonde, die die TRE-Sequenz enthielt, beschichtet war. Der kolorimetrische Nachweis der an die Consensus-Sequenz gebundenen AP-1-Untereinheiten erfolgte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die mittels Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern spektralphotometrisch gemessen werden konnten (Abb. 2.6).

Die Gewinnung von Zellkern-Extrakten erfolgte mit einem NuclearExtraction Kit (ebenfalls von Active Motif) nach den Angaben des Herstellers. Die Proteinbestimmung erfolgte modifiziert nach BRADFORD (BRADFORD, 1976).

Für die Durchführung des Tests wurden 5 µg Protein des Zellkern-Extraktes pro well eingesetzt und für 1h bei RT mit der Oligonukleotid-Sonde inkubiert. Anschließend erfolgte ein 3 maliger Waschgang und die Zugabe von spezifischen Antikörpern gegen die gebundenen AP-1 Untereinheiten (Fra-1, Fra-2, c-Fos, FosB) für 1 h bei RT.

Die wells wurden wiederum gewaschen und mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (1 h, RT). Ein weiterer viermaliger Waschgang erfolgte anschließend, um überschüssige Antikörper-Reste vollständig zu entfernen. Für die Farbreaktion wurden pro well 100 µl Tetramethylbenzidin hinzugegeben und solange inkubiert bis ein Farbumschlag (blau) erfolgte. Mittels einer im Kit mitgelieferten „Stop-Solution“ wurde die Reaktion gestoppt, und dieses verursachte einen Farbumschlag von blau nach gelb. Danach wurde die Absorption bei 450 nm im Elisareader (TECAN Sunrise) gemessen.

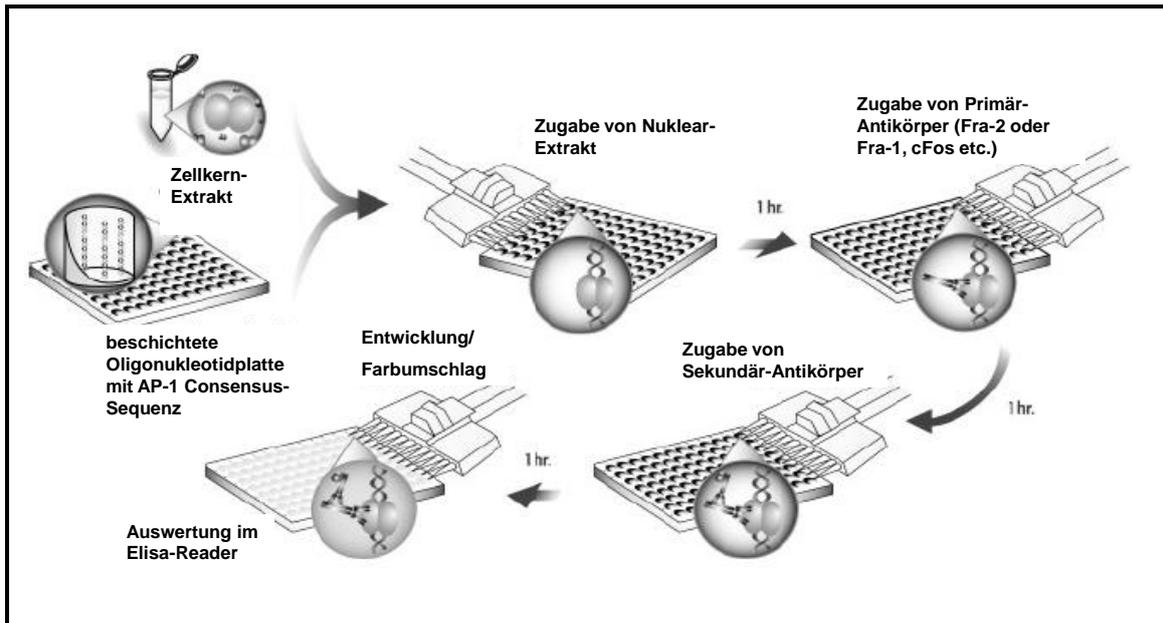


Abbildung 2.6: Ablauf des TransAM®-Assays. Modifiziert nach Active Motif, Rixensart, Belgien.

2.3.6.1 Bestimmung des Nuklear-Extraktes

Für die Nuklearextrakt-Konzentrationsbestimmung wurde die Methode nach BRADFORD (1976) verwendet. Eingesetzt wurde der Protein-Quantifizierungskit 2-D Quant Kit der Firma Amersham. Dafür wurden die Proben nach Herstellerangaben vorbereitet und anschließend bei 480 nm in einem UV-Spektrometer vermessen. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration diente eine Eichkurve, die mit definierten Konzentrationen aus BSA (2,5 -25 µg/ml) hergestellt wurde. Es wurden nur Eichkurven verwendet, die einen Fehler (ermittelt durch Lineare Regression) von unter einem Prozent aufwiesen. Außerdem wurden für jede Probe zwei Ansätze hergestellt und in einer Doppelbestimmung gemessen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von genomischer DNA aus den Zelllinien wurde das QIAmp DNA Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Die Zellen wurden in T25-Zellkulturflaschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % - 90 % geerntet. Hierfür wurde zunächst der Kulturüberstand abgesaugt, die adhärennten Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die gewonnene Zell-Suspension wurde anschließend entsprechend der Herstellerangaben aufgearbeitet. Nach Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Nano Drop-Gerätes entsprach die Ausbeute etwa 20 - 40 µg genomischer DNA.

2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus den Zelllinien wurde das TriZol[®]-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Das TriZol[®]-Reagenz ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat und ermöglicht die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen. Die Zellen wurden parallel in drei T25-Zellkulturflaschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % - 90 % geerntet. Der Kulturüberstand wurde zunächst abgesaugt und die adhärennten Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 2,5 ml TriZol[®]-Reagenz wurden die Zellen lysiert und nach mehrmaligen Auf- und Abpipettieren der Suspension wurde diese auf zwei 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, und jeweils im Vortexer durchmischt. Danach wurden vorsichtig 125 µl Chloroform hinzugefügt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte durch 15-minütige Zentrifugation bei 12000 x g eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig oberhalb der organischen Phase abgenommen und die RNA-Fällung durch 625 µl Isopropanol eingeleitet. Das durch Zugabe von 2 µl Pellet Paint (Novagen, Merck, Darmstadt) nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 12000 x g (15 min, 4°C) sichtbar sedimentierte RNA-Pellet wurde vorsichtig zweimal mit je 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und dann für 5 min getrocknet. Das RNA-Pellet wurde anschließend in einem geeigneten Volumen H₂O_{DEPC} aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.2.1 Photometrische Bestimmung der DNA und RNA

Das Prinzip der photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm, wobei hierfür die konjugierten Ringsysteme der Basen verantwortlich sind. Somit ist es möglich, eine Konzentrationsbestimmung von wässrigen DNA-Lösungen durchzuführen. Hierfür wurde ein Aliquot einer DNA-Probe mit A. dest. verdünnt und die Absorption bei 260 nm, bei 280 nm (Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren) und bei 310 nm (Grundabsorption von Nukleinsäuren) in einer Quarzküvette (Schichtdicke von 1 cm) gemessen. Die Reinheitsbestimmung einer DNA-Präparation kann anhand folgender Formel erfolgen:

$$\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}} = \text{Reinheit}_{\text{(Nukleinsäure)}}$$

Bei einer sauberen DNA-Präparation liegt das Verhältnis bei 1,8 – 2,0. Ein Quotient kleiner als 1,8 lässt auf Verunreinigungen durch Proteine schließen, ein Quotient größer als 2,0 zeigt eine Verunreinigung an. Bezüglich der Konzentration gilt für eine saubere Präparation der folgende Zusammenhang: ein $A_{260 \text{ nm}}$ -Wert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Die Konzentration von DNA-Proben kann anhand der folgenden Formel ermittelt werden:

$$c \text{ (in } \mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{VF} \cdot (A_{260 \text{ nm}} - A_{310 \text{ nm}}) \cdot 0,05$$

c	= Konzentration der DNA
$A_{260 \text{ nm}}$	= Absorption bei 260 nm
$A_{310 \text{ nm}}$	= Absorption bei 310 nm
VF	= Verdünnungsfaktor

Die photometrischen Bestimmungen von RNA-Konzentrationen erfolgten im Nanodrop (ND 100; Delaware, USA). Die einzelsträngigen Ribonukleinsäuren absorbieren die UV-Strahlung im Bereich von 260 nm. Da die Menge der absorbierten UV-Strahlung dem Gehalt der Probe direkt proportional ist und die gemessene OD = 1, bei geeichtem Gerät einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl entspricht, kann die RNA-Konzentration aus dem A_{260} -Wert gemäß der unten aufgeführten Formel ermittelt werden. Aus dem A_{260}/A_{280} Verhältnis kann andererseits ein Rückschluss auf die Reinheit der Probe getroffen werden. Dieses Verhältnis sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,1 liegen, ist jedoch vom pH-Wert und der Ionenstärke abhängig. Ist der Koeffizient kleiner als 1,8 ist die Präparation stark kontaminiert.

Berechnungsformel der RNA-Konzentration:

$$c \text{ [ng}/\mu\text{l}] = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

c	= Konzentration der RNA-Probe
A_{260}	= Absorption bei 260 nm

2.4.3 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

Unter Elektrophorese wird im Allgemeinen die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld verstanden und dieses ist die gebräuchlichste Methode zur Analyse von Nukleinsäuren. Die Auftrennung erfolgt innerhalb eines festen Trägermaterials wie zum Beispiel Agarose. Nukleinsäuren sind innerhalb eines sehr großen pH-Bereiches stets negativ geladen, so dass die Wanderung der Nukleinsäuren in Richtung der Anode verläuft. Des Weiteren besitzen Nukleinsäuren eine gleich bleibende Ladungsdichte, so dass das Verhältnis von Molekulargewicht zu Ladung konstant ist. Die Gelelektrophorese linearer DNA-Fragmente kann zur Größenbestimmung genutzt werden, denn über einen weiten Größenbereich der DNA besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Länge des Fragments und der Wanderungstrecke im Gel. Ein wichtiges Hilfsmittel zur Bestimmung von Molekülgrößen sind so genannte Längenstandards (Marker), die Fragmente mit genau definierten Größen enthalten und parallel zu der zu analysierenden Probe auf das Gel aufgetragen werden. Die Größe unbekannter DNA-Moleküle kann anhand der Laufweiten im Gel abgeschätzt werden oder durch eine Eichgerade rechnerisch ermittelt werden. DNA-Fragmente werden nach einer Gelelektrophorese durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid, ein in die DNA interkalierender organischer Farbstoff, im Gel durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte im Geldokumentations-System GeneGenius 2 der Firma Syngene, UK.

Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten unterschiedlicher Größe wurden 0,7 – 3 % ige Agarosegele (Seakam LE-Agarose; FMC Bioproducts; Rockland, Maine, USA) versetzt mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. An die mit Tris-Borat-Laufpuffer (TBE 1 x) befüllte Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 3 – 10 V/cm (Elektrodenabstand) angelegt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit Gelladepuffer (*6 x Loading Dye Solution*, MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Roth, Deutschland) versetzt und in die Probenaschen des Gels pipettiert. Der Gelladepuffer dient in erster Linie dazu, die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen, so dass diese beim Auftragen in die Taschen absinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert. Des Weiteren ist der Gelladepuffer mit Farbstoffen (z.B. Bromphenolblau und Xylencyanol) versetzt, die während der Elektrophorese mit der DNA in Richtung der Anode wandern und so einen Anhaltspunkt für die Wanderung der DNA im Gel bieten.

Verwendeter Puffer:

TBE-Puffer:

89 mM Borsäure

89 mM Tris-HCl (pH 8.0)

2 mM Na₂EDTA

2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur *in vitro*-Amplifikation eines spezifischen Genfragments aus heterogenen Nukleinsäuregemischen kann die Technik der PCR (*polymerase chain reaction*) effizient eingesetzt werden. Das Prinzip dieser Technik basiert auf der spezifischen Amplifikation eines Abschnitts der DNA, welcher von speziellen Oligonukleotiden eingegrenzt wird. Somit ist die Voraussetzung einer PCR, dass die flankierenden Bereiche der Zielsequenz bekannt sind, so dass entsprechende komplementäre Oligonukleotide (*Primer*) synthetisiert werden können, die mit der *Template*-DNA hybridisieren. Die *in vitro*-Amplifikation mittels PCR wurde in einem *Thermocycler Peltier PTC-200* der Firma Biozym (Oldendorf) durchgeführt. Ein typischer Zyklus einer PCR gliedert sich in der Regel wie folgt:

1. **Initiale Denaturierung** des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges (*Template*-DNA) durch Aufschmelzen für 4 min bei 94°C;
2. **Denaturierung** für 30 s bei 94°C
3. **Hybridisierung** (*Annealing*) der *Primer* an die *Template*-DNA durch Abkühlung des Gemisches auf eine den *Primern* angepasste Temperatur (45 s bei z.B. 50°C).
4. **Synthese der Tochterstränge** (Elongation) mit Hilfe der DNA-Polymerase ausgehend von den 3'-OH-Enden der *Primer* durch den Einbau der dNTPs bei 72°C für z.B. 2 min je nach eingesetzter DNA-Polymerase und erwarteter Fragmentlänge.
5. **Terminale Elongation** für 4 min bei 72°C.
6. **Kühlung** der Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4°C

Die Schritte 2 bis 4 werden in der Regel 35fach wiederholt, so dass die Zielsequenz exponentiell vermehrt wird und das Amplifikat im Idealfall in bis zu 10^9 Kopien vorliegt.

Für einen PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten verwendet:

Zusammensetzung eines 25 µl-PCR-Ansatzes:

<i>Template</i> -DNA (0,1 – 0,5 µg/µl)	1 µl
<i>Primer</i> 1 (1µg/µl)	1 µl
<i>Primer</i> 2 (1µg/µl)	1 µl
dNTP-Mix (2 mM je dNTP)	2,5 µl
Polymerase-Puffer (10 x)	2,5 µl
DNA-Polymerase	0,5 µl
A. dest.	ad 25 µl

2.5 cDNA Mikroarrays

Mit Hilfe von cDNA-Microarrays kann die RNA-Expression bestimmter Gene nachgewiesen werden und ein entsprechendes Expressionsprofil der analysierten Probe dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde der cDNA Array Humane Genome GeneChip U133 Plus 2.0 der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) verwendet. Das Prinzip des Affymetrix GeneChip Expressions-Array besteht darin, exprimierte mRNA durch reverse Transkription in cDNA umzuschreiben und dann in einem weiteren Schritt in Biotin-markierte cRNA umzuformen. Diese wird durch Hybridisierung an passende Oligonukleotid-Sequenzen des GeneChips gebunden und wird dann qualitativ sowie quantitativ ausgewertet. Anhand dieses beschichteten cDNA Arrays kann durch 1,3 Mio. verschiedene Oligonukleotide die Expression von 47.000 Transkripten von 39.500 Genen untersucht werden.

Die Microarray-Technik umfasste komplexe Arbeitsschritte wie Proben-Vorbereitung (RNA-Isolation aus den zu untersuchenden transfizierten Zelllinien) sowie Übersetzung in cDNA, Hybridisierung der Proben mit den Arrays, Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen, Scannen der Arrays und die abschließende Auswertung der generierten Expressionsdaten. Mit Ausnahme der RNA-Isolation wurden alle Arbeitsschritte von Kristin Reeck und Dr. Thomas Streichert (Institut für Klinische Chemie; UKE Hamburg) durchgeführt.

2.6 Statistische Auswertung

Von allen Zellkulturexperimenten wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit unterschiedlich vielen Mess-/Zählergebnissen durchgeführt. Als Ergebnis wurden der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung der gesamten Stichprobe (auf der Grundlage aller Ergebnisse aus allen Experimentreihen) bestimmt. Bei den Vergleichen zwischen zwei Stichproben wurde der zweiseitige Student-T-Test angewendet, wenn beide Stichproben die gleiche Varianz (homoskedastisch) aufwiesen. Die asymptotische Signifikanz wird durch den p-Wert angegeben, wobei ein Wert von $p < 0,05$ einfach und ein Wert von $p < 0,01$ als hoch signifikant gesehen wird. Zur statistischen Berechnung wurde das Programm EXCEL (Microsoft Office 2003) genutzt.

Die Daten der Expressionsanalysen wurden anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Mantel Cox mit den vorhandenen klinischen Daten des Patientinnen-Kollektivs korreliert und auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht.

Überlebenskurven wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Intervall bestimmt. Für die multivariate Analyse wurde der untersuchte Marker auf die Unabhängigkeit in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell auf verschiedene pathologischen Parameter überprüft. Hierfür wurde das Statistik-Programm SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) verwendet.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in drei experimentelle Abschnitte. Zunächst erfolgte eine proteinbiochemische Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors Fra-2 an klinischem Material von humanen Mammakarzinomen. Um den genetischen Einfluss von Fra-2 *in vitro* näher zu charakterisieren, erfolgten parallel dazu Transfektionsexperimente in humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Im dritten Abschnitt wurde die Expression zuvor mittels cDNA Microarrays identifizierter Fra-2 Zielgene wiederum an klinischem Tumormaterial analysiert und für ihre klinische Bedeutung validiert.

3.1 Protein-Expression von Fra-2 am klinischem Material

Das untersuchte Kollektiv bestand aus 75 Mammakarzinom-Patientinnen, die im Zeitraum von 1991 bis 2001 an der Frauenklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf behandelt wurden. Für 56 der behandelten Fälle lagen Follow-up Daten vor, der mittlere Beobachtungszeitraum betrug im Median 66 Monate (6 – 125 Monate).

Von jeder Patientin sind folgende klinische und tumorbiologische Parameter erfasst: T-Stadium, Nodalstatus, Grading, Menopausenstatus, Östrogen-Rezeptor-Expression (ER); Progesteron-Rezeptor-Expression (PR) und Her2/neu-Status.

Für die statistische Auswertung wurde das Statistik-Programm SPSS verwendet. Für die Berechnungen der Kaplan-Meier Überlebenskurven wurden zwei Gruppen definiert. Die erste Gruppe umfasste Patientinnen mit geringer Fra-2 Expression (< Median) in den Tumoren und die zweite Gruppe Patientinnen mit starker Fra-2 Expression (> Median).

Die Gesamt-Überlebenszeit sowie das rezidivfreie Intervall, beginnend vom Zeitpunkt der Operation, wurden unter Anwendung der Kaplan-Meier Methode ermittelt. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank-Mantel-Cox-Test verglichen. Mittels dieser Überlebensanalyse wurde die Fra-2 Protein-Expression in Hinblick auf das rezidivfreie Intervall und des Gesamt-Überlebens über einen Zeitraum von 125 Monaten verglichen. Die Abbildung 3.1 zeigt die Kaplan-Meier Analyse für das rezidivfreie Intervall und für das Gesamt-Überleben.

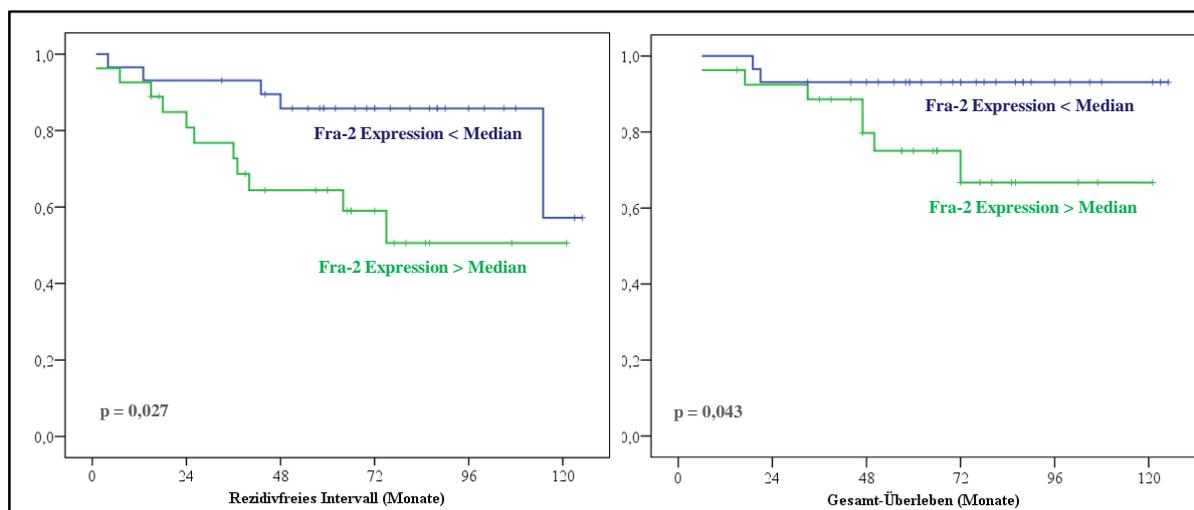


Abbildung 3.1: Kaplan-Meier Überlebensanalyse bei Patientinnen mit Fra-2 exprimierenden Mammakarzinomen in Hinblick auf das rezidivfreie Intervall und das Gesamt-Überleben.

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigten sowohl für das rezidivfreie Intervall ($p = 0,027$) als auch für das Gesamt-Überleben ($p = 0,043$) einen signifikant ungünstigeren Verlauf bei Mammakarzinomen mit starker Fra-2 Expression.

3.2 Funktionelle Analysen zur Rolle von Fra-2 in Mammakarzinom-Zelllinien

In Anbetracht der Ergebnisse der Fra-2 Expression in klinischem Material stellte sich die Frage nach der biologischen Wirkweise von Fra-2 in Mammakarzinom-Zellen. Zu diesem Zweck erfolgten experimentelle Untersuchungen zur Rolle von Fra-2, wobei im Vergleich dazu im geringeren Umfang Untersuchungen zu Fra-1 durchgeführt wurden.

3.2.1 Auswahl der Zelllinien

Um den Einfluss von Fra-2 auf das Verhalten von Zellen *in vitro* zu analysieren, wurden zwei verschiedene humane Mammakarzinom-Zelllinien als Modellsysteme herangezogen. Zum einen wurde die schwach invasive, ER- und PR-positive Zelllinie MCF-7, die ein epitheliales Wachstum zeigt, und zum anderen die mesenchymal, stark invasiv wachsende Zelllinie MDA MB231, die ER- und PR-negativ ist, ausgewählt (Abb. 3.2 A-B). Diese Zelllinien wurden aufgrund ihrer Unterschiede im Hormonrezeptorstatus sowie des Gehaltes an AP-1 Proteinen

ausgesucht. Während Fra-2 in beiden Zelllinien nachweisbar ist, ist der Transkriptionsfaktor Fra-1 in MCF-7 Zellen sehr schwach exprimiert, wohingegen die Expression von Fra-1 in MDA MB231 sehr stark ist (PHILIPS ET AL., 1998).

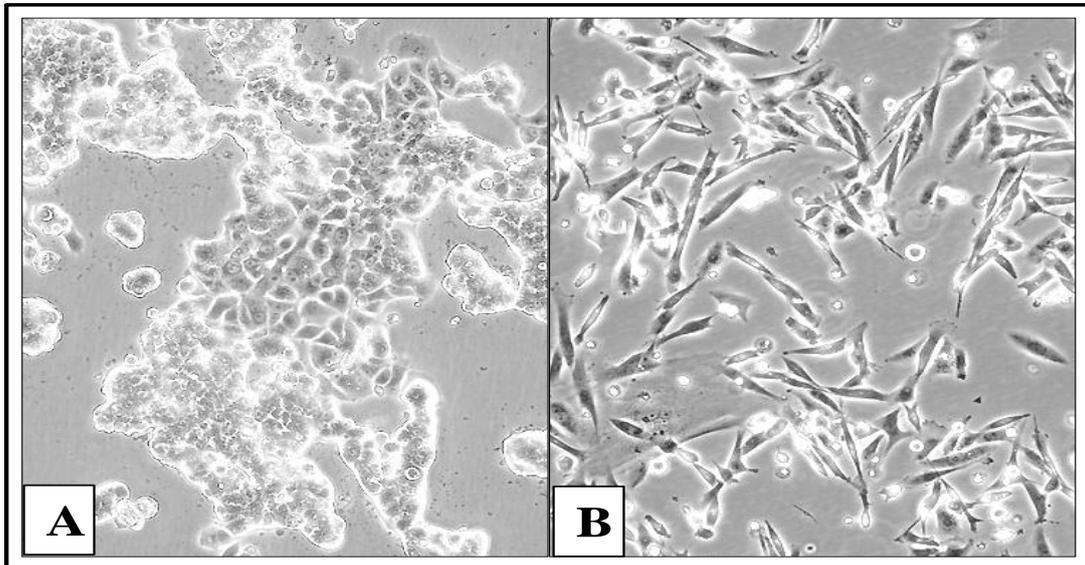


Abbildung 3.2 A und B: Morphologie der verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien.
A: epithelial wachsende MCF-7 Zelllinie; B: mesenchymal wachsende Zelllinie MDA MB231
(40 x vergrößert; entnommen aus ATTC[®]: www.lgcstandards-atcc.org).

3.2.2 Herstellung von stabilen, induzierbaren Mammakarzinom-Zelllinien mit Fra-2-Überexpression

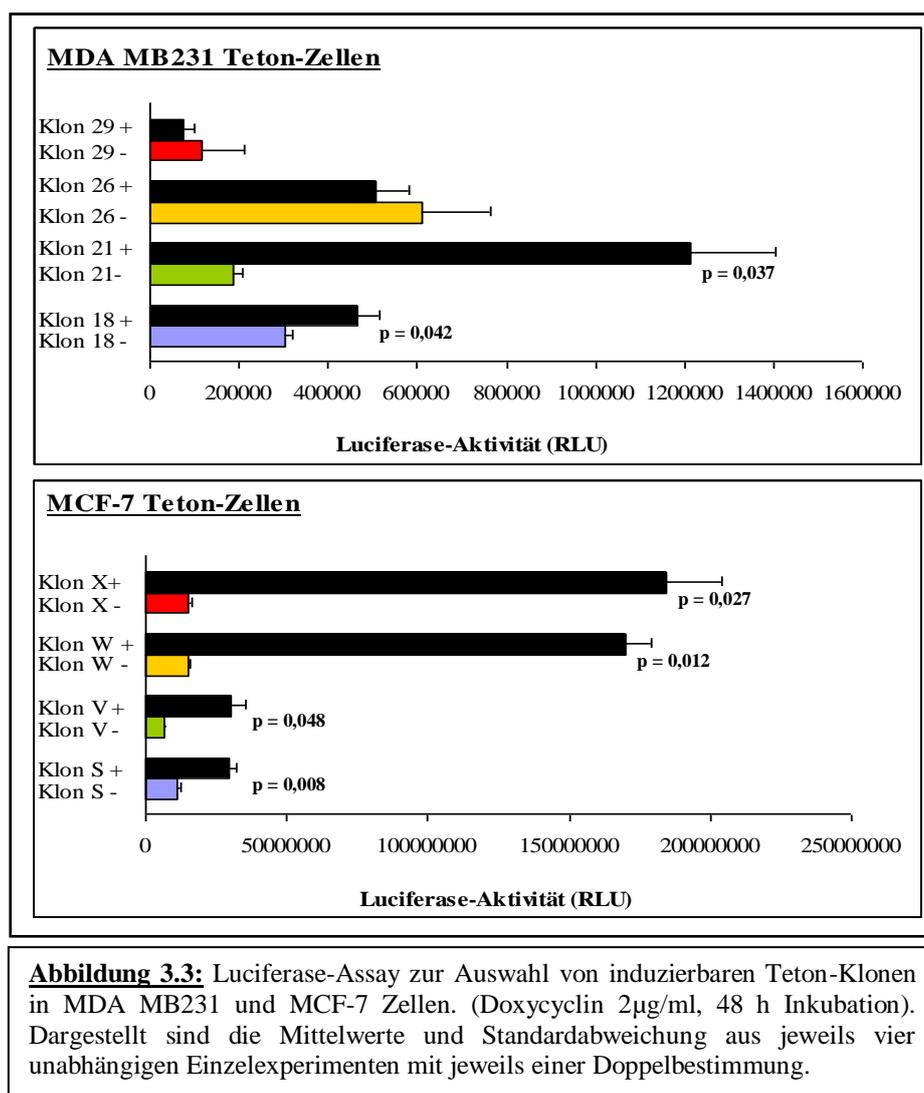
3.2.2.1 Transfektion mit pTRE- Teton-Expressionsvektoren

Um die Expression des Fra-2 Gens kontrollieren zu können, wurde das von GOSSEN & BUJARD (1992) entwickelte Tetracyclin-regulierte System Tet-ON verwendet, anhand dessen die Expression des Gens durch einen Induktor (Doxycyclin) angeschaltet wird.

Für ein funktionierendes Tet-ON-System (Abb. 2.2 in 2.2.3) wurden zwei stabile Transfektionen in den Zelllinien benötigt. Mit Hilfe der MaTRA[®] (siehe 2.2.2.1.2) Transfektion wurde zunächst das Plasmid Teton (Regulatorplasmid), welches den Tetracyclin-Repressor (rtetR) und den Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (rtetR) unter der Kontrolle des CMV-Promotors (P_{CMV}) sowie das Neomycin-Resistenz-Gen beinhaltet, in die Ursprungszelllinie MCF-7 eingebracht. Analog dazu erfolgte mit Hilfe der Lipofektamin-Transfektion (siehe 2.2.2.1.1) die Einbringung des Teton-Plasmids in die MDA MB231 Ursprungszelllinie. Die optimale Konzentration des Neomycin-Analogons Geneticin (G418)

ERGEBNISSE

zur Selektion potentieller Transfektanten wurde zuvor in einer Testreihe verschiedener Konzentrationen bestimmt. Zur Selektion wurde Geneticin in einer Konzentration von 400 µg/ml eingesetzt. Nach erfolgreicher Etablierung Geneticin-resistenter Klone wurden diese auf die Integration und Induzierbarkeit des Tetracyclin-Transaktivators überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Teton-Klone (MCF-7 Teton und MDA MB231 Teton) transient mit dem Vektor pTRE2pur-Luc transfiziert. In diesem Vektor (Responseplasmid, siehe Abb. 2.2 in 2.2.3) befindet sich unter Kontrolle des CMV-Minimalpromotors (P_{minCMV}) das Luciferase-Gen (luc) als Reporter im Anschluss an die Tetracyclin-responsive Domäne (TRE). Nur nach erfolgreicher Integration des Teton-Plasmids kann nach Zugabe von Doxycyclin (2 µg/ml) die Transkription des Reportergens (luc) stattfinden. Mittels eines Biolumineszenz-Gerätes wurde die Luciferase-Aktivität quantitativ gemessen (Abb. 3.3) und pro Zelllinie (MCF-7 und MDA MB231) ein „Masterklon“ mit der effektivsten Doxycyclin-Induktion für die zweite Transfektion ausgewählt.



Von den transfizierten MDA MB231-Zellen wurde als „Masterklon“ Klon 21 ausgewählt, da er nach Zugabe von Doxycyclin eine signifikante Steigerung der Luciferase-Aktivität um das 6,4-fache zeigte. Bei den MCF-7-Zellen wurde der Klon X ausgewählt, dessen Luciferase-Aktivität nach Doxycyclin-Zugabe um das 12-fache anstieg (Abb. 3.3).

Für die anschließende zweite Transfektion wurden zwei Konstrukte generiert. Zum einen wurde in den Vektor pTRE2pur, der den CMV-Minimalpromotor mit den Tetracyclin-responsiven Elementen (TRE) enthält, die komplette cDNA des Transkriptionsfaktors Fra-2 und zum anderen wurde ebenfalls in den Vektor pTRE2pur die cDNA des Transkriptionsfaktors Fra-1 eingebracht. Für alle anschließenden Versuche wurde der leere pTRE2pur-Vektor mit dem Puromycin-Resistenzgen als Negativkontrolle (Kontrollzellen) verwendet und wurde zur Vereinfachung als pTRE bezeichnet. Die Masterklone MDA MB231 Teton (Klon 21) sowie MCF-7 Teton (Klon X) wurden mit den generierten Vektoren pTRE (Negativkontrolle) sowie pTRE-Fra-2 bzw. pTRE-Fra-1 transfiziert. Nach 3 bis 4-wöchiger Selektion mit 0,5 mg/ml Puromycin wurden mehrere resistente Fra-2 bzw. Fra-1 Klone isoliert. Anschließend wurden diese stabilen Klone mit verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen auf ihre Induzierbarkeit überprüft (Daten nicht gezeigt). Hierfür wurden die Zellen für 48 h mit 2 µg/ml Doxycyclin (Dox) inkubiert und anschließend in einem detergenshaltigem Puffer solubilisiert. Die Proteine wurden mittels SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und Fra-2 bzw. Fra-1 nach Western Blot mit dem polyklonalen Antikörper detektiert. Zur Auswahl kamen die Klone mit der höchsten Induzierbarkeit und der geringsten Basisexpression („leakiness“) von Fra-2 bzw. Fra-1.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse für die ausgewählten Zellklone von MDA MB231-Teton Fra-2 (Abb.3.4) und MCF-7-Teton Fra-2 (Abb.3.5) dargestellt. Um eine gleichwertige Proteinkonzentration in jeder Western Blot-Tasche zu gewährleisten und zur Normalisierung der Expressionswerte, wurde jede Membran zusätzlich auf Actin detektiert. Actin ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorkommendes ca. 46 kDa schweres Strukturprotein des Cytoskeletts und wird als so genanntes „*housekeeping gene*“ geführt. Die Expression der jeweils nicht induzierten Zellen wurde nach densitometrischer Auswertung des Western Blots als 100 % gesetzt. Die densitometrische Auswertung der Fra-2 Expression nach Dox-Induktion ergab für die Negativkontrolle MDA-Teton pTRE+ eine geringfügige Steigerung von 13 % gegenüber der nicht induzierten Negativkontrolle MDA-Teton pTRE-. Für die zwei MDA-Teton Fra-2-Klone (7 und 15) wurde eine Expressionssteigerung von Fra-2 durch die Zugabe von Doxycyclin um 80 % (Klon 7+ zu Klon 7-) und 64 % (Klon 15+ zu Klon 15-) erzielt.

ERGEBNISSE

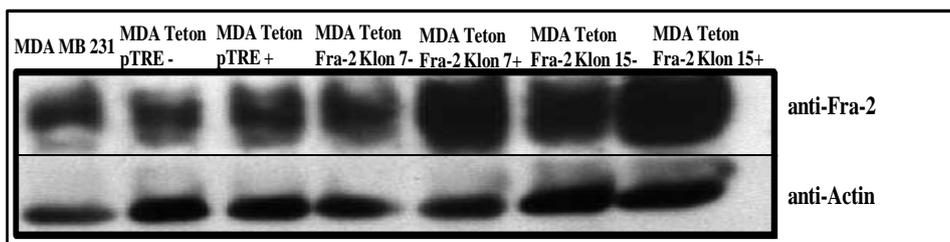


Abbildung 3.4.: Western Blot-Analyse der MDA MB231-Tetron Fra-2 Zellen nach Induktion mit Doxycyclin.

Spur 1: MDA MB231 (Ursprungszelllinie); **Spur 2 und 3:** MDA-Tetron pTRE (Negativkontrolle; - ohne Dox., + mit Dox.); **Spur 4 bis 7:** MDA-Tetron Fra-2 Klone 7 und 15 (- ohne Dox., + mit Dox.). Es wurden jeweils 20 µg Protein aus den Zelllysaten aufgetragen. Konzentrationskontrolle: Actin.

Die densitometrische Auswertung der MCF-7-Tetron Klone zeigte ebenfalls eine Expressionssteigerung von Fra-2. So wurde nach Induktion mit Doxycyclin die Expression von Fra-2 bei dem MCF-7-Tetron Fra-2 Klon 2+ um 179 % erhöht und bei dem MCF-7-Tetron Fra-2 Klon 4+ um 78 % im Vergleich zum jeweiligen nicht induzierten Klon (2- bzw. 4-).

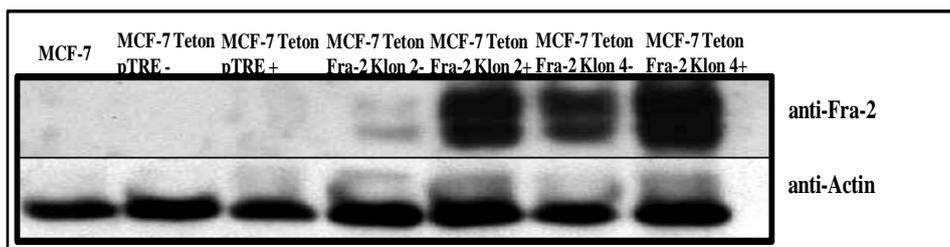


Abbildung 3.5: Western Blot-Analyse der MCF-7-Tetron Fra-2 Zellen nach Induktion mit Doxycyclin.

Spur 1: MCF-7 (Ursprungszelllinie); **Spur 2 und 3:** MCF-7-Tetron pTRE (Negativkontrolle; - ohne Dox., + mit Dox.); **Spur 4 bis 7:** MCF-7-Tetron Fra-2 Klone 2 und 4 (- ohne Dox., + mit Dox.). Es wurden jeweils 20 µg Protein aus den Zelllysaten aufgetragen. Konzentrationskontrolle: Actin.

Für alle weiteren anschließenden Experimente wurden diese ausgewählten Klone verwendet. Wie schon erwähnt, wurde parallel zu den Transfektionen mit Fra-2 auch der Transkriptionsfaktor Fra-1 in die jeweiligen MCF-7- und MDA MB231-Tetron Zelllinien transfiziert. Während zunächst ein Transfektionserfolg beobachtet werden konnte und von jeweils 11 (bei MCF-7-Tetron) bzw. 17 (bei MDA MB231-Tetron) Transfektanten potentielle mit Doxycyclin induzierbare Klone selektioniert werden konnten, stellte sich nach einiger Zeit heraus, dass sich die einzelnen Klone nicht mehr effektiv mit Doxycyclin induzieren ließen. Auch ein erneuter Transfektionsversuch mit beiden Zelllinien bestätigte dieses Ergebnis.

Um die als Negativkontrolle in jedem Versuch mitgeführten Klone pTRE auf die Integration der Vektorkassette zu überprüfen, wurde die genomische DNA aus diesen Zellklonen isoliert und mittels PCR mit pTRE-spezifischen Primern (siehe 2.1.1.2) analysiert. Dabei wurde die Präsenz der pTRE-Kassette durch Darstellung des 270 bp großen PCR-Produkts bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2 Transfektion mit pIRES-Expressionsvektoren

3.2.2.2.1 MDA-MB231 mit pIRES Vektoren für Fra-2 und Fra-1

Neben den Teton-Zelllinien mit induzierbarer Fra-2 Expression wurden auch Zellklone mit stabiler, konstitutiver Fra-2 oder Fra-1-Überexpression generiert.

Für die Transfektion mit dem bicistronischen pIRES-P Expressionsplasmid wurden Expressionsvektoren konstruiert, welche die vollständige codierende Sequenz von Fra-2 oder Fra-1 zusammen mit einem C-terminalen FLAG-Epitop enthalten (Vorarbeiten von Frau Dr. Milde-Langosch). Mit Hilfe der Lipofektamin-Methode (siehe 2.2.2.1.1) wurde der generierte Vektor Fra-2-pIRES-P bzw. Fra-1-pIRES-P in die MDA MB231 Zellen eingebracht. Eine anschließende Selektion mit dem Antibiotikum Puromycin (1 µg/ml) erbrachte 12 Puromycin-resistente Transfektanten für Fra-2 und 8 für Fra-1.

Nach Protein-Isolierung und Western Blot-Analyse wurden jeweils zwei Klone (Klon 2 und Klon 8 bei Fra-2 und Klon 1 und 2 bei Fra-1) ausgewählt, die eine im Vergleich zur Negativkontrolle pIRES (Vektor pIRES-P ohne Insertion von Fra-2 oder Fra-1) gesteigerte Expression von Fra-2 bzw. Fra-1 zeigten (siehe Abbildung 3.6 und 3.7)

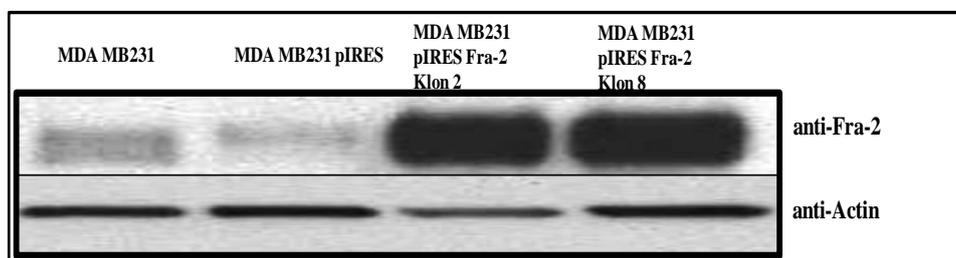


Abbildung 3.6: Western Blot-Analyse der MDA MB231-pIRES Fra-2 Zellen. **Spur 1:** MDA MB231 (Ursprungszelllinie); **Spur 2:** MDA MB231-pIRES (Negativkontrolle); **Spur 3:** MDA MB231-pIRES Fra-2 Klon 2; **Spur 4:** MDA MB231-pIRES Fra-2 Klon 8. Es wurden jeweils 20 µg Protein aus den Zelllysaten aufgetragen. Konzentrationskontrolle: Actin.

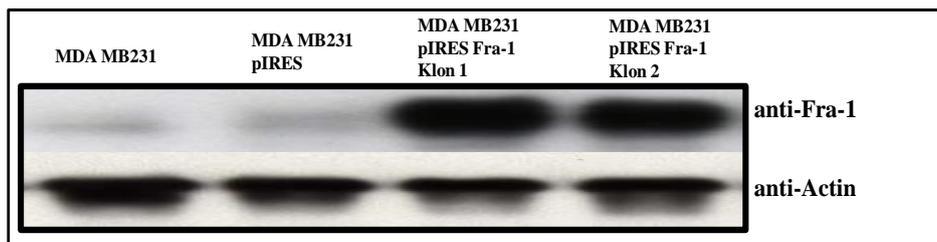


Abbildung 3.7: Western Blot-Analyse der MDA MB231-pIRES Fra-1 Zellen. **Spur 1:** MDA MB231 (Ursprungszelllinie); **Spur 2:** MDA MB231-pIRES (Negativkontrolle); **Spur 3:** MDA MB231-pIRES Fra-1 Klon 1; **Spur 4:** MDA MB231-pIRES Fra-1 Klon 2. Es wurden jeweils 20 µg Protein aus den Zelllysaten aufgetragen. Konzentrationskontrolle: Actin.

3.2.2.2.2 MCF-7 mit pIRES Vektoren Fra-1

Analog zur Transfektion der MDA MB231 Zellen erfolgte die Transfektion der MCF-7 Zellen mit Fra-1-pIRES-P mittels der MaTra-Methode (2.2.2.1.2). Durch anschließende Selektion mit Puromycin (1 µg/ml) konnten insgesamt 9 Klone generiert werden. Nach einer abschließenden Western Blot-Analyse wurden die Klone 4 und 8 für die weitere Verwendung ausgewählt (Abb. 3.8).

In einer vorangegangenen Arbeit von Frau Stanislava Janke wurden MCF-7 Zellen stabil mit Fra-2 transfiziert (MILDE-LANGOSCH ET AL, 2008). Diese transfizierten Zellen wurden für diese Arbeit für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

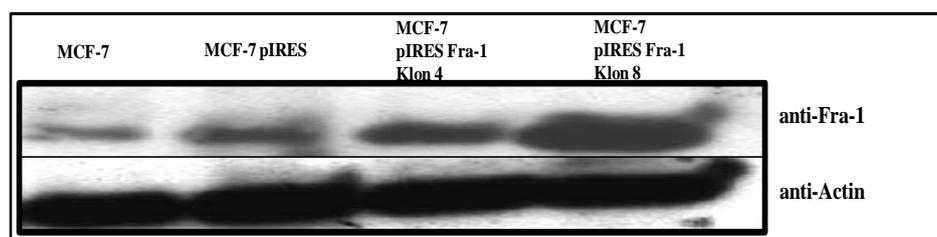


Abbildung 3.8: Western Blot-Analyse der MCF-7-pIRES Fra-1 Zellen. **Spur 1:** MCF-7 (Ursprungszelllinie); **Spur 2:** MCF-7-pIRES (Negativkontrolle); **Spur 3:** MCF-7-pIRES Fra-1 Klon 4; **Spur 4:** MCF-7-pIRES Fra-1 Klon 8. Es wurden jeweils 20 µg Protein aus den Zelllysaten aufgetragen. Konzentrationskontrolle: Actin.

3.2.3 Untersuchungen zur Bindungsaktivität an die AP-1 Consensussequenz

Zur Untersuchung der Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren Fra-2 und Fra-1 wurde das TransAM System der Firma Active Motif verwendet (2.3.6). Basierend auf einer 96-well Platte, die mit einer Oligonukleotidsonde beschichtet ist, die eine AP-1 Consensus-Sequenz enthält, konnten Rückschlüsse auf die Bindungsaktivität von Fra-2 und Fra-1 in den transfizierten Zellen gezogen werden. Für diesen Versuchsansatz wurden zunächst die Kernextrakte aus allen zu untersuchenden Zellklonen isoliert (2.3.6.1) und die Proteinmengen mit Hilfe des Quant-Kits (2.3.1) quantifiziert. Insgesamt wurden pro Versuchsansatz 5 µg Nuklear-Extrakt eingesetzt. Nach Inkubation der Extrakte auf der Oligonukleotidschicht erfolgte ein kolorimetrischer Nachweis der an die TRE-Consensus-Sequenz TRE gebundenen Fra-Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Die Abbildung 3.9 verdeutlicht, dass hinsichtlich von Fra-2 in den MDA MB231 Klonen als auch in den MCF-7 Klonen eine Bindung an die AP1-Consensussequenz stattfindet. Im Falle der mit dem Expressionsvektor pIRES-Fra-2 bzw. Fra-1 transfizierten MDA MB231 Zellen konnte eine signifikante Steigerung der Fra-2-Bindungsaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden, so zeigten die Fra-2 Klone eine 1,7-fache (Klon 2; $p = 0,03$) bzw. eine 1,6-fache Zunahme (Klon 8; $p = 0,04$) (Abb. 3.9 A).

Dieses konnte auch bei den MCF-7- pIRES Fra-2 Klonen beobachtet werden. Eine Erhöhung der Fra-2 Bindung war sowohl bei denen als „pool“ bezeichneten und nicht als Einzelzellselektionierten Fra-2 Zellen (1,4-fach; $p = 0,05$) sowie bei dem selektionierten Einzelklon T6 (1,38-fach; $p = 0,01$) zu sehen (Abb. 3.9 B).

Eine Steigerung war auch bei den MCF-7-Teton Fra-2 Zellen zu verzeichnen, nach Doxycyclin-Zugabe erhöhte sich die Fra-2 Bindung im Klon 2 um das 1,4 -fache und bei dem Klon 4 um das 1,1-fache, aber aufgrund der Standardabweichungen ist das Ergebnis nicht signifikant (Abb. 3.9 C). Gegenläufig verhielten sich die MDA MB231-Teton Fra-2 Zellen, in diesem Versuchsansatz war eher eine Abnahme der Fra-2 Bindungsaktivität nach Zugabe von Doxycyclin zu beobachten (Abb. 3.9 D).

Die Ergebnisse der MDA MB231-Teton-Zellen zeigten in Bezug auf die Induktion, Invasivität und Bindungsaktivität sehr große Schwankungen und aufgrund der erhöhten Fra-2 Expression auch bei den induzierten Kontrollzellen wurden die weiteren Untersuchungen ohne diese Zelllinien fortgeführt.

ERGEBNISSE

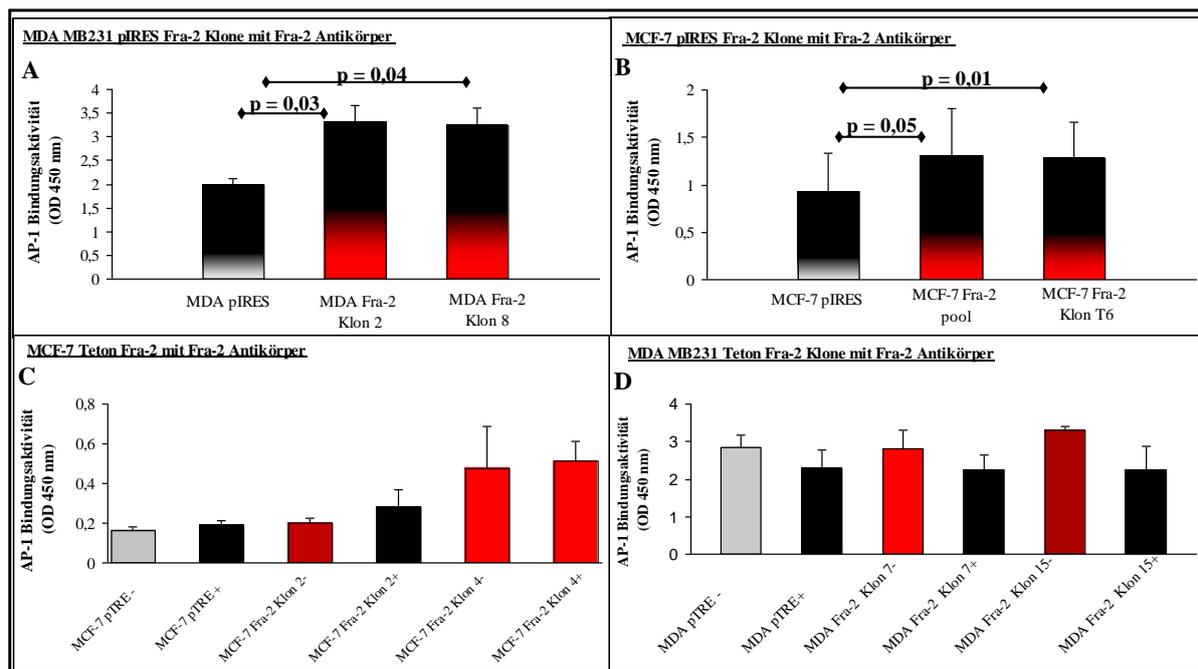


Abbildung 3.9 A-D: DNA-Bindungsaktivität an die AP-1 Consensus-Sequenz.

A: MDA MB231-pIRES Fra-2 Klone mit Fra-2 Antikörper; **B:** MCF-7-pIRES Fra-2 Klone mit Fra-2 Antikörper; **C:** MCF-7-Tetron Fra-2 Klone mit Fra-2 Antikörper; **D:** MDA MB231 Tetron-Fra-2 Klone mit Fra-2 Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelerperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Die Bindungsstudien der MDA MB231-pIRES Fra-1 Zellen ergaben keine signifikanten Unterschiede. Aus der Abbildung 3.10 A geht hervor, dass in den MDA MB231-pIRES Fra-1 Klonen im Vergleich zur Negativkontrolle die Fra-1 Bindungsaktivität nahezu unverändert blieb. Während bei den MCF-7-pIRES Fra-1 Zellen im Falle des Klon 8 die Bindung von Fra-1 signifikant um das 1,8-fache im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht wurde, betrug die Steigerung bei Klon 4 das 1,4-fache, war aber nicht signifikant (Abb. 3.10 B).

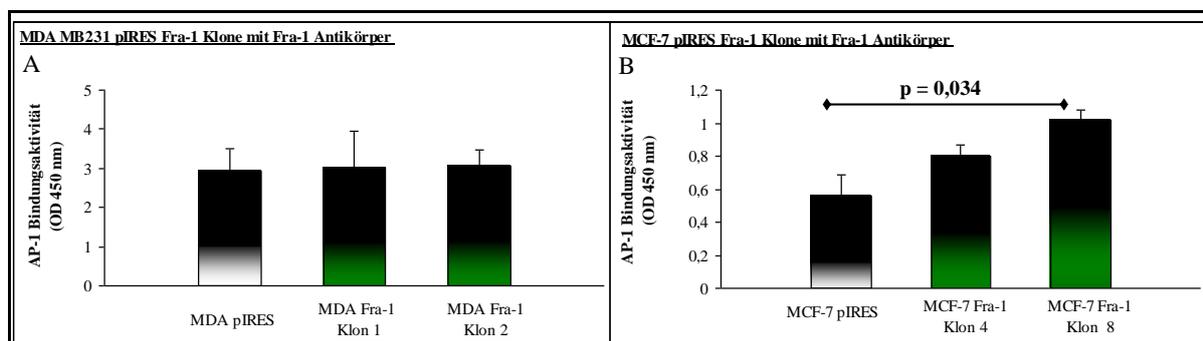


Abbildung 3.10 A-B: DNA-Bindungsaktivität an die AP-1 Consensus-Sequenz.

A: MDA MB231-pIRES Fra-1 Klone mit Fra-1 Antikörper; **B:** MCF-7-pIRES Fra-1 Klone mit Fra-1 Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelerperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

ERGEBNISSE

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die mit pIRES transfizierten Zellen auf die Bindung weiterer AP-1 Untereinheiten kontrolliert. So wurden die MDA MB231-pIRES Fra-2 Klone auch auf die Fra-1 und cFos vermittelte Bindungsaktivität überprüft (Abb.3.11 A und B). Die Bindung von cFos war sehr niedrig im Vergleich zur mitgeführten Positivkontrolle für cFos (Abb. 3.11 A). Hinsichtlich der Fra-1-Expression konnte eine Verminderung in den Fra-2 Klonen im Vergleich zur Kontrolle (pIRES) beobachtet werden (Klon 2 = 1,35-fach und Klon 8 = 1,31-fach) (Abb. 3.11 B).

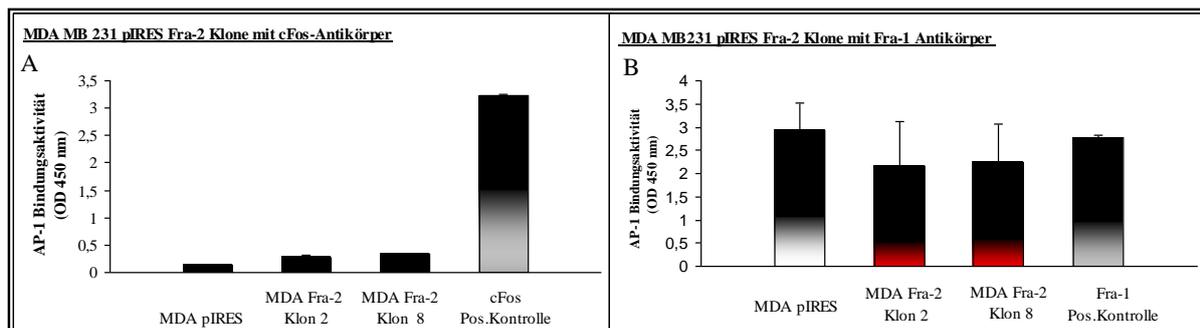


Abbildung 3.11 A-B: DNA-Bindungsaktivität an die AP-1 Consensus-Sequenz.

A: MDA MB231-pIRES Fra-2 Klone mit cFos Antikörper; **B:** MDA MB231 pIRES-Fra-2 Klone mit Fra-1 Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelerperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte auch der Ansatz mit den MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen. Die Bindung von cFos war signifikant niedriger als bei der cFos-Positivkontrolle und blieb in den Klonen mit Fra-2 Überexpression im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abb. 3.12 A), während bei Fra-1 die Bindung deutlich im Vergleich zur Kontrolle (pIRES) vermindert wurde (Klon Fra-2 pool um das 2,9-fache und Klon T6 um das 3,8-fache) (Abb. 3.12 B). Aufgrund der hohen Standardabweichungen sind die Ergebnisse aber nicht statistisch signifikant.

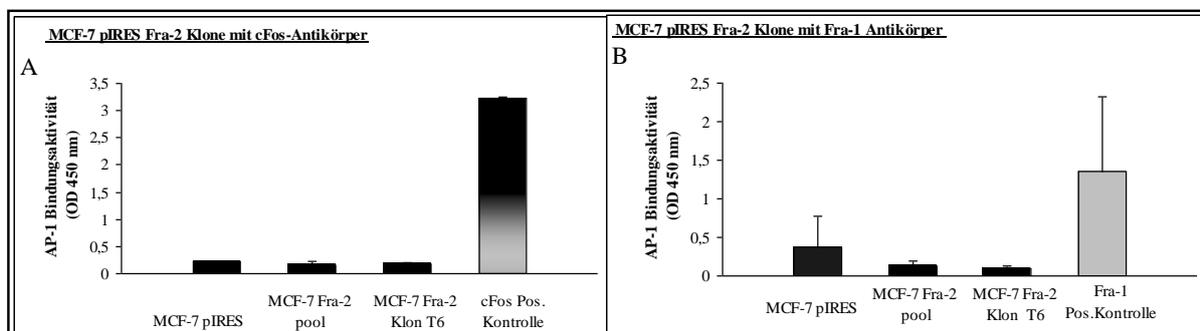


Abbildung 3.12 A-B: DNA-Bindungsaktivität an die AP-1 Consensus-Sequenz.

A: MCF-7-pIRES Fra-2 Klone mit cFos Antikörper; **B:** MCF-7-pIRES Fra-2 Klone mit Fra-1 Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelerperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

ERGEBNISSE

Ein übereinstimmendes Ergebnis wiesen auch die MDA MB231- und MCF-7-pIRES Fra-1 Klone bezüglich der cFos vermittelten AP-1-Bindungsaktivität auf (Abb. 3.13 A und C). Bezogen auf die cFos-Positivkontrolle war bei allen Klonen die Bindung sehr niedrig. Im Vergleich dazu war das Ergebnis für MDA MB231- und MCF-7-pIRES Fra-1 Klone mit Fra-2 nicht so eindeutig (Abb. 3.13 B und D). Verglichen mit der Fra-2 Positivkontrolle und der jeweiligen Negativkontrolle (pIRES) zeigten sowohl die MDA MB231- als auch die MCF-7-pIRES Fra-1 transfizierten Klone eine tendenziell höhere AP-1 Bindungsaktivität.

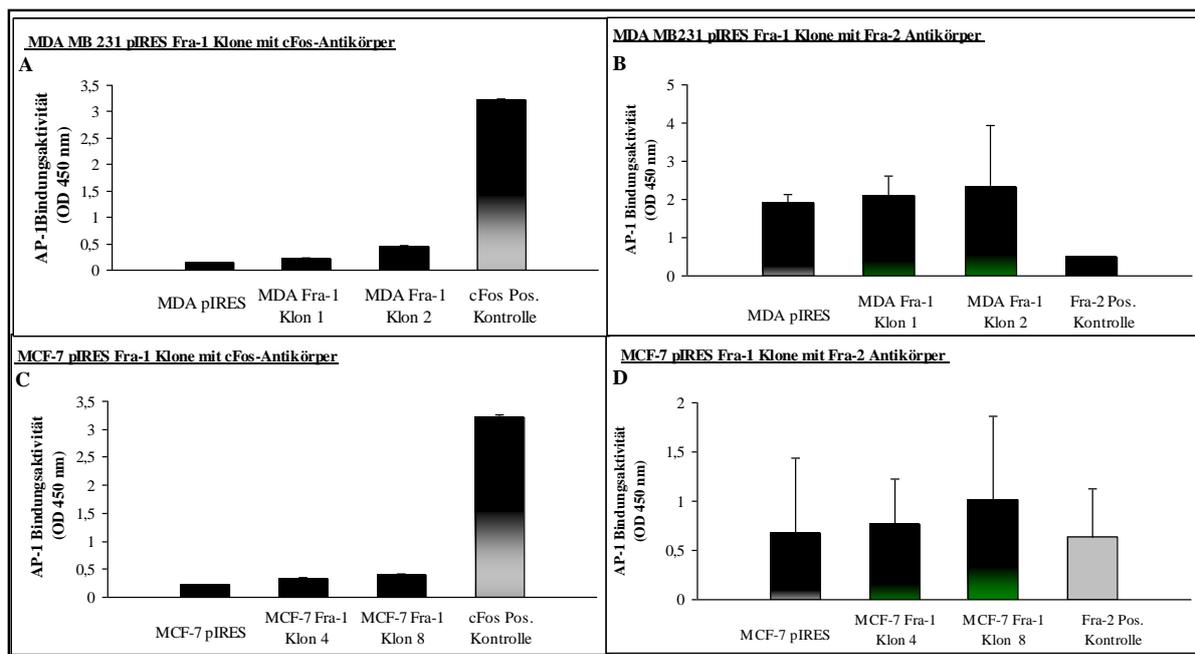


Abbildung 3.13 A-D: DNA-Bindungsaktivität an die AP-1 Consensus-Sequenz.

A: MDA MB231-pIRES Fra-1 Klone mit cFos Antikörper; **B:** MDA MB231-pIRES Fra-1 Klone mit Fra-2 Antikörper; **C:** MCF-7 pIRES-Fra-1 Klone mit cFos Antikörper; **D:** MCF-7-pIRES Fra-1 Klone mit Fra-2 Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelerperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

3.2.4 Untersuchungen der Proliferation

Nach erfolgreicher Etablierung induzierbarer Fra-2 Teton-Zelllinien sowohl in MDA MB231 als auch in MCF-7 Zellen und analog dazu MDA MB231- bzw. MCF-7-pIRES Zellen mit konstitutiver Fra-2- bzw. Fra-1-Überexpression, wurde der Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren auf die Proliferationsfähigkeit der verwendeten Mammakarzinom-Zellen getestet. Zu diesem Zweck wurden MTT-Proliferationsassays (siehe 2.2.4) durchgeführt. Hintergrund dieses Assays ist, dass metabolisch aktive Zellen das hinzugefügte Tetrazolium-Salz in den Farbstoff Formazan umsetzen, welches dann bei einer Wellenlänge

ERGEBNISSE

von 540 nm in einem Elisa-Reader quantifiziert werden kann. An der Quantität der Umsetzung in Formazan lassen sich Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der getesteten Zellen ziehen. Zur Veranschaulichung sind in der Abbildung 3.14 die durchgeführten Experimente zum Proliferationsverhalten der verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien unter verstärktem Fra-2 bzw. Fra-1 Einfluss dargestellt.

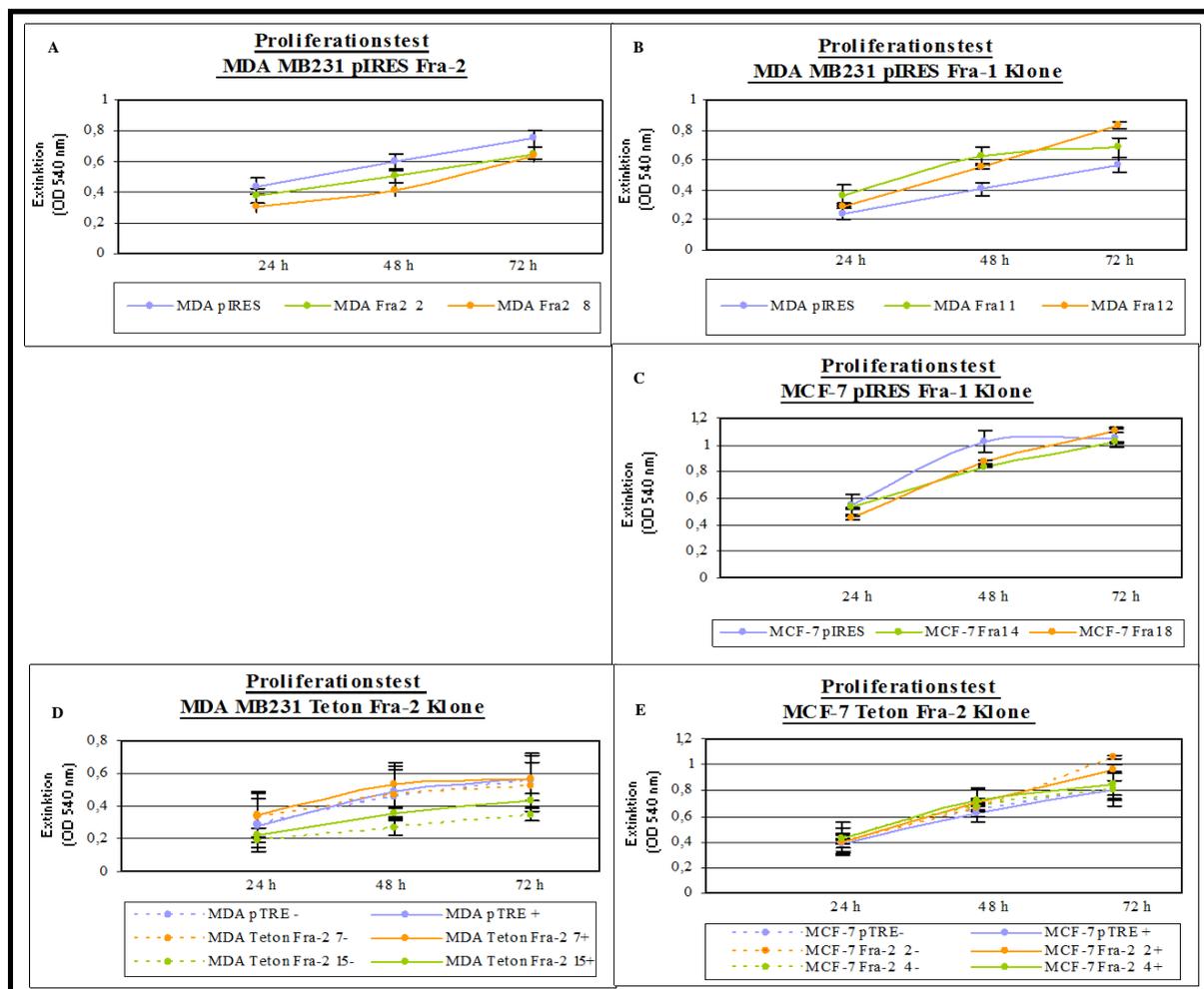


Abbildung 3.14 A-E: Effekt von Fra-2 bzw. Fra-1 auf das Proliferationsverhalten in Mammakarzinom-Zellen.

A: MDA MB231-pIRES Fra-2 Klone; **B:** MDA MB213-pIRES Fra-1 Klone; **C:** MCF-7-pIRES Fra-1 Klone; **D:** MDA-Teton Fra-2 Klone; **E:** MCF-7-Teton Fra-2 Klone.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils vier unabhängigen Einzelerperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Insgesamt ist zu sagen, dass sowohl die Fra-2 als auch die Fra-1 überexprimierenden Zellklone der MDA MB231 Zellen keine wesentliche Proliferationsänderung im Vergleich zu der Negativkontrolle zeigen. Die Proliferationsrate bei den MCF-7 pIRES Fra-1 Klonen änderte sich ebenfalls nicht. Das gleiche Ergebnis zeigte sich für die durch das TetON[®]System induzierbaren Fra-2 Klone in MDA MB231 und MCF-7 Zellen. In diesem Versuchsansatz wurden die ausgesäten Zellen 24 h vor der ersten MTT-Zugabe mit 2 µg/ml

Doxycyclin induziert, um das Proliferationsverhalten der Klone in Abhängigkeit der Expressionssteigerung zu analysieren. Auch hier ist nach vier unabhängigen Experimenten insgesamt festzuhalten, dass weder der Transkriptionsfaktor Fra-2 noch Fra-1 einen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Mammakarzinom-Zellen haben.

3.2.5 Invasivität und Motilität

Die vorangegangene Western Blot-Analyse am klinischen Tumormaterial auf Fra-2 zeigte, dass die verstärkte Expression dieses Transkriptionsfaktors mit der Progression von Mammatumoren einhergeht (Abb. 3.1). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob Fra-2 direkt einen Einfluss auf die Invasion und Migration von Mammakarzinom-Zellen ausübt. Für diesen Invasionsassay wurden zunächst die induzierbaren Teton-Fra-2 Zellen herangezogen. Die Zellen wurden mit Hilfe des Matrigel-Invasions-Assays (siehe 2.2.5) analysiert.

Es erfolgte eine Aussaat von 50.000 Zellen der MDA MB231-Teton Fra-2 Zellen sowie 100.000 der MCF-7-Teton Fra-2 Zellen in den oberen Teil des Matrigel-Inserts. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 2 µg/ml Doxycyclin für 48 h inkubiert, parallel dazu wurden die Zellen im nicht-induzierten Zustand (ohne Doxycyclin) als Kontrolle mitgeführt. Die Zellzahl bei der Aussaat der Zelllinien wurde bei den MCF-7 Zellen höher gewählt, da sie, wie schon eingangs erwähnt, eher schwach invasiv wachsen. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden die Membranen der Inserts entnommen, die invasiv durch das Matrigel gewachsenen Zellen fixiert, mit Hämalaun/Eosin gefärbt und unter einem Mikroskop ausgezählt (siehe 2.2.5). In der Abbildung 3.15 ist die Zahl der Zellen, die durch das Matrigel durchgewandert sind, dargestellt.

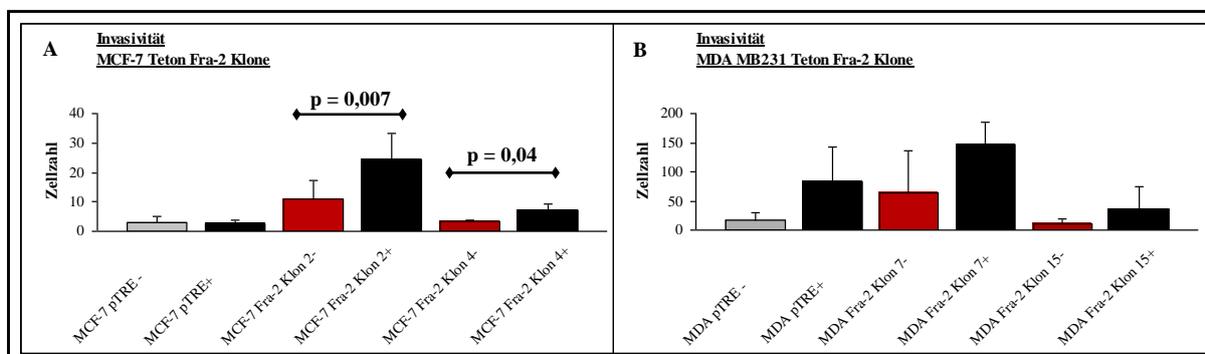


Abbildung 3.15 A-B: Darstellung der Invasivität der Teton-Zelllinien. **A:** MCF-7-Teton Fra-2 Klone; **B:** MDA MB231-Teton Fra-2 Klone. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils vier unabhängigen Einzelexperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

ERGEBNISSE

Eine eindeutige und signifikante Steigerung der Zahl invasiver Zellen konnte nur bei MCF-7 Teton Fra-2 festgestellt werden. Es erhöhte sich die Zahl der Zellen im Vergleich des induzierten zum nicht-induzierten Fra-2 Klons um das 2,2 fache (Klon 2-/2+; $p = 0,007$) bzw. 2,3 fache (Klon 4-/4+; $p = 0,04$), und im Vergleich zur induzierten Kontrolle pTRE+ um das 9,3 fache (Klon 2+) bzw. um das 2,7 fache (Klon 4+) (Abb. 3.15 A). Auch hinsichtlich der MDA MB231-Teton Fra-2 Zellen konnte ein Unterschied des invasiven Verhaltens der Zellen beobachtet werden, jedoch waren die Daten nicht statistisch signifikant. Auch zeigte die Negativkontrolle pTRE nach Zugabe von Doxycyclin eine Erhöhung der Zellzahl um das 5 fache. In den beiden Fra-2 Klonen erhöhte sich die Zahl invasiver Zellen nach 48 h Doxycyclin-Inkubation um das 2,3 fache (Klon 7-/+) und um das 3,5 fache (Klon 15-/+) (Abb. 3.15 B).

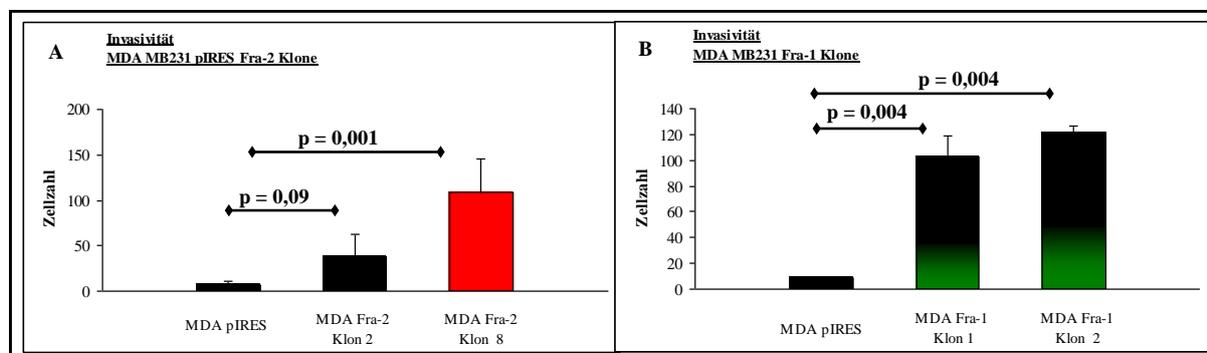


Abbildung 3.16 A-B: Darstellung der Invasivität der MDA MB231-pIRES-Zelllinien.

A: MDA MB231-pIRES Fra-2 Klone; **B:** MDA MB231-pIRES Fra-1 Klone. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils vier unabhängigen Einzelerperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Die Ergebnisse des Invasionsassays bei den mit den Expressionsvektoren pIRES-Fra-2 bzw. pIRES-Fra-1transfizierten Zellen unterschieden sich deutlicher. Die MDA MB231-pIRES Fra-2 Zellen zeigten eine 5,8 fache Steigerung (Klon 2; $p = 0,09$) und 16,7 fache Steigerung (Klon 8; $p = 0,01$) im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei Fra-1 wurde eine Steigerung um das 12,1 fache (Klon 1; $p = 0,004$) und das 14,3 fache (Klon 2; $p = 0,004$) ermittelt (Abb. 3.16 A und B).

Auch die mit Fra-1 transfizierten MCF-7 pIRES Zellen wiesen eine erhöhte Anzahl invasiver Zellen auf. Bei dem Klon 4 steigerte sich die Zahl der Zellen um das 14 fache ($p = 0,02$) und bei dem Klon 8 um 9,3 fache ($p = 0,02$) (Abb. 3.17). In einer Arbeit von Frau S. Janke (MILDE-LANGOSCH ET AL, 2008) konnte auch bei den Fra-2 überexprimierenden MCF-7 Zellen eine deutlichere Steigerung der Invasivität der transfizierten Zellen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Untersuchungen an Fra-2 wurden diese etablierten Zelllinien mitgeführt.

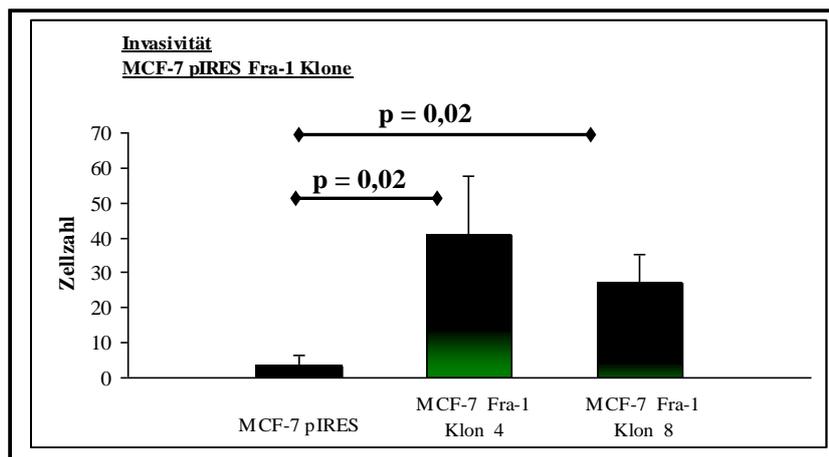


Abbildung 3.17: Darstellung der Invasivität der MCF-7- pIRES Fra-1 Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelexperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Analog zum Invasions-Matrigel-Assay wurde die Fähigkeit zur Migration der Zellen mit Hilfe so genannter Control-Inserts untersucht. Der zuvor beschriebene Versuchsansatz wurde nur dahingehend modifiziert, dass die Membranen der Inserts nicht mit Matrigel beschichtet waren (siehe 2.2.5). Die Zellen mussten, sofern sie migrationsfähig waren, nur durch die Poren der Membran wandern und wurden, wie zuvor beschrieben, ebenfalls fixiert, gefärbt und anschließend ausgezählt.

Wie der Abbildung 3.18 zu entnehmen ist, konnte hinsichtlich des Migrationsverhaltens nur bei den MCF-7 pIRES Fra-1 eine eindeutige Tendenz zur erhöhten Migration beobachtet werden. Die beiden mit Fra-1 transfizierten Klone zeigten im Vergleich zum Kontrolle pIRES eine gleichwertig erhöhte Motilität durchschnittlich um das 2,9 fache (Klon 4, 8; $p = 0,02$).

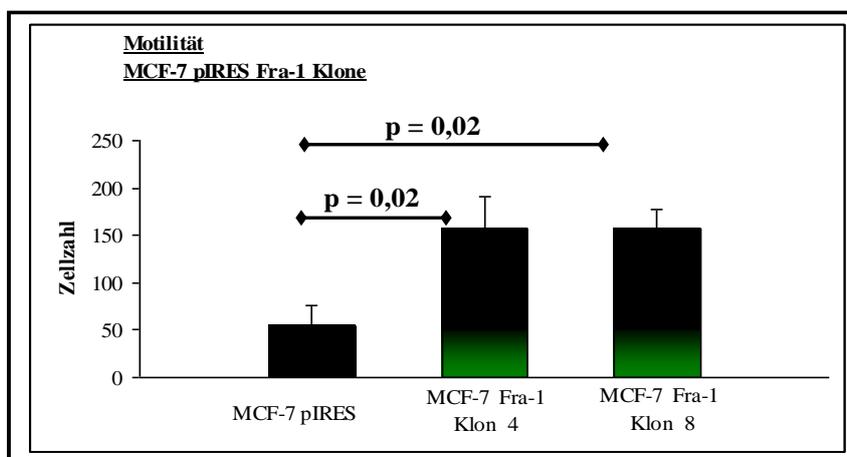


Abbildung 3.18: Darstellung der Motilität der MCF-7 pIRES Fra-1 Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelexperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

ERGEBNISSE

Die anderen transfizierten Zelllinien zeigten keine signifikante Veränderung der Motilität (Abb. 3.19 und 3.20).

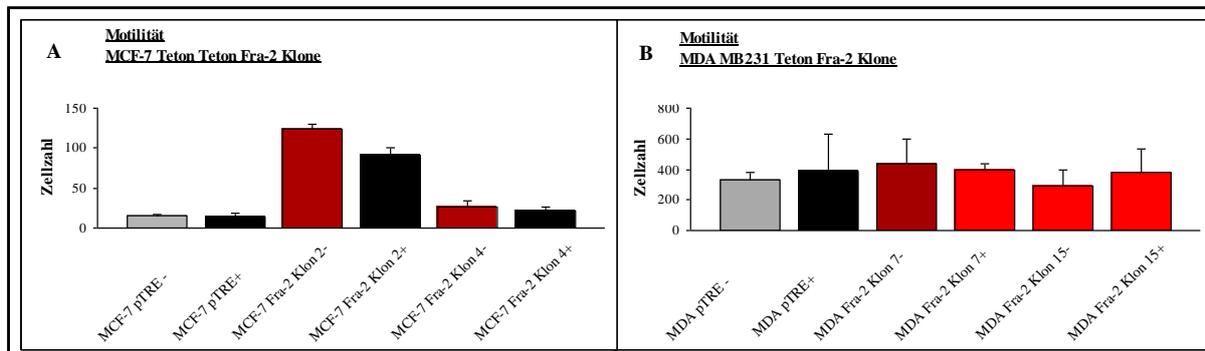


Abbildung 3.19 A-B: Darstellung der Motilität der Teton-Zelllinien.

A: MCF-7 Teton-Fra-2 Klone; **B:** MDA MB231 Teton-Fra-2 Klone. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils vier unabhängigen Einzelexperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

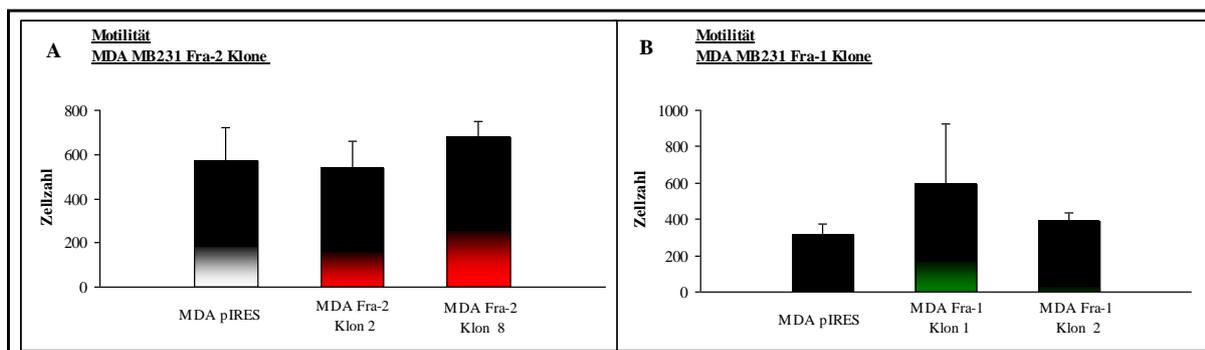


Abbildung 3.20 A-B: Darstellung der Motilität der MDA MB231-pIRES Zelllinien.

A: MDA MB231 pIRES-Fra-2 Klone; **B:** MDA MB231 pIRES-Fra-1 Klone. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils vier unabhängigen Einzelexperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

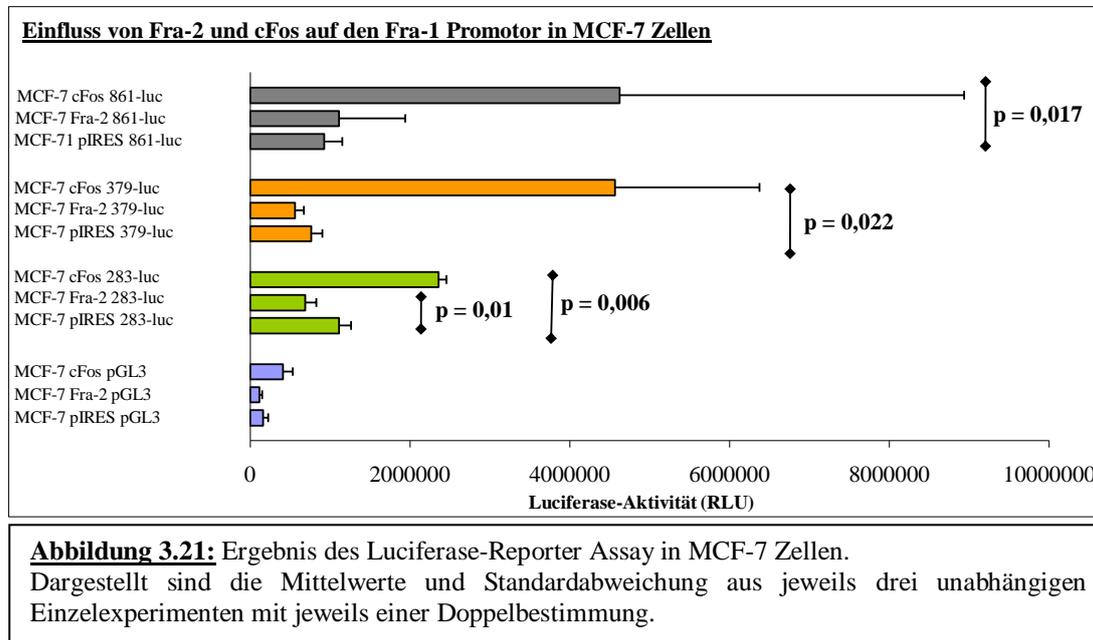
3.2.6 Wirkung von Fra-2 auf den Fra-1 Promoter

Einen ersten Hinweis auf eine reprimierende Wirkung von Fra-2 auf die Fra-1 Expression konnte in der Arbeit von MILDE-LANGOSCH ET AL. (2008) erbracht werden. Nach Fra-1 bzw. Fra-2 RNA-Silencing in MDA MB231 Zellen zeigte sich nach erniedrigter Fra-2 Expression eine erhöhte Fra-1 Proteinkonzentration in Western Blot-Analysen und im umgekehrten Fall trat bei erniedrigter Fra-1 Expression eine erhöhte Fra-2 Proteinkonzentration auf. Einen weiteren Anhaltspunkt für diese Hypothese ergab sich aus den DNA-Bindungsanalysen im

ERGEBNISSE

TransAM-Test. Wie den Abbildungen 3.11 B und 3.12 B zu entnehmen ist, wiesen die Klone mit Fra-2 Überexpression zwar eine erhöhte Bindung von Fra-2 an die AP-1 Consensussequenz, jedoch eine verminderte Bindung von Fra-1 auf. Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse sollte mit Hilfe von Reporter-Assays geklärt werden, ob Fra-2 einen reprimierenden Effekt auf den Fra-1 Promotor ausübt. Hierfür standen dank einer Kooperation mit Dr. S.P. Reddy von der Johns Hopkins University in Baltimore entsprechende Luciferase-Reportergen-Konstrukte mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten von Fra-1 zur Verfügung (ADISESHAI AH ET AL., 2003). Es wurden drei verschiedene Promotorkonstrukte für die transiente Transfektion verwendet, wobei das Konstrukt 283-luc durch TPA (2,5 fach) sowie 379-luc (> 20 fach) und 861-luc (15 fach) induzierbar war. Als Negativkontrolle wurde der Basis-Vektor pGL3 eingesetzt.

Für die MCF-7 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des 283-luc Fragmentes durch Fra-2 signifikant erniedrigt wurde, jedoch durch cFos signifikant erhöht wurde (Abb. 3.21). Ein reprimierender Effekt durch Fra-2 konnte auch bei dem 379-luc-Promotorkonstrukt beobachtet werden, wobei dieser aufgrund der Standardabweichungen nicht signifikant war. Sowie im 379-luc- als auch im 861-luc-Promotorkonstrukten bewirkte cFos eine Erhöhung der Fra-1 Promotoraktivität.



Die Ergebnisse der MDA MB231-Zellen entsprachen tendenziell denen der MCF-7 Zellen, jedoch aufgrund der hohen Schwankungsbreite in den Wiederholungsversuchen statistisch nicht signifikant war (Daten nicht gezeigt).

3.3 Genexpressionsstudien

Mit Hilfe von cDNA-Microarrays kann die RNA-Menge bestimmter Gene nachgewiesen werden und ein entsprechendes Expressionsprofil der analysierten Probe dargestellt werden (siehe 2.5). In dieser Arbeit wurde der cDNA Array Humane Genome Gene Chip U133 Plus 2.0 der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) verwendet.

Zur Erstellung eines Expressionsprofils wurde die RNA der MDA MB231-pIRES Fra-2 sowie MCF-7-pIRES Fra-2 und MCF-7-pIRES Fra-1 Zellen von jeweils zwei Klonen und den jeweiligen Negativkontrollen isoliert. Des Weiteren erfolgte eine RNA-Isolation aus den MCF-7-Teton Fra-2 Zellen, jeweils im nicht-induzierten als auch im induzierten Zustand, also nach 48 stündiger Doxycyclin-Zugabe. Bei der Vergleichsanalyse wurde die mitgeführte Kontrolle mit der Probe des jeweiligen Klons miteinander verglichen, um Unterschiede in der Genexpression zu detektieren und zu quantifizieren. Aus den ermittelten Signalintensitäten kann Rückschluss gezogen werden, um welchen Faktor (*Signal log Ratio*) die Gene in den verglichenen Gruppen ihre Expression verändern.

Nach Erhalt der Daten war ein erster Schritt, mit Hilfe einer Excel-Datenbank die Fülle an Datensätzen zu überblicken und zu verarbeiten sowie ein Raster zu erstellen, nach dem eine Sortierung der Daten durchgeführt werden konnte. Zunächst galt es, nicht-informative Datensätze herauszufiltern. Dafür wurden als erstes die Transkripte eliminiert, deren detektiertes Expressionsniveau (*_signal*) unter 70,0 lag. Die Expressionswerte der einzelnen Transkripte werden generell in logarithmischer Form zur Basis 2 angegeben (BRAZMA ET AL., 2001; BEN-DOR ET AL., 2001). Die daraus resultierenden Änderungen im Expressionsniveau berechnen sich als Differenz der Mittelwerte in logarithmischer Form und werden als Signal log Ratio (*_SLR*) bezeichnet. Eine SLR von ± 1 entspricht einer ± 2 fachen Änderung, eine SLR von ± 2 einer ± 4 fachen Änderung. Transkripte, deren SLR zwischen 0 und $\pm 0,9$ lagen, wurden ebenfalls nicht in die Auswertung einbezogen.

Traten widersprüchliche Aussagen auf, wie z. B. wenn für ein Transkript die Signaldetektion A (für *Absent*) vorliegt, aber gleichzeitig eine Gen-Expressionsveränderung (I für *Increase* oder D für *Decrease*) detektiert wurde, so war der erhaltene Datensatz des Transkript als nicht-informativ zu werten.

Anhand dieses Auswertungsschemas konnten für die untersuchten Zelllinien eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die einer differentiellen Regulation durch Fra-2 bzw. Fra-1 unterliegen. Um einen Überblick zu erhalten, erfolgte eine Einordnung der Gene in Funktionsklassen. Diese wurde mit Hilfe des Terms „*go molecular function*“ des Programms Source (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source>) angefertigt und stellt keine kategorische

ERGEBNISSE

Einteilung dar, da Überschneidungen zwischen den einzelnen Funktionklassen möglich waren. Es wurden 18 Gruppen mit bekannten Funktionen (wie z.B. „Transkriptionsregulation“, „Proteasen“, „Apoptose“, „Entwicklung“, „Signaltransduktion“, „Adhäsion“ etc.) definiert, eine Gruppe („verschiedene Funktion“) umfasste Gene, denen mehrere Aufgabengebiete zu geschrieben werden und für eine Gruppe („unbekannte Funktion“) konnten den Genen keine spezifische Funktion zugeordnet werden.

Aus den gewonnenen Daten wurden anschließend die Gene, die in beiden untersuchten Klonen eine veränderte Genexpression zeigten, herausgefiltert und in Tabellen zusammengefasst. Zunächst zeigen die in den folgenden Abbildungen dargestellten Tortendiagramme die Verteilung der so genannten Decrease- (Gene mit verminderter Genexpression) bzw. Increase- (erhöhte Genexpression) Gene in den jeweiligen analysierten Zelllinien (Abb. 3.22 und 3.23).

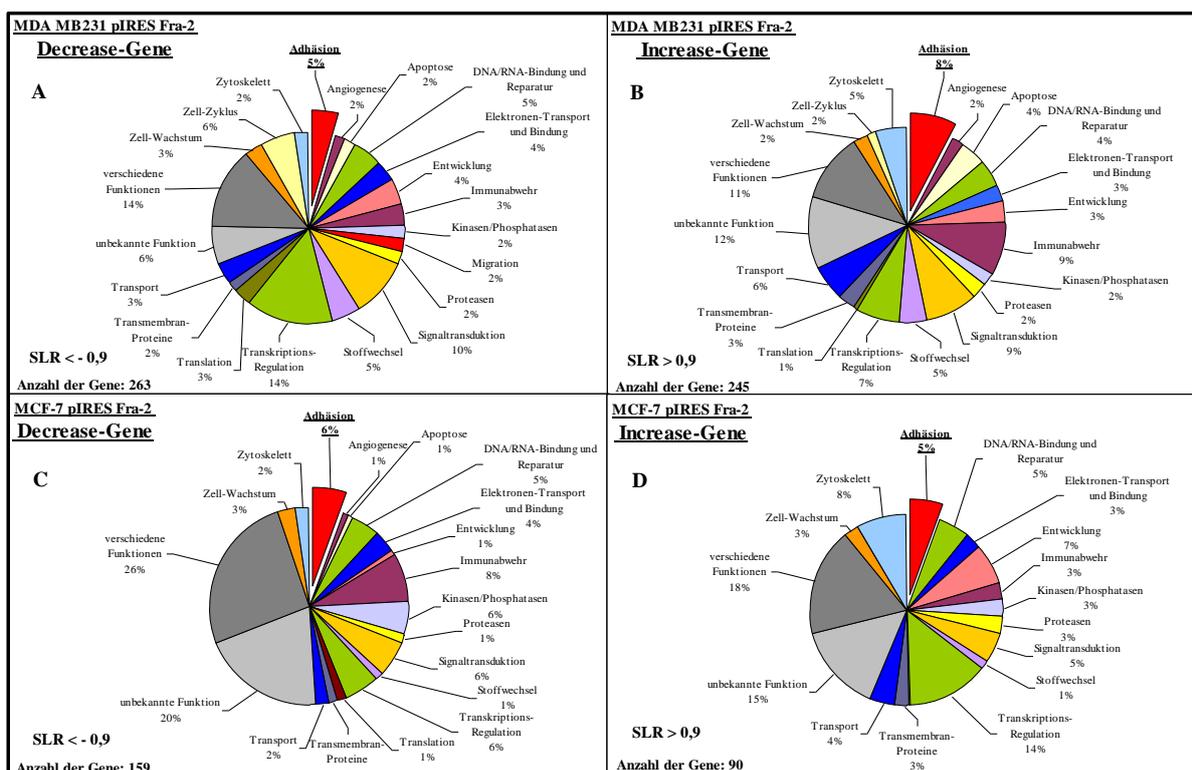


Abbildung 3.22: Prozentuale Verteilung der durch Fra-2 regulierten Gene in den untersuchten Zelllinien dargestellt in Tortendiagrammen.

A: MDA MB231-pIRES Fra-2 herabregulierte Gene (Decrease); **B:** MDA MB231-pIRES Fra-2 heraufregulierte Gene (Increase); **C:** MCF-7-pIRES Fra-2 herabregulierte Gene (Decrease); **D:** MCF-7-pIRES Fra-2 heraufregulierte Gene (Increase).

ERGEBNISSE

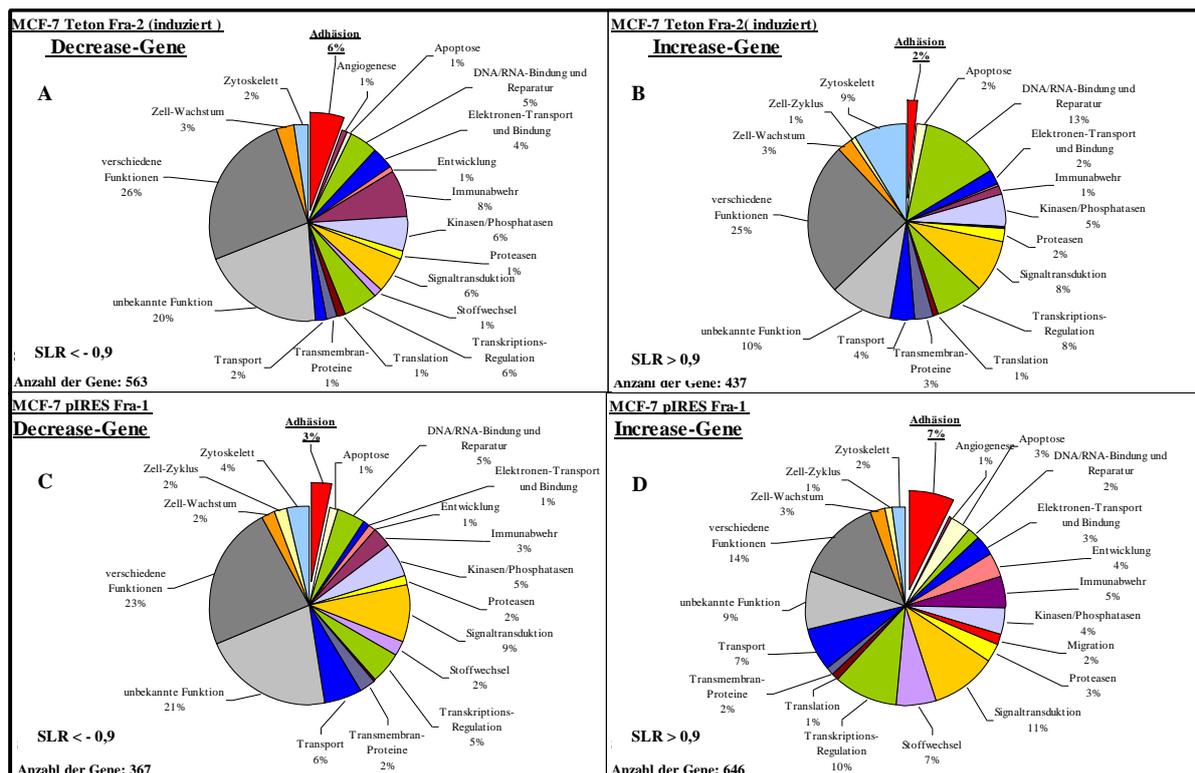


Abbildung 3.23: Prozentuale Verteilung der durch Fra-2 und Fra-1 regulierten Gene in den untersuchten Zelllinien dargestellt in Tortendiagrammen.
A: MCF-7-Teton Fra-2 herabregulierte Gene (Decrease); **B:** MCF-7-Teton Fra-2 heraufregulierte Gene (Increase); **C:** MCF-7-piRES Fra-1 herabregulierte Gene (Decrease); **D:** MCF-7-piRES Fra-1 heraufregulierte Gene (Increase).

Nach Auswertung der Daten der cDNA-Microarray-Analyse wurden diejenigen Gene identifiziert, die durch Fra-2 in MCF-7 und MDA MB213 Zellen sowie Fra-1 in MCF-7 Zellen einer differentiellen Regulation unterlagen (Abb. 3.22 und 3.23).

So konnten Gruppen von Genen erfasst werden, die eine Rolle in der Signaltransduktion (z. B. G-Protein gekoppelte Gene) spielen oder als Kinasen/Phosphatasen (z. B. mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) oder die DUSP-Familie als Phosphatasen etc.) fungieren. Viele Gene, die entweder hoch- oder herabreguliert wurden, sind in der Transkriptionsregulation (z. B. Transkriptionsfaktoren, wie die ATF- und ID-Familie oder JunB) oder in der DNA/RNA-Bindung und Reparatur involviert.

Eine veränderte Genexpression konnte auch bei einigen Proteasen festgestellt werden (z.B. ADAM9 oder ADAMTS, Mitglieder der Matrix-Metalloproteasen-Familie, oder Cathepsin D) (siehe Tab. 3.1) und Genen, die die Immunabwehr (Interleukine, Chemokine oder CSF2 (Colony stimulating factor)) oder auch Apoptose (TNF /Tumor-Nekrose-Faktor) regulieren.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.1: Auflistung von Proteasen, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert worden sind und in den untersuchten Zelllinien durch Fra-2 und Fra-1 eine verstärkte Genexpression zeigen. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als Signal log Ratio (log-Werte 1 \triangleq doppelte Expression) angegeben.

Gen-Bezeichnung	MCF-7 pIRES Fra-2	MCF-7 Teton Fra-2	MDA pIRES Fra-2	MCF-7 pIRES Fra-1	Expressionsstärke: Signal log Ratio SLR > 0,9
A Disintegrin-like and Metalloprotease		ADAM			0,9
A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin 6			ADAMTS2		1
A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin 3				ADAMT6	1
Beta-site APP-cleaving Enzyme 2			BACE2		2,2
Cathepsin B				CTSB	0,9
Cathepsin D		CTSD	CTSD	CTSD	3,6/1,1/3
Cathepsin H				CTSH	1,55
Matrix Metalloprotease 1				MMP1	3
Plasminogen Activator Urokinase Receptor				PLAUR	2
Plasminogen Activator Tissue			PLAT1	PLAT1	1,3/1,7
TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1		TIMP1			1,2/
TIMP Metalloproteinase Inhibitor 2	TIMP2	TIMP2			2,2/1,5
TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3				TIMP3	1,5

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung der möglichen Rolle des Transkriptionsfaktors Fra-2 bei der Metastasierung. Im Verlauf der malignen Progression verlassen die Karzinom-Zellen den Tumorzellverband und invadieren ins Stroma.

Bei diesem Vorgang sind neben verschiedenen anderen Faktoren auch insbesondere Adhäsionsmoleküle und andere Proteine, die bei der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion eine Rolle spielen, involviert. Diese ermöglichen zum einen der Tumorzelle, sich durch eine Verminderung der Adhäsion aus dem Tumorzellverband zu lösen und zum anderen durch verstärkte Adhäsion die Anhaftung an die ECM und Endothelzellen.

Die folgenden Tabellen zeigen eine Übersicht der durch Fra-2 und Fra-1-regulierten Gene in den untersuchten Zelllinien, die zu diesem Funktionsbereich gehören (Tab. 3.2).

ERGEBNISSE

Tabelle 3.2: Auflistung der Zelloberflächen-Moleküle, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert worden sind und in den untersuchten Zelllinien durch Fra-2 und Fra-1 eine verstärkte Genexpression zeigen. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als Signal log Ratio (log-Werte 1 \triangleq doppelte Expression) angegeben.

Gen-Bezeichnung	MCF-7 pIRES Fra-2	MCF-7 Teton Fra-2	MDA pIRES Fra-2	MCF-7 pIRES Fra-1	Expressionsstärke: Signal log Ratio SLR > 0,9
Adipocyte-specific adhesion molecule			ASAM		1
Cell adhesion molecule 1		CADM1			1,1
CD44 molecule		CD44	CD44	CD44	1,1/ 1/ 2,5
Cadherin 5, type 2, VE-cadherin				CDH5	2,45
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1				CEACAM1	1,75
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5				CEACAM5	2,05
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6				CEACAM6	1,85
Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1		CELSR1			1
Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2		CELSR2			1,3
Desmocollin 2				DSC2	1,3
Endothelial cell adhesion molecule			ESAM		1,2
Gap junction protein, alpha 1, 43kDa				GJA1	2,65
Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)			ICAM1	ICAM1	2,5/ 0,9
Integrin, alpha 2			ITGA2	ITGA2	0,9/ 0,95
Integrin, alpha 5				ITGA5	1,3
Integrin, beta 4			ITGB4		0,9
Integrin, beta 6				ITGB6	1,6
Immunoglobulin superfamily, member 4	IGSF4				1,35
Kallmann syndrome 1 sequence			KAL1		1,9
KIT ligand				KITLG	1,2
L1 cell adhesion molecule		L1CAM	L1CAM		2,0/ 1,0
Melanoma cell adhesion molecule			MCAM		0,9
Mucin 20, cell surface associated				MUC20	5,2
Mucin 5B				MUC5B	1,2
Neuronal cell adhesion molecule				NRCAM	4,75
Plakophilin 2	PKP2			PKP2	1,9/ 1,4/ 3,8
Protocadherin beta 10				PCDHB10	2
Protocadherin beta 14				PCDHB14	2,5
Protocadherin beta 16				PCDHB16	1,8
Protocadherin beta 4				PCDHB4	2,25
Protocadherin beta 6		PCDHB6		PCDHB6	1/ 2,15
Protocadherin beta 7				PCDHB7	1,75
Protocadherin beta 8				PCDHB8	1,4
Protocadherin gamma subfamily A, 4				PCDHGA4	1
Sema domain, immunoglobulin domain, 3C		SEMA3C			1,8
Sema domain, immunoglobulin domain, 4D			SEMA4D	SEMA4D	1,1/ 1
Sema domain, immunoglobulin domain, 6A				SEMA6A	1,85
Sialic acid binding Ig-like lectin 15				SIGLEC15	2,65
Thrombospondin 1		THBS1	THBS1	THBS1	1,3/ 0,9/ 1,6

Es zeigte sich, dass der Anteil der Zelloberflächen-Moleküle, die eine verstärkte Genexpression aufwiesen, größer war als der Anteil mit verminderter Expressionsstärke. Des Weiteren ist die Gruppe der Adhäsionsmoleküle in den untersuchten Zelllinien mit erhöhter Fra-2 Expression sehr heterogen und weist eine Vielzahl von Genen auf, die sowohl in der Zell zu Zell- als auch in der Zell zu Matrix-Adhäsion von Bedeutung sind. Hervorzuheben ist zum einen das Gen CD44, dass eine verstärkte Expression in den Fra-2 und auch in den Fra-1

überexprimierenden Zelllinien zeigt. CD44 ist ein in die Zellmembran integriertes Glycoprotein (STEFANOVA ET AL., 1989), es fungiert als Hyaluronsäure-Rezeptor und ist als Adhäsionsmolekül beschrieben (ARUFFO ET AL., 1990).

Als weiteres interessantes Gen wurde ICAM-1 mit verstärkter Genexpression detektiert, das in den Zelllinien MDA MB231 und MCF-7 jeweils durch Fra-2 und auch durch Fra-1 reguliert wird. ICAM-1 wird in der Literatur als interzelluläres Adhäsionsmolekül bezeichnet und ist ein Ligand für das LFA-Antigen (*lymphocyte function-associated antigen*) (SIMMONS ET AL., 1988).

Ebenfalls interessant erschien das Gen L1CAM, welches zwar nur in den Fra-2 überexprimierenden Zelllinien auftrat, aber in der Tumorprogression von verschiedenen Tumoren eine Rolle spielt (THIES ET AL., 2001; FOGEL ET AL., 2003 a UND b; ALLORY ET AL., 2005; SHTUTMAN ET AL., 2006, BOO ET AL., 2007).

Eine Auswahl von Zelloberflächen-Molekülen, die eine verminderte Genexpression aufwiesen, ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Zu nennen ist z.B. Connexin 43 (GJA1), das als Gap-Junction Protein interzelluläre Kommunikation von Zellen ermöglicht und eine Zell/Zell-Adhäsion vermittelt (FISHMAN ET AL., 1991).

Oder das Adhäsionsmolekül ALCAM, welches auf aktivierten Leukozyten zuerst beschrieben wurde (BOWEN ET AL., 1999). KRISTIANSEN ET AL. (2003) zeigten, dass dieses Gen in aggressiven Prostatakarzinomen herunterreguliert ist und mit schlechter Prognose einhergeht. Des Weiteren ist die Gruppe der Protocadherine zu nennen, die der Cadherin-Superfamilie angehören und Calcium-abhängige Zell/Zell-Adhäsion vermitteln.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.3: Auflistung der Zelloberflächen-Moleküle, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert worden sind und in den untersuchten Zelllinien durch Fra-2 und Fra-1 eine verminderte Genexpression zeigen. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als Signal log Ratio (log-Werte 1 $\hat{=}$ doppelte Expression) angegeben.

Gen-Bezeichnung	MCF-7 pIRES Fra-2	MCF-7 Teton Fra-2	MDA pIRES Fra-2	MCF-7 pIRES Fra-1	Expressionsstärke: Signal log Ratio SLR < - 0,9
Adhesion regulating molecule 1	ADRM1	ADRM1			-0,9/ -0,9
Activated leukocyte cell adhesion molecule	ALCAM	ALCAM			-1,8/ -1,4
Adhesion molecule with Ig-like domain 2	AMIGO2	AMIGO2			-2,2/ -2,2
CD22 molecule			CD22		-1,6
CD36 molecule				CD36	-1,5
Catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1		CTNNAL1		CTNNAL1	-1/ -0,95
Desmocollin 2	DSC2		DSC2		-1,35/ -2,7
Down syndrome cell adhesion molecule				DSCAM	-1,4
Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2			FLRT2		-2,3
Gap junction protein, alpha 1, 43kDa (Connexin 43)	GJA1	GJA1	GJA1		-4,4/-3,4/-5
Gap junction protein, delta 3, 31.9kDa		GJD3			-1
Integrin beta 1 binding protein 1		ITGB1BP1			-1,1
Integrin, beta 5		ITGB5			-1
L1 cell adhesion molecule				L1CAM	-1,3
Mucin 1, cell surface associated	MUC1	MUC1			-1/ -1,2
Neural cell adhesion molecule 1				NCAM1	-3
Neural cell adhesion molecule 2				NCAM2	-3,75
Protocadherin 9		PCDH9			-2,5
Protocadherin 17				PCDH17	-3
Protocadherin 19	PCDH19				-1,4
Protocadherin 20				PCDH20	-1,15
Protocadherin alpha 2				PCDHA2	-3,1
Protocadherin alpha 3				PCDHA3	-1,8
Protocadherin alpha 8				PCDHA6	-3,3
Protocadherin beta 2				PCDHB2	-1,4
Sema domain, immunoglobulin domain, 3A			SEMA3A		-2
Tenascin C (Hexabrachion)			TNC		-5,9

Des Weiteren ist auch eine kleine Gruppe an Proteasen mit verminderter Gen-Expression identifiziert worden (siehe Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Auflistung von Proteasen, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert worden sind und in den untersuchten Zelllinien durch Fra-2 und Fra-1 eine verminderte Genexpression zeigen. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als Signal log Ratio (log-Werte 1 $\hat{=}$ doppelte Expression) angegeben.

Gen-Bezeichnung	MCF-7 pIRES Fra-2	MCF-7 Teton Fra-2	MDA pIRES Fra-2	MCF-7 pIRES Fra-1	Expressionsstärke: Signal log Ratio SLR < - 0,9
A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin 1	ADAMTS1			ADAMTS1	-5,25/-6
A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin 19				ADAMTS19	-3,65
Cathepsin A		CTSA			-0,9
Matrix Metalloprotease 16		MMP16		MMP16	-2,8/-3,4
Serpin Peptidase Inhibitor 1		SERPIN1			-2,2
Serpin Peptidase Inhibitor 2			SERPIN2		-4,5

Eine Zusammenfassung der Mikroarray-Daten ist als CD dem Anhang beigelegt.

3.3.1 Validierung potentieller Zielgene mittels Western Blot-Analyse

Anhand der gewonnenen Daten der Microarrays sollten potentiell identifizierte Zielgene, insbesondere Adhäsionsmoleküle, auf proteinbiochemischer Ebene verifiziert werden. Hierfür wurden Zellysate der untersuchten Zelllinien einer Western Blot-Analyse unterzogen und mit Antikörpern gegen einzelne interessante Zielgene, die in der Genexpressionsanalyse hoch- oder herunter reguliert waren, detektiert.

In der Abbildung 3.24 ist eine Zusammenstellung der Western Blot-Ergebnisse in den untersuchten Zelllinien dargestellt. Die Abbildung 3.24 A zeigt eine Auswahl von Genen, die in den MDA MB231- pIRES Fra-2 Zellen eine Expressionsveränderung aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Gap-Junction-Molekül Connexin 43 als auch das Adhäsionsmolekül ALCAM auf RNA- und Protein-Expressionsebene herunterreguliert sind. Des Weiteren ist der Abbildung zu entnehmen, dass das Adhäsionsmolekül ICAM-1 nicht nur auf RNA-Expressionsebene, sondern auch auf Protein-Expressionsebene hochreguliert wird. Bei dem Adhäsionsmolekül HCAM (CD44) konnten die Daten des Mikroarrays proteinbiochemisch nicht verifiziert werden.

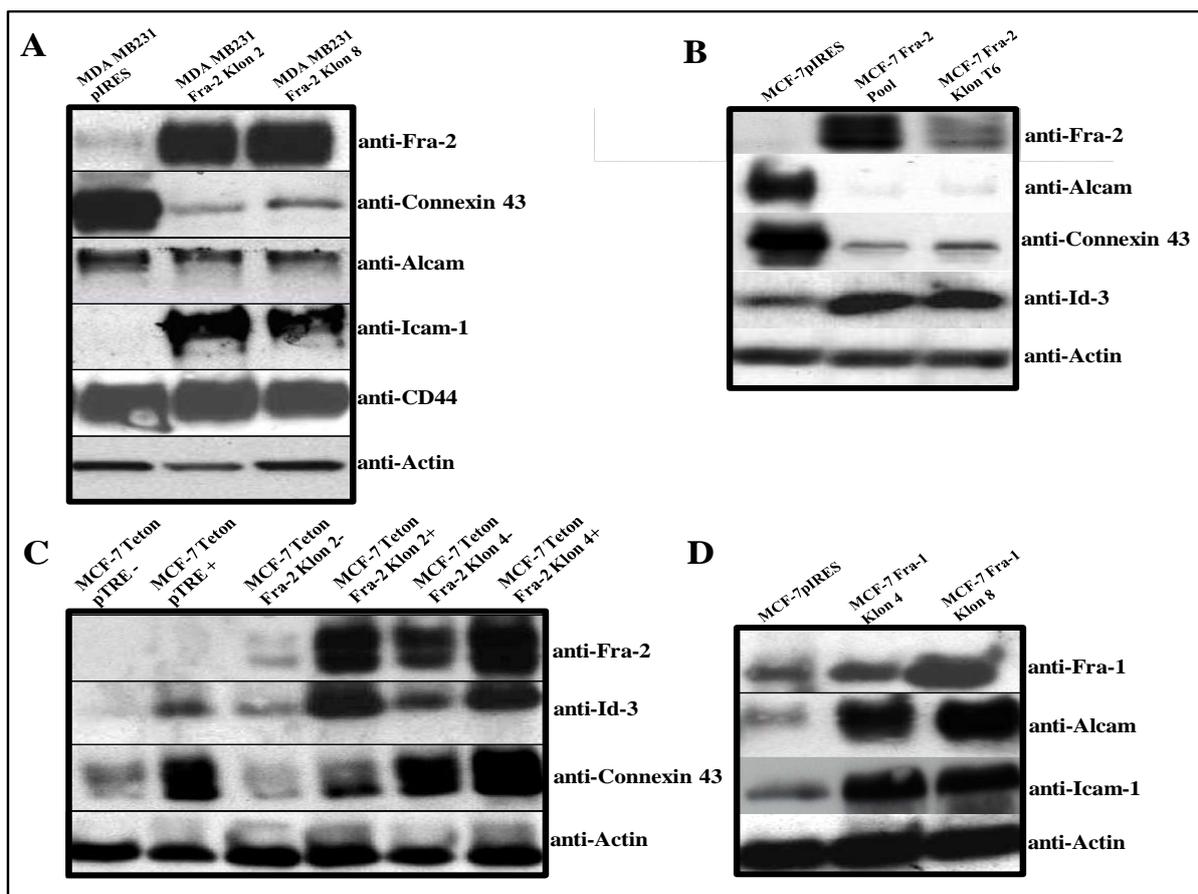


Abbildung 3.24 A- D: Western Blot-Analyse verschiedener Fra-2 Zielgene.

A: MDA MB231 Fra-2 Zellen; **B:** MCF-7 Fra-2 Zellen; **C:** MCF-7 Teton Fra-2 Zellen nach Induktion mit Dox. (2 µg/ml für 48 h); **D:** MCF-7 Fra-1 Zellen. Es wurden jeweils 20 µg Protein aus dem Zellysat aufgetragen. Konzentrationskontrolle: Actin.

Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei den MCF-7-pIRES Fra-2 transfizierten Zellen erzielt werden. Im Falle des Gap-Junction-Moleküls Connexin 43 und des Adhäsionsmolekül ALCAM zeigte sich, wie schon in den Daten des Microarrays ersichtlich, eine deutliche Verminderung der Genexpression. Bei dem Transkriptionsfaktors ID3 konnte eine verstärkte Protein-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.24 B).

Dies war auch bei den MCF-7-Teton Fra-2 Zellen zu sehen. Hinsichtlich des Moleküls Connexin 43 konnte ein gegenläufiges Ergebnis festgestellt werden. Nach Induktion mit Doxycyclin wurde die Expression von Connexin 43 verstärkt. Aber dieses zeigte auch die als Negativkontrolle pTRE, welches daher auf einen Effekt von Doxycyclin schließen lässt und vermutlich nicht nur durch Fra-2 hervorgerufen wird (Abb. 3. 24 C). Des Weiteren konnte bei den MCF-7-pIRES Fra-1 Zellen beobachtet werden, dass die Fra-1 überexprimierenden Zellen eine stärkere Expression von ALCAM aufweisen als die zur Kontrolle mitgeführte Zelllinie MCF-7 pIRES. Ebenso zeigt das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 eine verstärkte Expression, obwohl in den Microarrays keine signifikante Erhöhung für diese Gene vorlag.

3.3.2 FACS-Analyse zur Validierung potentieller Zielgene

Eine weitere Methode, um die durch Fra-2 differentiell regulierten Zielgene zu validieren, ist die durchflußzytometrische Analyse (FACS) (siehe 2.2.9). Durch FACS-Analyse (*Fluorescence Assisted Cell Sorting*) können Oberflächenmoleküle der Zelle, die durch einen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper markiert wurden, quantitativ im Verhältnis zu der Kontrollprobe (Isotyp-Kontrolle) bestimmt werden können.

Hierfür wurden die Fra-2 überexprimierenden MDA MB231 bzw. MCF-7 Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle auf die Anwesenheit einiger ausgewählter Adhäsionsmoleküle wie CEACAM6, L1CAM, ICAM-1, CD44 und CD15 analysiert. In den Abbildungen 3.25 und 3.26 sind für die jeweiligen untersuchten Moleküle die Fluoreszenz-Intensitäten im Histogramm dargestellt. Anhand der FACS-Methode wird für jede einzelne Zelle ihre jeweilige Fluoreszenzintensität bestimmt, d.h. es ist für jede einzelne durchgelaufene Zelle ersichtlich, ob jeweils viel oder wenig des untersuchten Moleküls auf der Oberfläche vorhanden ist. Pro Messung wurden mindestens 10000 Ereignisse (Events), d.h. 10000 Zellen gezählt, aufgenommen und verarbeitet.

ERGEBNISSE

Für die MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen konnte für CEACAM6, L1CAM, ICAM-1 und CD15 (Lewis^x-Antigen) wesentlich mehr dieser Moleküle auf der Oberfläche dieser Zellen detektiert werden als im Vergleich zur Kontrolle (MCF-7-pIRES) (Abb. 3.25). Für das Oberflächenmolekül CD44 war zwischen der Kontrolle und den Fra-2 transfizierten Zellen nur ein geringfügiger Shift zu verzeichnen (7,8 zu 8,2), so dass davon ausgegangen werden kann, das nicht wesentlich mehr CD44 auf der Oberfläche der MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen gebildet wird.

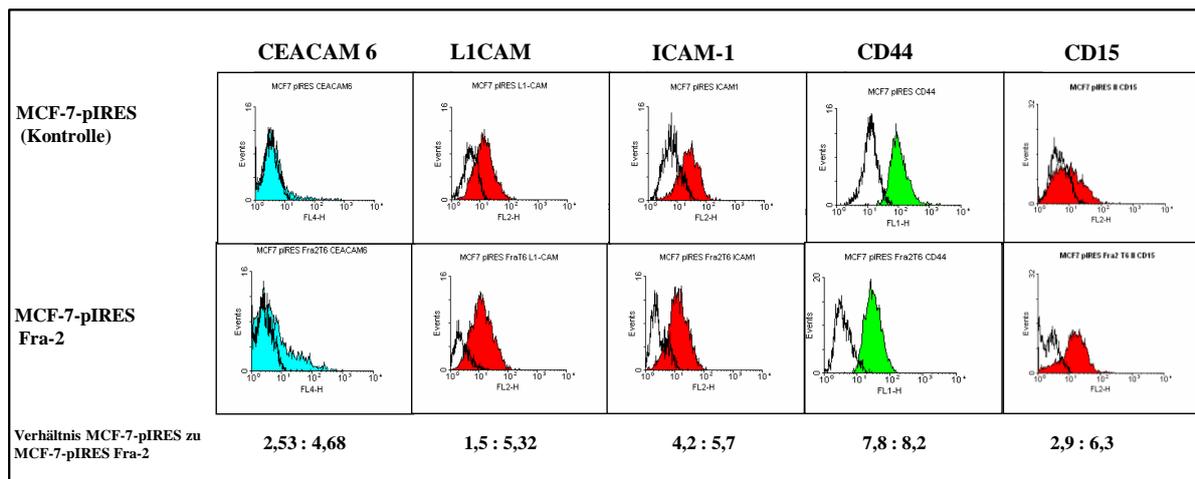


Abbildung 3.25: FACS-Analyse der MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen mit verschiedenen Oberflächenmolekülen.

Dargestellt ist ein Histogramm, in dem die Fluoreszenzintensität (FL(1-4)-Height) gegen die Anzahl der Ereignisse (Events) aufgetragen ist. Das weiße Integral (Peak) stellt die Isotyp- Kontrolle dar. Die farbig unterlegte Fläche repräsentiert das Bindungsmuster des jeweiligen untersuchten Moleküls. Angegeben ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensität von der Kontrolle zur transfizierten Fra-2 Zelllinie.

Für die MDA MB231-pIRES Fra-2 Zellen wurden im Vergleich zur Kontrolle (MDA MB231-pIRES) eine größere Anzahl positiver Zellen für L1CAM, ICAM-1 und CD44 gezählt, was darauf schließen lässt, dass die mit Fra-2 transfizierten Zellen diese Moleküle verstärkt auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Hinsichtlich des Lewis^x-Antigens CD15 konnte keine erhöhte Anwesenheit auf der Oberfläche der MDA MB231-pIRES Fra-2 Zellen im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Abb. 3.26).

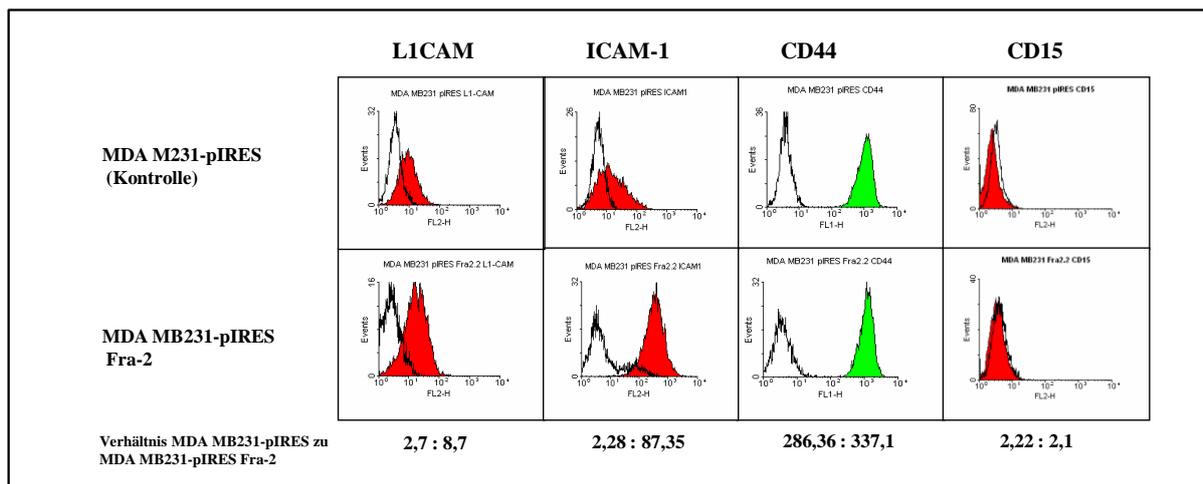


Abbildung 3.26: FACS-Analyse der MDA MB231-pIRES Fra-2 Zellen mit verschiedenen Oberflächenmolekülen.

Dargestellt ist ein Histogramm, in dem die Fluoreszenzintensität (FL(1-4)-Height) gegen die Anzahl der Ereignisse (Events) aufgetragen ist. Das weiße Integral (Peak) stellt die Isotyp- Kontrolle dar. Die farbig unterlegte Fläche repräsentiert das Bindungsmuster des jeweiligen untersuchten Moleküls. Angegeben ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensität von der Kontrolle zur transfizierten Fra-2 Zelllinie.

3.4 Einfluss von Fra-2 auf die Adhäsion an Molekülen der extrazellulären Matrix

Die Ergebnisse der cDNA Microarray-Analyse gaben einen Hinweis darauf, dass viele der durch Fra-2 und Fra-1 differentiell exprimierten Gene in der Zell-zu-Matrix-Adhäsion eine Rolle spielen.

Potentiell metastastatische Tumorzellen müssen zunächst einmal die Basalmembran durchbrechen, die sie von dem umgebenden Bindegewebe trennt, um zu den Blut- und Lymphgefäßen zu gelangen, in denen die Tumorzellen abtransportiert werden. Unterhalb der Basalmembran liegt die extrazelluläre Matrix des Bindegewebes, die im Wesentlichen von Fibroblasten synthetisiert wird. In der extrazellulären Matrix wird zwischen Fasern und ungeformter Grundsubstanz unterschieden. Die Fasern, die im Bereich der Brustdrüse hauptsächlich Kollagene sind, bilden ein Grundgerüst, in das die ungeformte Grundsubstanz eingelagert ist. In der Grundsubstanz befinden sich zwei wesentliche Molekülklassen, die Glykosaminoglykane und die Glykoproteine. Zu den Glykosaminoglykanen zählen Hyaluronsäure und Heparansulfatproteoglykan, während Fibronectin und Laminin zu den Glykoproteinen zählen.

ERGEBNISSE

Um das Adhäsionsverhalten der Fra-2 und Fra-1 überexprimierenden Zellen näher zu untersuchen, wurden die Zellen mit Proteinen der ECM in Interaktion gebracht.

Dieses wurde in einem Adhäsionsassay *in vitro* durchgeführt (siehe 2.2.7). Hierfür wurde eine Zellkulturplatte (96 well) verwendet, die mit vier Bestandteilen der extrazellulären Matrix beschichtet war. Die Zellen wurden auf die beschichtete Oberfläche der Zellkulturplatte ausgesät, anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen entfernt und die adhärenen Zellen fixiert und angefärbt. Zur Quantifizierung der Adhäsion wurde in einem Elisagerät die optische Dichte (OD 540 nm) ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Negativkontrolle bei den MCF-7-pIRES Fra-2 Klonen eine verstärkte Adhäsion an Collagen IV, Collagen I, Vitronectin und Fibronectin zu verzeichnen war (Abb. 3.27), wobei die Anheftung der Fra-2 Klone an Collagen IV und Vitronectin statistisch signifikant erhöht ist.

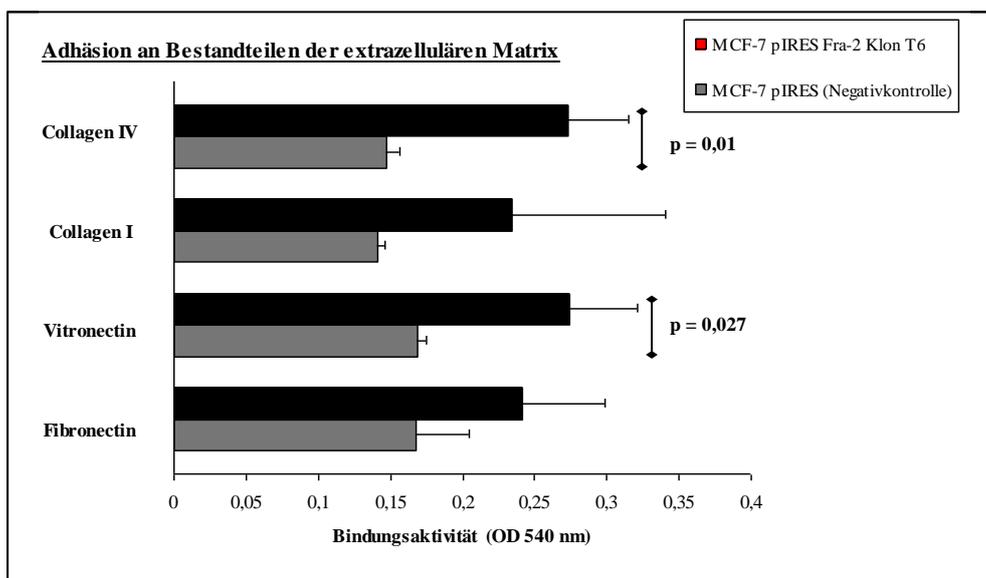


Abbildung 3.27: Adhäsion von MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelexperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Weniger eindeutig war das Ergebnis bei den MDA MB231-pIRES Fra-2 Klonen, im Vergleich zur Negativkontrolle MDA MB231-pIRES war nur eine leicht erhöhte Adhäsion an Collagen I und Fibronectin zu beobachten, wobei die Steigerung der Anheftung an Collagen I statistisch signifikant war. (Abb. 3.28).

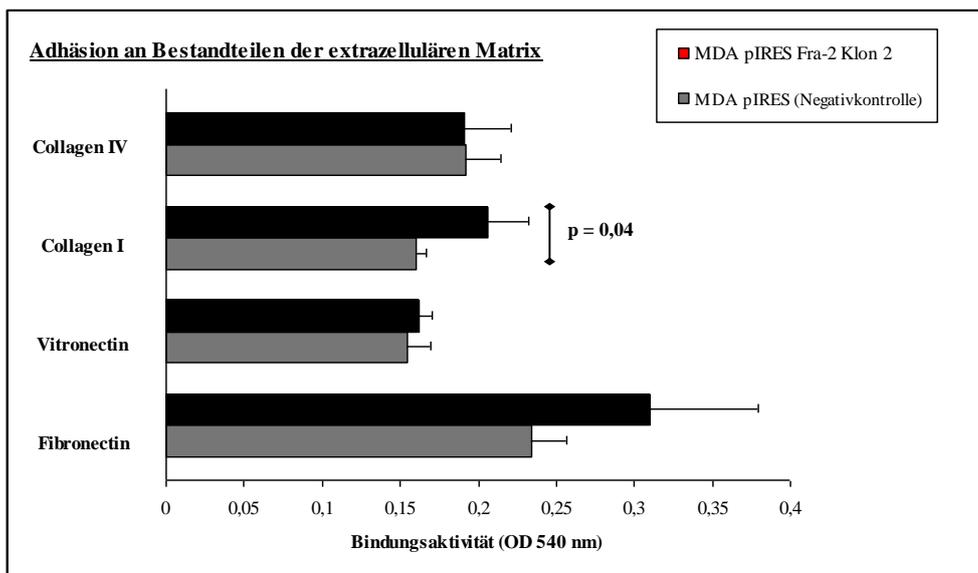


Abbildung 3.28: Adhäsion von MDA MB231-pIRES Fra-2 Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelexperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Die Microarray-Analysen der MCF-7-pIRES Fra-1 Klone zeigten, dass auch durch Fra-1 viele Adhäsionsmoleküle differentiell exprimiert werden. Daher wurde das Adhäsionsverhalten von Zellen dieser Klone ebenfalls in dem Adhäsionsassay analysiert. Es konnte im Vergleich zur Negativkontrolle MCF-7-pIRES wie bei den MCF-7-pIRES Fra-2 Klonen an Collagen IV und I sowie an Vitronectin und Fibronectin eine erhöhte Adhäsion festgestellt werden. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnte eine statistische Signifikanz allerdings nicht ermittelt werden (Abb. 3.29).

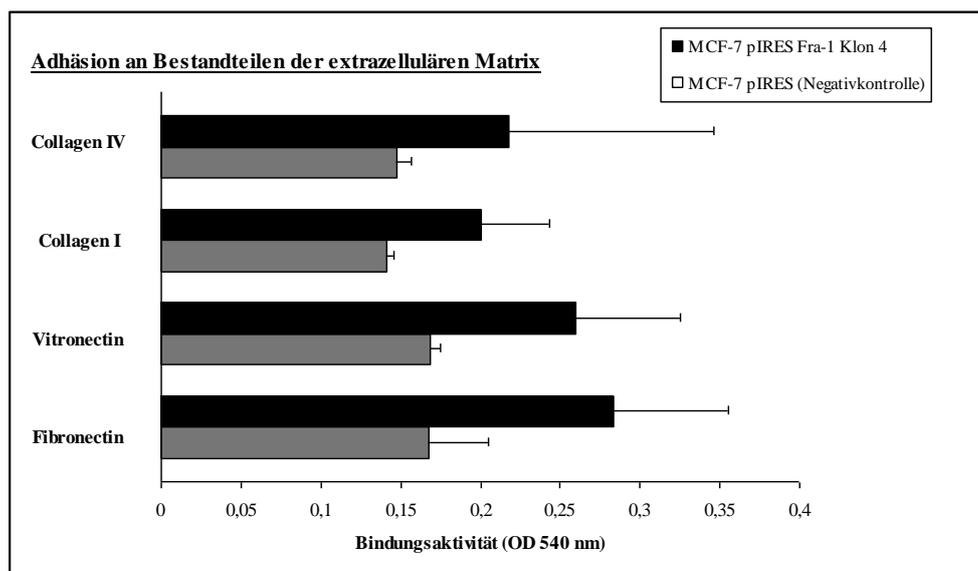


Abbildung 3.29: Adhäsion von MCF-7-pIRES Fra-1 Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Einzelexperimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

3.5 Untersuchung der Interaktion zwischen Fra-2 und E-Selektin

Im Anschluss an die erzielten Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die durch Fra-2 regulierten Adhäsionsmoleküle einen Einfluss auf die Interaktion mit dem Endothelmarker E-Selektin haben.

Beim Vorgang der Metastasierung ist ein wichtiger Schritt die Extravasation, nachdem die Zellen eines metastasierenden Primärtumors den Weg zum potentiellen Bildungsort der Metastase unbeschadet passiert haben. Es wird angenommen, dass Tumorzellen zur Evasion aus dem Blutstrom die gleichen Moleküle nutzen wie aus dem Blutstrom auswandernde Leukozyten. Die Leukozytenemigration ist bereits gut beschrieben und ist geprägt von einem koordinierten Zusammenspiel verschiedener Adhäsionsmoleküle. So wird zunächst ein Zellrollen als erste Interaktion zwischen Leukozyt und Gefäßendothel beschrieben (COHNHEIM, 1889). Dieser Rollvorgang als erste Kontaktaufnahme wird durch Selektine eingeleitet und der nächste Schritt der Adhäsion am Endothel durch interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-Familie) und Plättchen-Endothel-Zell-Adhäsionsmoleküle (PECAM-1).

Dieser Hypothese folgend, sollte mit Hilfe von Zellflusseexperimenten, in denen der physiologische Zustand in postkapillären Venolen simuliert werden kann, die Interaktion von E-Selektin als Endothelmarker und den Fra-2 überexprimierenden Zellen analysiert werden. Da Selektine nach bisherigen Erkenntnissen ihre volle Funktion nur bei Vorherrschen einer Strömung und damit unter dynamischen Bedingungen entfalten, ist es wenig sinnvoll, sie unter statischen zu untersuchen. Es wurde daher mit dem Zellflusseexperiment eine Methode verwendet, die zum einen dem physiologischen Zustand entspricht und zum anderen eine genaue Beobachtung dieser Interaktion und damit letztendlich eine quantitative Auswertung ermöglicht.

Die Auswertung diente zum einen als qualitative Beschreibung des Verhaltens der Tumorzellen unter Flussbedingungen in Gegenwart von E-Selektin (wie z. B. Zellrollen oder feste Adhäsion) und zum anderen wurden die Zellen, die ein verändertes Verhalten aufzeigten, quantitativ analysiert.

ERGEBNISSE

Als spezifisches Selektin- und nicht strömungsvermittelter Zellrollen wurde eine Rollgeschwindigkeit von $v = 0,001 - 0,015$ mm/s definiert. Durch Variation der angelegten Scherkräfte über die Perfuserpumpe kann zwischen dem unspezifischen strömungsvermittelten Rollen und dem spezifischen E-Selektin-vermittelten Zellrollen unterschieden werden. Als feste Adhäsion wurde ein bewegungsloses Verharren einer Zelle am Kapillarboden ($v = 0,0$ mm/s) vom Zellrollen abgegrenzt. Ein dritter Bewegungszustand, in der Literatur als Tethering beschrieben, der sich als ein wiederholtes ruckartiges Adhären und Ablösen der Zellen darstellt, konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen nicht beobachtet werden.

Um in dem Versuchsansatz eine physiologische Situation zu simulieren, wurden die Fra-2 überexprimierenden MDA MB231 und MCF-7 Zellen jeweils in einer Konzentration von 100.000 Zellen/ml mit einer Scherkraft von 5 dyn/cm^2 über E-Selektin-beschichtete Kapillare ($50 \text{ } \mu\text{g/ml}$) gespült. Als Versuchskontrolle diente zuvor eine mit normalen FCS beschichtete Kapillare, an denen kein auffälliges verändertes Verhalten der Zellen zu sehen war. In der Abbildung 3.30 ist die Videobild-Darstellung am Beispiel der MCF-7 Zellen zu sehen.

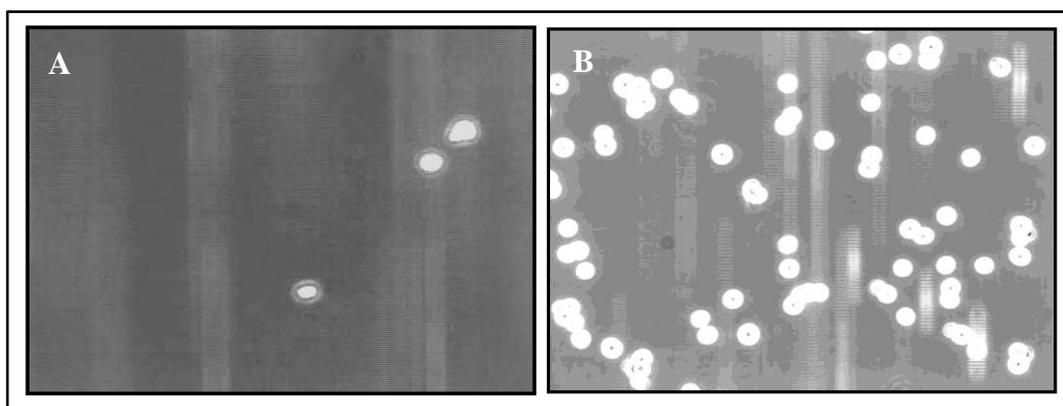
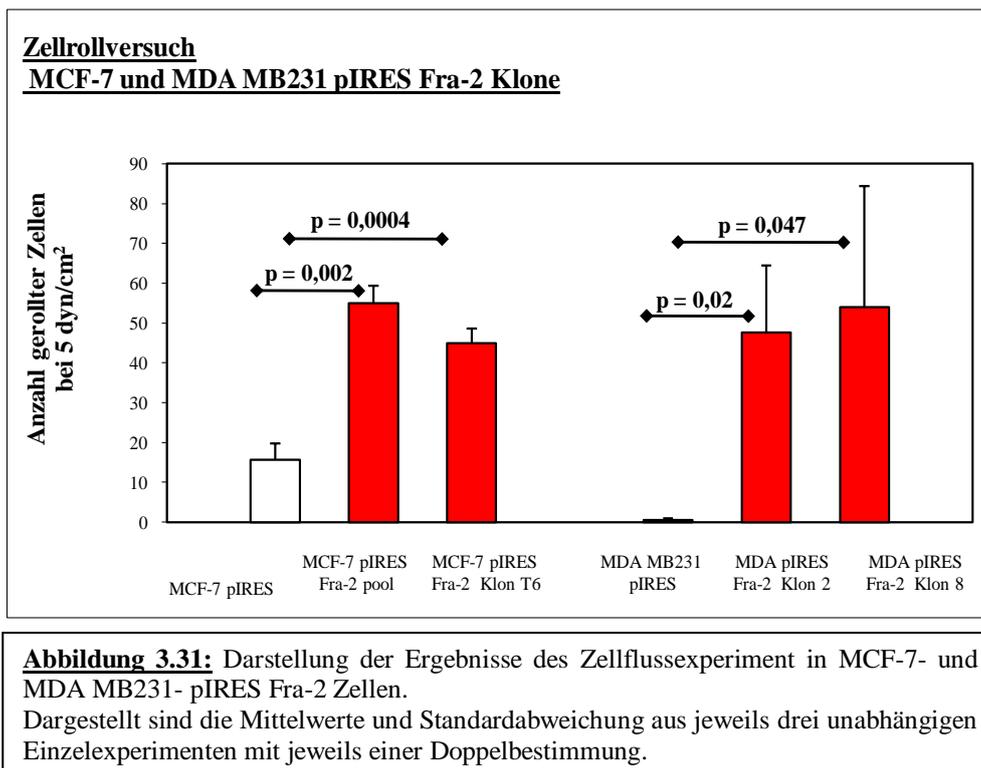


Abbildung 3.30: Videodarstellung des Zellflusses am Beispiel der MCF-7- Zellen.
A: MCF-7-pIRES Zellen (Kontrolle) B: MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen

Hinsichtlich der MDA MB231-pIRES Fra-2 Zellen konnte an den mit E-Selektin-beschichteten Kapillaren folgendes beobachtet werden: Die als Negativkontrolle mitgeführte Zelllinie MDA MB231-pIRES zeigte wie schon an der Kontroll-Kapillare keine verlangsamte Geschwindigkeit oder das beschriebene Zellrollen. Bei der mit Fra-2 transfizierten MDA MB231 Zelllinie konnte jedoch bei beiden analysierten Klonen (Klon 2: 48 Zellen; Klon 8: 54 Zellen im Mittel) ein deutliches Zellrollen festgestellt werden. Nach Auswertung dreier

unabhängiger Versuche wurden die Mittelwerte der gerollten Zellen im Diagramm (Abb. 3.31) dargestellt.

Bezüglich der MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen konnte ein ähnliches Verhalten festgestellt werden. Hier zeigte auch ein geringer Anteil (im Mittel 15 Zellen) der Kontrollzellen (MCF-7-pIRES) eine verlangsamte Geschwindigkeit, die als Zellrollen definiert wurde. Dennoch war bei den untersuchten Fra-2 Klonen eine wesentlich größere Anzahl von Zellen (Pool: 55 Zellen; Klon T6: 45 Zellen im Mittel) zu detektieren, die das Zellrollen aufwiesen (Abb. 3.31).



Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass aufgrund der durch Fra-2 regulierten Adhäsionsmoleküle eine Interaktion mit E-Selektin stattfindet und die transfizierten Zellen im Vergleich zur mitgeführten Negativkontrolle ein verändertes Adhäsionsverhalten *in vitro* aufweisen.

Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen weisen daraufhin, dass der Transkriptionsfaktor Fra-2 das invasive Verhalten von Mammakarzinomzellen deutlich steigert.

Durch die Untersuchung zweier durch Fra-2 regulierter Adhäsionsmoleküle (L1CAM und ICAM-1), sollte deren potentielle klinische Relevanz an klinischem Tumormaterial charakterisiert werden.

3.6 Untersuchungen von Fra-2 regulierten Adhäsionsmolekülen an klinischem Tumormaterial

Es wurden Expressionsstudien der Adhäsionsmoleküle L1CAM und ICAM-1 auf Protein- und RNA-Ebene durchgeführt. Die Eck-Daten, der in dieser Kohorten-Studie untersuchten Tumore sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5: Studie der L1CAM Protein- und mRNA-Expression.

Parameter	Protein-Analyse (Western Blot)		mRNA-Analyse (Affymetrix)	
	Fälle (n =)	Prozent (%)	Fälle (n =)	Prozent (%)
Alter der Patientinnen				
Mittelwert (Median)	56,9y (57,0y)		55,5y (56,2y)	
Spannweite	25-90 y		29-85 y	
Histologischer Typ				
duktal	90	86	117	70
lobulär	11	10	26	16
andere / nicht bekannt	5	4	24	14
Tumorstadium				
pT1	24	23	38	23
pT2	63	59	112	67
pT3	3	3	5	3
pT4	8	8	8	5
nicht bekannt	8	8	4	2
Grading				
G1	6	6	12	7
G2	56	53	65	39
G3	44	42	84	50
nicht bekannt	0	0	6	4
Nodal-Status				
positiv	25	24	47	28
negativ	75	71	118	71
nicht bekannt	6	6	2	2
Östrogen-Rezeptor-Status (ER)				
positiv	76	72	117	70
negativ	30	28	41	25
nicht bekannt	0	0	9	5
Progesteron-Rezeptor-Status (PR)				
positiv	83	78	99	59
negativ	23	22	59	35
nicht bekannt	0	0	9	5
Therapie				
Adjuvante Chemotherapie	36	34	104	62
Hormon-Behandlung	62	58	91	54
nicht bekannt	11	10	6	4
Follow-up Daten				
Information vorhanden	93	88	165	99
Rezidiv	32	30	54	32
Verstorben (Died of disease)	25	24	41	25
Gesamtzahl	106		167	

3.6.1 Das Adhäsionsmolekül L1CAM

Etliche Studien haben gezeigt, dass das Adhäsionsmolekül L1CAM in verschiedenen Karzinomen mit einer schlechten Prognose einhergeht (THIES ET AL., 2001; FOGEL ET AL., 2003 A UND B; ALLORY ET AL., 2005; SHTUTMAN ET AL., 2006, BOO ET AL., 2007). Bisher ist wenig bekannt, ob auch Mammakarzinome eine Expression von L1CAM aufweisen. Aufgrund der Ergebnisse der cDNA Microarray-Analyse sowie der starken Expression von L1CAM in den Fra-2 transfizierten MDA MB231 Zellen stellte sich die Frage, ob L1CAM im klinischen Material exprimiert wird und ob diese Expression mit klinischen Parametern oder der Prognose assoziiert ist.

3.6.1.1 Western Blot-Analyse von L1CAM an humanen Mammakarzinomen

Für die Western Blot-Analyse wurde ein Kollektiv von 106 Patientinnen (n = 106) herangezogen, die im Zeitraum von 1991 bis 2002 in der Frauenklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt worden sind. Für alle behandelten Fälle lagen Follow-up Daten vor, der mittlere Beobachtungszeitraum betrug 84 Monate (8 – 169 Monate).

Es wurden 20 µg Protein-Lysat der entnommenen Tumore und als Positivkontrolle Zelllysate von L1CAM-positiven Zelllinien FEMX-1 und Hela (THIES ET AL., 2001) eingesetzt.

L1CAM ist ein ca. 200 – 220 kDa schweres Glycoprotein (Typ I) und wird durch die Metalloproteinase ADAM10 (MECHTERSHEIMER ET AL., 2001) in kleinere Fragmente abgebaut, daher variieren die in der Western Blot-Analyse auftretenden Proteinbanden von 140 – 220 kDa. Die Quantifizierung erfolgte durch eine densitometrische Auswertung mittels der verwendeten Positivkontrolle FEMX-1, die aufgrund der extrem starken L1CAM-Expression 1:10 verdünnt eingesetzt wurde.

Wie der Abbildung 3.32 zu entnehmen ist, differierte die L1CAM-Expression in den untersuchten Mammakarzinomen stark, so konnte eine Signalstärke von 0 – 252 % relativ zur Kontrolle detektiert werden, wobei der Mittelwert bei 16,2 % und der Median bei 1,7 % lag. Im Ergebnis exprimierten die Mehrzahl der analysierten Fälle nur sehr gering L1CAM.

ERGEBNISSE

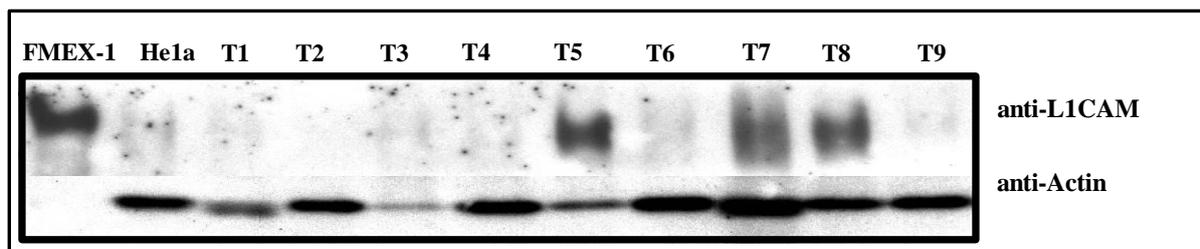


Abbildung 3.32: Western Blot-Analyse von Mammakarzinomen (T1-T9).

Dargestellt ist eine Auswahl von untersuchten Tumoren mit L1CAM-Expression. Es wurden jeweils 20 µg Protein aus dem Zelllysat der Tumore aufgetragen. Konzentrationskontrolle: Actin.

Orientierend an der ungleichmäßigen Verteilung der L1CAM-Expression in dem untersuchten klinischem Material wurde für die statistische Analyse nicht der Medianwert, sondern sog. cut-off von 20 % Expression in Relation zur Kontrolle gewählt und zwei Gruppen gebildet. Die Verteilung der Expressionswerte für L1CAM ist im folgenden Histogramm dargestellt (Abb. 3.33).

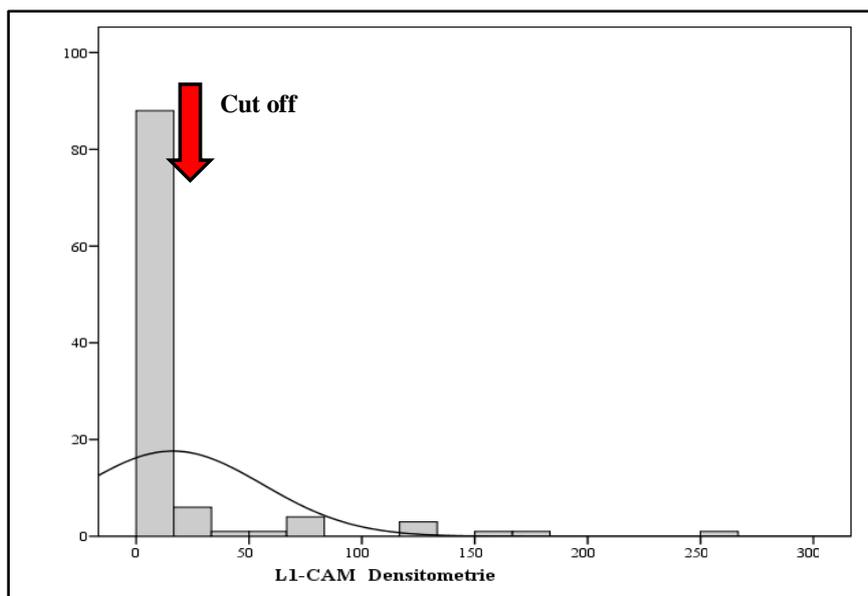


Abbildung 3.33: Histogramm nach densitometrischer Auswertung der L1CAM Expression.

Die erste Gruppe mit sehr geringer oder keiner detektierbaren L1CAM-Expression umfasste 90 Patientinnen (n = 90), 16 Patientinnen, an deren Tumormaterial eine starke L1CAM-Expression zu beobachten war, bildeten die zweite Gruppe (n = 16).

Die folgenden pathologischen und klinischen Parameter wurden für die statistische Analyse herangezogen: Nodal-Status (N0 versus N1), Stadium (T1 versus T2 versus T3/4), Grading (G1 versus G2/3), Östrogen-Rezeptor-Status (ER 0 versus ER 1), Progesteron-Rezeptor-Status (PR 0 versus PR 1), histologischer Typ (lobulär versus duktal) und das Alter (<57 Jahre, > 57 Jahre). Anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Mantel Cox konnten hinsichtlich der

ERGEBNISSE

L1CAM-Expression auf Proteinebene für den Nodalstatus, hohes Grading, fortgeschrittenes Stadium und einem negativen Östrogen-Rezeptor-Status signifikante Korrelationen gefunden werden (Tab.3.6; Abb. 3.34 A–D). Demzufolge waren Tumore mit hoher L1CAM-Expression signifikant häufiger mit einem positiven Lymphknotenbefall, einem niedrigen Differenzierungsgrad (hohes Grading), einem fortgeschrittenen Stadium und einem negativen Östrogenrezeptor-Status assoziiert. Für den histologischen Typ, den Progesteron-Rezeptor-Status sowie für das Alter der Patientinnen konnten keine signifikanten Zusammenhänge erkannt werden.

Tabelle 3.6: Korrelationen der L1CAM-1 Protein-Expression mit verschiedenen pathologischen Parametern.

Parameter	Signifikanz ($p =$)*
Nodalstatus	< 0,001
Grading	< 0,001
Stadium	0,011
Östrogen-Rezeptor-Status	0,037
Progesteron-Rezeptor-Status	> 0,5
Histologischer Typ	> 0,5
Alter	> 0,5

* Signifikante Korrelationen sind fett gekennzeichnet.

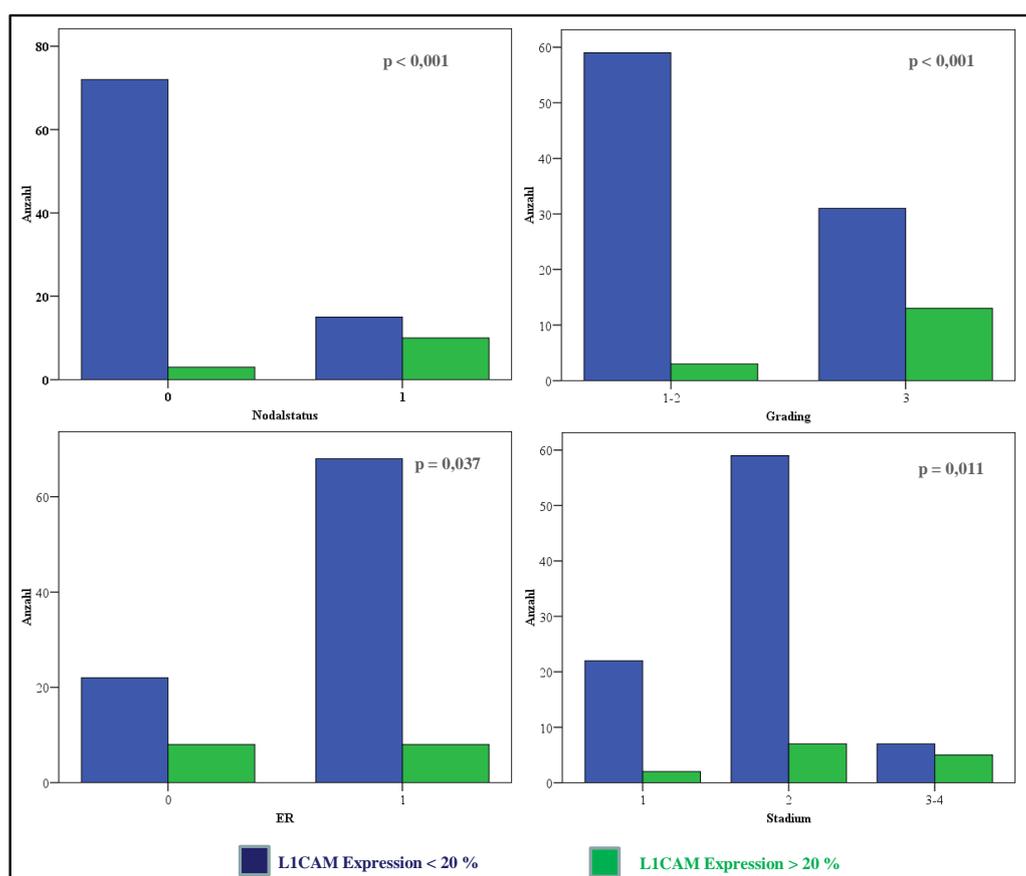


Abbildung 3.34: Korrelationen der L1CAM-Expression zu Prognosemarkern, abgebildet in Balkendiagrammen. Die blauen Balken stellen die Tumore mit einer Expressionsstärke unter 20 % und die grünen Balken die Tumore mit einer Expression über 20 % (relativ zur Kontrolle) dar.

3.6.1.2 Immunhistochemische Untersuchung von L1CAM an klinischem Material

Um das Ergebnis der Western Blot-Analyse zu verifizieren und die Verteilung der L1CAM positiven Zellen in den Tumoren zu untersuchen, wurde L1CAM immunhistochemisch an Paraffinschnitten von acht Mammakarzinomen analysiert. Von diesen acht Tumoren waren wiederum insgesamt fünf Fälle darunter, die in der Western Blot-Analyse eine starke L1CAM-Expression erkennen ließen.

Unter diesen Fällen konnten vier Tumore identifiziert werden, die eine membranöse und schwach zytoplasmatische L1CAM spezifische Färbung vorwiesen. Die Abbildung 3.35 zeigt repräsentativ die L1CAM-Expression an einem schlecht differenzierten duktalem, nodal-negativen Mammakarzinom (pT2) und die L1CAM-Expression an einem mäßig differenzierten duktalem, nodal-positiven Mammakarzinom (pT4) (Abb. 3.35 B). Die Mehrheit der angefärbten Tumorzellen war an der Grenze zum Stroma an der Invasionsfront lokalisiert (Abb. 3.35 A und B).

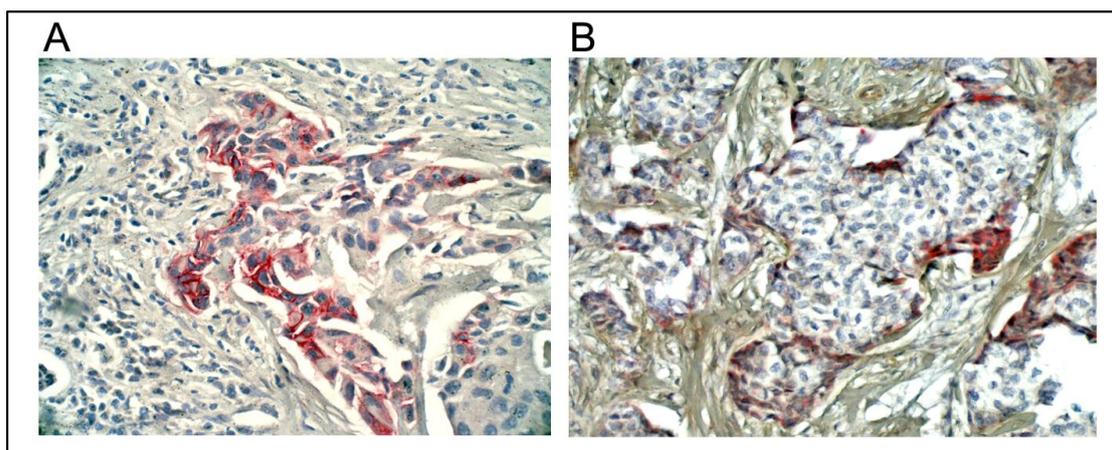


Abbildung 3.35: Immunhistochemische L1CAM-Färbung an zwei Mammakarzinomen.
A: Schlecht differenziertes duktales Karzinom (pT2/N0); **B:** mäßig differenziertes duktales Karzinom (pT4/N1).

3.6.1.3 Genexpressionsstudien von L1CAM an RNA-Daten von klinischem Material

In Anbetracht der Ergebnisse der Western Blot-Analyse wurde zusätzlich die Gen-Expression von L1CAM auf RNA-Ebene untersucht. Zur Verfügung stand ein Kollektiv von 167 Patientinnen (n = 167). Die Genexpressionsanalyse wurde von Dr. Ralph Wirtz von der Firma Siemens Healthcare Diagnostic, Köln durchgeführt. Für die Microarray-Analyse wurde der cDNA Array Humane Genome Gene Chip U133 der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA)

verwendet. Auf diesem Array befanden sich zwei Probesets für L1CAM (204584_ und 204585_). Zu Beginn der statistischen Analyse wurden die Expressionsdaten für beide Probesets mit Hilfe des Pearson-Tests untersucht und es ergab sich, dass beide verwendeten Probesets eng miteinander korrelierten ($p < 0,001$). Da aber das erste Probeset (204584_) einen höheren Expressionslevel (Mittelwert 123 bzw. 25) aufwies, wurde dieses für die statistische Auswertung herangezogen. Die Expressionswerte dieses Probesets (204584_) variierten von 5 – 833,5 (Mittelwert 122,6; Median 96,5). Übereinstimmend mit den Werten der Western Blot-Analyse zeigten auch die Expressionsdaten der Microarray-Analyse eine ungleiche Verteilung.

Für die statistische Auswertung wurde das verwendete Patienten-Kollektiv ($n = 167$) in zwei Gruppen geteilt, wobei nicht der Median, sondern ein cut-off von 200 gewählt wurde (siehe Histogramm Abb. 3.36). Daraus resultierten zwei Gruppen, wobei die erste Gruppe 24 Fälle mit starker L1CAM-Expression ($n = 24$; 14,5 %) und die zweite Gruppe 143 Fälle mit niedriger Expression von L1CAM umfasste ($n = 143$; 85,5 %).

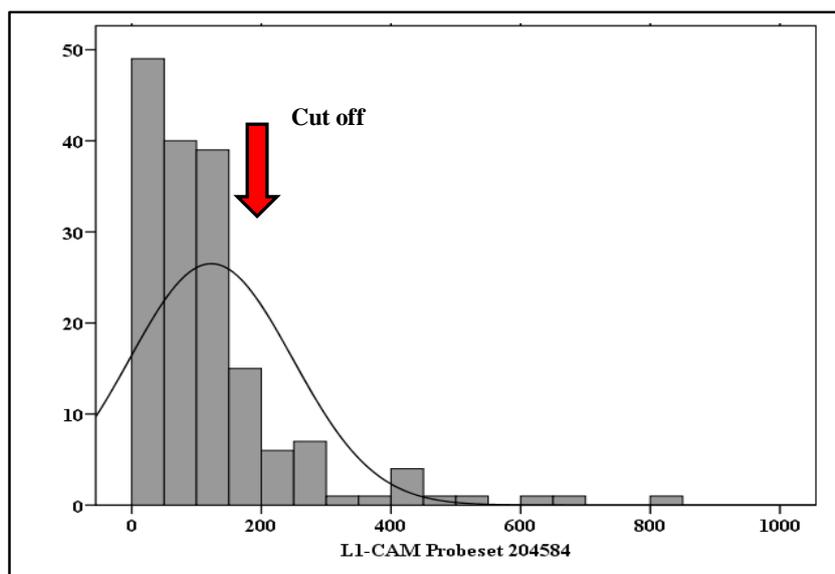


Abbildung 3.36: Histogramm nach Auswertung der L1CAM RNA-Expression.

Anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Mantel Cox wurden die Daten der Expressionsanalyse mit den vorhandenen klinischen Daten des Mammakarzinom-Kollektivs korreliert und auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht.

Für folgende Parameter konnten signifikante Zusammenhänge zur L1CAM-Expression erkannt werden: Nodalstatus, Grading, negativer Östrogen-Rezeptor-Status und Progesteron-Rezeptor-Status. Übereinstimmend zu den Western Blot Ergebnissen waren Tumore mit

ERGEBNISSE

hoher L1CAM- Expression signifikant häufiger mit einem positiven Lymphknotenbefall, einem niedrigen Differenzierungsgrad (hohes Grading) und einem negativen Östrogenrezeptor-Status assoziiert. Keine signifikanten Korrelationen wurden zum Alter und zum Stadium gefunden (Tab. 3.7; Abb. 3.37).

Tabelle 3.7: Korrelationen der L1CAM-1 mRNA-Expression zu verschiedenen pathologischen Parametern.

Pathologischer Parameter	Signifikanz ($p =$) [*]
Nodalstatus	0,003
Grading	0,003
Östrogen-Rezeptor-Status	< 0,001
Progesteron-Rezeptor-Status	0,040
Stadium	0,926
Alter	0,054

* Signifikante Korrelationen sind fett gekennzeichnet.

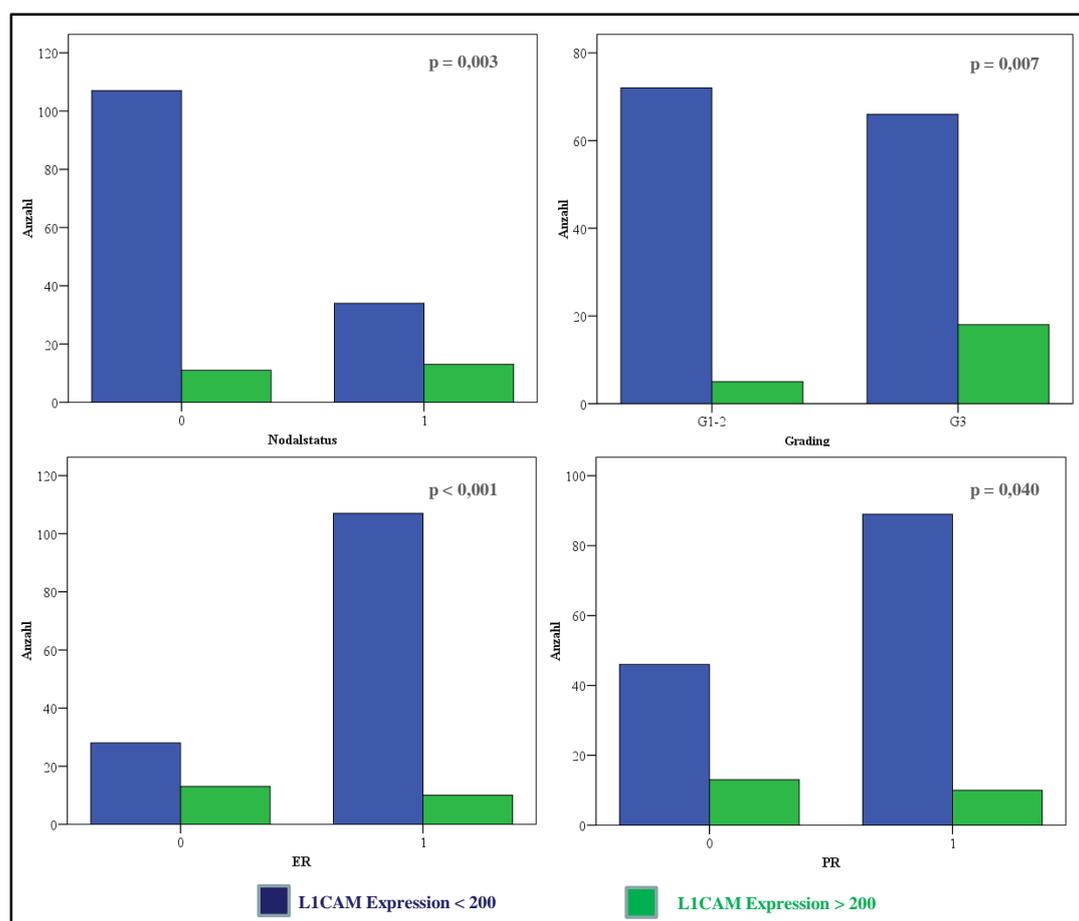


Abbildung 3.37: Korrelationen der L1CAM-Expression zu Prognosemarkern, abgebildet in Balkendiagrammen. Die blauen Balken stellen die Tumore mit einer Expressionsstärke unter 200 und die grünen Balken die Tumore mit einer Expression über 200 dar.

Die Gesamt-Überlebenszeit sowie das rezidivfreie Intervall, beginnend vom Zeitpunkt der Operation, wurde unter Anwendung der Kaplan-Meier Methode geschätzt. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank-Mantel-Cox-Test verglichen. Im Ergebnis zeigten im Hinblick auf das Gesamt-Überleben Patientinnen mit hoher Expression von L1CAM (> 200) eine signifikant ($p = 0,005$) kürzere Überlebenszeit als Patientinnen mit niedriger L1CAM-Expression (Abb. 3.38).

Ein ähnliches Ergebnis wurde im Bezug auf das rezidivfreie Intervall beobachtet. Der Zeitraum zur Rezidiv-Entwicklung ist bei Patientinnen mit hoher L1CAM-Expression wesentlich kürzer.

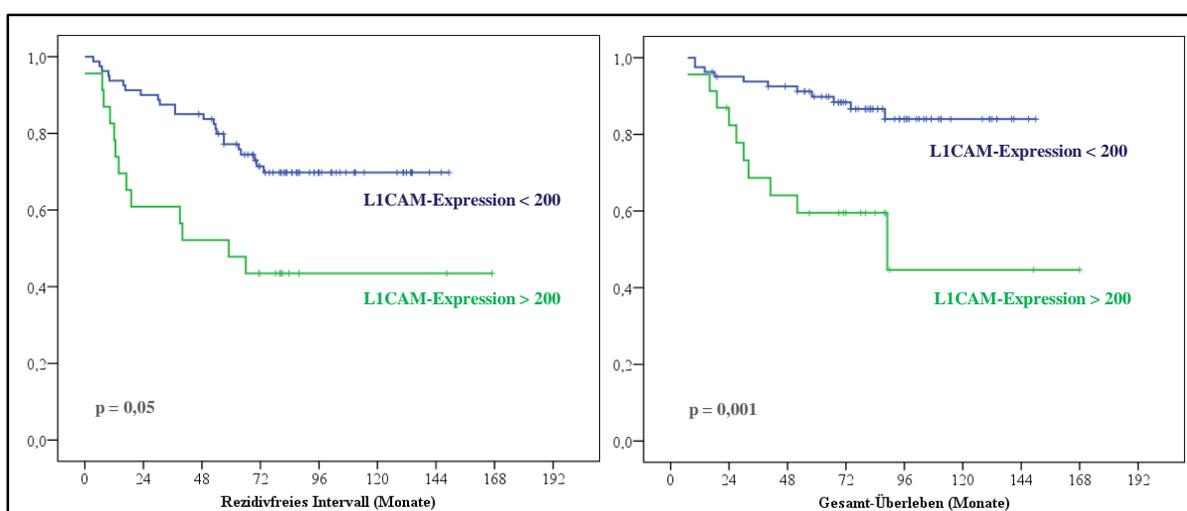


Abbildung 3.38: Kaplan-Meier Überlebenskurven der untersuchten Mammakarzinome anhand von L1CAM mRNA-Daten.

3.6.1.3.1 Multivariate Analyse: Cox-Modell

Um die L1CAM-Expression im Tumormaterial auf die unabhängige prognostische Aussagekraft zu untersuchen, wurde eine multivariate Überlebensanalyse mit dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt. Mit der Cox-Hazard-Funktion werden ein 95 % Konfidenzintervall (CI), der p-Wert und das relative Risiko (HR) errechnet. Die zur Kategorisierung eingesetzten Parameter waren die L1CAM-Expression, Nodalstatus, Stadium, Grading und Östrogen-Rezeptor-Status. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der folgenden Tabelle (Tab. 3.8) dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.8 A: Cox-Regressionsanalyse unter Einbeziehung der L1CAM mRNA Expression und weiterer prognostische Marker wie Nodal-Status, Stadium, Grading und Östrogen-Rezeptor-Status in Hinblick auf das Gesamt-Überleben A).

A) Gesamt-Überleben	HR	95 % CI	Signifikanz (p =)
L1CAM mRNA			
< 200	1		
>/ = 200	2,29	0,99 – 5,29	0,053
Nodalstatus			
negativ	1		
positiv	1,30	0,63 – 2,66	0,481
Stadium			
1-2	1		
3-4	2,47	1,20 – 5,08	0,014
Östrogen-Rezeptor-Status			
negativ	1		
positiv	0,68	0,32 – 1,43	0,306
Grading			
G 1-2	1		
G 3	0,96	0,48 – 1,94	0,911

Fortsetzung Tabelle 3.8 B: Cox-Regressionsanalyse unter Einbeziehung der L1CAM mRNA Expression und weiterer prognostische Marker wie Nodal-Status, Stadium, Grading und Östrogen-Rezeptor-Status in Hinblick auf das rezidivfreie Intervall B).

B) Rezidivfreies-Intervall	HR	95 % CI	Signifikanz (p =)
L1CAM mRNA			
< 200	1		
>/ = 200	1,67	0,81 – 3,47	0,168
Nodalstatus			
negativ	1		
positiv	1,73	0,95 – 3,16	0,073
Stadium			
1 -2	1		
3 - 4	1,29	0,70– 2,38	0,421
Östrogen-Rezeptor-Status			
negativ	1		
positiv	0,77	0,40 – 1,49	0,434
Grading			
G 1-2	1		
G 3	1,70	0,88 – 3,26	0,114

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in Bezug auf das Gesamtüberleben die L1CAM-Expression (p = 0,053) grenzwertig signifikant sowie das Grading (p = 0,014) signifikant als unabhängige Prognosefaktoren angesehen werden könnten. Im rezidivfreien Intervall ist nur dem Nodalstatus (p = 0,073) eine grenzwertige unabhängige Relevanz zuzuordnen und die L1CAM-Expression (p = 0,168) verliert die prognostische Bedeutung.

3.6.1.3.2 Korrelationen der L1CAM mRNA-Expression mit biologisch-relevanten Markern

Anhand der Pearson-Analyse wurden die Daten der mRNA L1CAM-Expression mit mRNA-Daten von klinischen und biologisch-relevanten Markern, die in Zusammenhang mit Tumor-Invasion (uPA, PAI-1 und uPAR) oder Angiogenese (VEGF A-C) stehen, sowie mit den Hormon-Rezeptoren und dem Wachstumsrezeptoren EGFR und Her2/ErbB2 in Beziehung gebracht (Tab.3.9).

Tabelle 3.9: Pearson-Analyse; Korrelationen der L1CAM mRNA Expression mit klinischen bzw. biologisch-relevanten Markern.

Prognostischer Marker	n =	r = *	Signifikanz (p =) *
Östrogen-Rezeptor-Status	114	- 0,383	< 0,001
Progesteron-Rezeptor-Status	114	- 0,244	0,009
Her2/ErbB2	114	0,481	< 0,001
EGFR	114	0,182	0,053
uPAR	114	0,178	0,101
PAI-1	114	0,299	0,005
uPAR	114	0,178	0,058
VEGF-A	114	0,230	0,014
VEGF-B	114	0,199	0,033
VEGF-C	114	0,245	0,009

Inverse Assoziationen sind durch negative r-Werte gekennzeichnet und signifikante Korrelationen mit einem p-Wert < 0,050 sind fett markiert.

Es konnte eine signifikant inverse Korrelation der L1CAM-Expression zum Östrogen-Rezeptor-Status ($p < 0,001$) und Progesteron-Rezeptor-Status ($p = 0,009$) wie schon auf Proteinebene gezeigt, erhalten werden sowie ein signifikanter Zusammenhang von L1CAM zu Her2/ErbB2 ($p < 0,001$), PAI-I ($p = 0,005$) und Mitgliedern der VEGF-Familie VEGF-A ($p = 0,014$); VEGF-B ($p = 0,033$) und VEGF-C ($p = 0,009$) gefunden werden. Die Korrelationen zu anderen erhobenen Parametern erwiesen sich als grenzwertig signifikant (EGFR und PAI-1) oder als nicht signifikant (uPAR). Dies weist daraufhin, dass Tumore mit hoher L1CAM-Expression sich durch relativ hohe Invasivität (Korrelation zu PAI-1 und uPAR), Angiogenese (Korrelation zu VEGF) und möglicherweise aktivierte Signalketten (Korrelation zu Her2, EGFR), jedoch einen Verlust der hormonellen Regulation auszeichnen.

In der Literatur wird L1CAM in erster Linie in neuronalen Zellen exprimiert, darüber hinaus beschreibt HUZAR ET AL., dass in Colorektal-Karzinomen eine positive L1CAM-Färbung der Tumorzellen mit der Expression des neuroendokrinen Markers Chromogranin A korreliert (HUZAR ET AL., 2006). Demzufolge wurde die L1CAM-Expression mit einigen neuroendokrinen Markern wie Synaptophysin, Chromogranin A, Chromogranin B und der Neuron-spezifischen Enolase anhand des Pearson-Tests analysiert. Jedoch konnten keine statistischen Zusammenhänge beobachtet werden (Tab.3.10).

Tabelle 3.10: Pearson-Analyse; Korrelationen der L1CAM mRNA Expression mit neuroendokrinen Markern.

Prognostischer Marker	n =	r = *	Signifikanz (p =) *
Chromogranin A	158	- 0,012	0,880
Chromogranin B	158	0,016	0,840
Synaptophysin	158	0,096	0,231
Neuron-spezifische Enolase	158	-0,015	0,855

Inverse Assoziationen sind durch negative r-Werte gekennzeichnet.

3.6.2 Das Adhäsionsmolekül ICAM-1

In Anbetracht der Ergebnisse der cDNA-Microarray-Analyse, in denen gezeigt werden konnte, dass auch die Regulation des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 im engen Bezug zu Fra-2 steht, sollte der Frage nachgegangen werden, ob ICAM-1 auch in klinischem Tumormaterial exprimiert wird. Hierfür wurde zum einen die Protein-Expression mittels einer Western Blot-Analyse an einem Kollektiv von 106 Patientinnen durchgeführt und zum anderen wurden die Expressionsdaten von 167 Patientinnen anhand von cDNA-Microarrays analysiert.

3.6.2.1 Western Blot-Analyse von ICAM-1 an humanen Mammakarzinomen

Für die Western Blot-Analyse wurden 20 µg Protein-Lysat der entnommenen Tumore gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf ICAM-1 detektiert (Abb. 3.39) und densitometrisch ausgewertet. Als Kontrolle wurde Zelllysat von ICAM-1 positiven Zelllinien FEMX-1 und HeLa verwendet.

Es konnte in den untersuchten Tumoren eine Signalstärke für ICAM-1 von 23 – 629 % in Relation zur Kontrolle detektiert werden, wobei der Mittelwert bei 172,97 % und der Median bei 156,9 % lag.

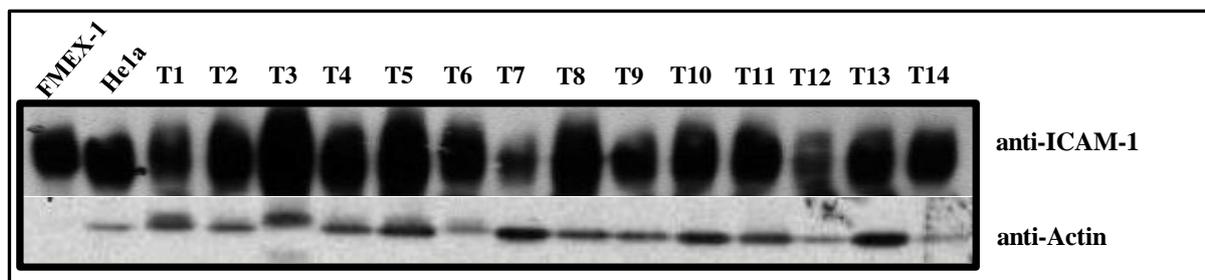


Abbildung 3.39: Western Blot-Analyse von Mammakarzinomen (T1-T9).

Dargestellt ist eine Auswahl von untersuchten Tumoren mit ICAM-1 Expression. Es wurden jeweils 20 µg Protein aus dem Zelllysat der Tumore aufgetragen. Konzentrationskontrolle: Actin.

ERGEBNISSE

Für die statistische Analyse der ICAM-1 Expression in dem Kollektiv (n = 106) wurden zwei gleiche Gruppen gebildet, wobei in der ersten Gruppe die Patientinnen zusammengefasst wurden, in deren Tumormaterial die ICAM-1 Expression unter dem Median (< 156,9 %) war und die zweite Gruppe umfasste die Patientinnen, deren Tumormaterial eine ICAM-1 Expression über dem Median aufwies (siehe Histogramm Abb.3.40).

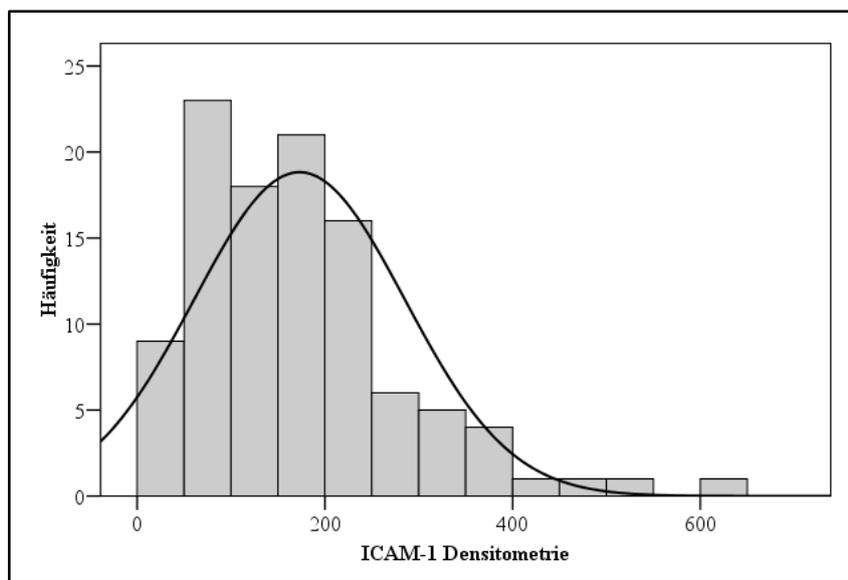


Abbildung 3.40: Histogramm nach densitometrischer Auswertung der ICAM-1 Expression.

Es konnten zu den klinisch-pathologischen Parametern Nodalstatus, Grading und dem Stadium signifikante Korrelationen gefunden werden (Tab. 3.11; Abb. 3.41). Des Weiteren konnte eine Tendenz zu einer inversen Korrelation mit dem Östrogen-Rezeptor-Status festgestellt werden, dagegen für den Progesteron-Rezeptor-Status und den histologischen Typ keine signifikanten Zusammenhänge (Tab.3.11).

Tabelle 3.11: Korrelationen der ICAM-1 Protein-Expression zu verschiedenen pathologischen Parametern.

Pathologischer Parameter	Signifikanz ($p =$)*
Nodalstatus	0,003
Grading	0,002
Stadium	0,002
Östrogen-Rezeptor-Status	0,085
Progesteron-Rezeptor-Status	0,480
Histologischer Typ	0,750
Alter	0,560

* Signifikante Korrelationen sind fett gekennzeichnet.

Demnach waren Tumore mit hoher ICAM-1 Expression mit einem positiven Nodalstatus, einem niedrigen Differenzierungsgrad und fortgeschrittenem Stadium assoziiert.

ERGEBNISSE

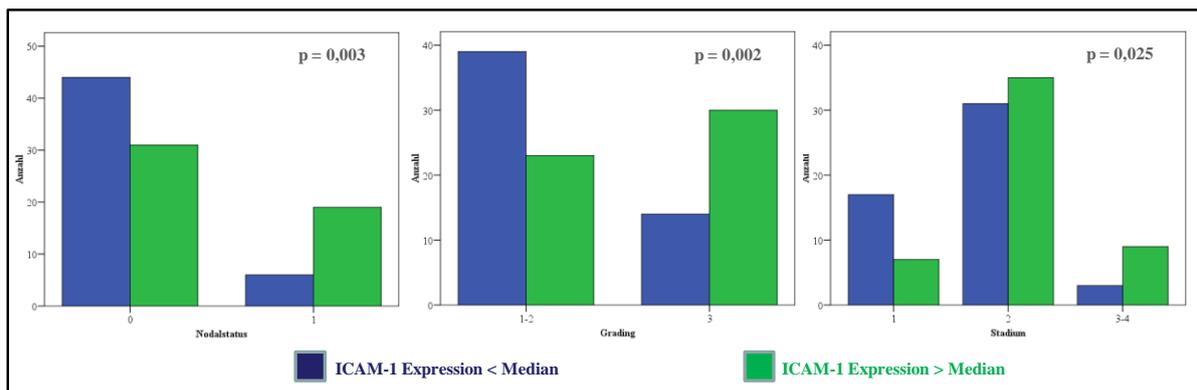


Abbildung 3.41: Korrelationen der ICAM-1 Expression zu Prognosemarkern, abgebildet in Balkendiagrammen. Die blauen Balken stellen die Tumore mit einer Expressionsstärke unter dem Median und die grünen Balken die Tumore mit einer ICAM-1 Expression über dem Median dar.

Ob die ICAM-1 Expression einen Einfluss auf die Gesamt-Überlebenszeit sowie das rezidivfreie Intervall hat und als prognostischer Marker herangezogen werden könnte, wurde unter Anwendung der Kaplan-Meier Methode untersucht. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank-Mantel-Cox-Test verglichen (Abb. 3.42).

Im Hinblick auf das rezidivfreie Intervall konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit hoher Expression von ICAM-1 (> Median) eine kürzere Zeitspanne zum Auftreten eines Rezidivs aufweisen als Patientinnen mit niedriger ICAM-1 Expression ($p = 0,049$). Für das Gesamt-Überleben ist nur die Tendenz zu beobachten, dass die Wahrscheinlichkeit länger zu leben bei Patientinnen mit höherer ICAM-1 Expression niedriger ist. Dies war aber nicht statistisch signifikant ($p = 0,140$).

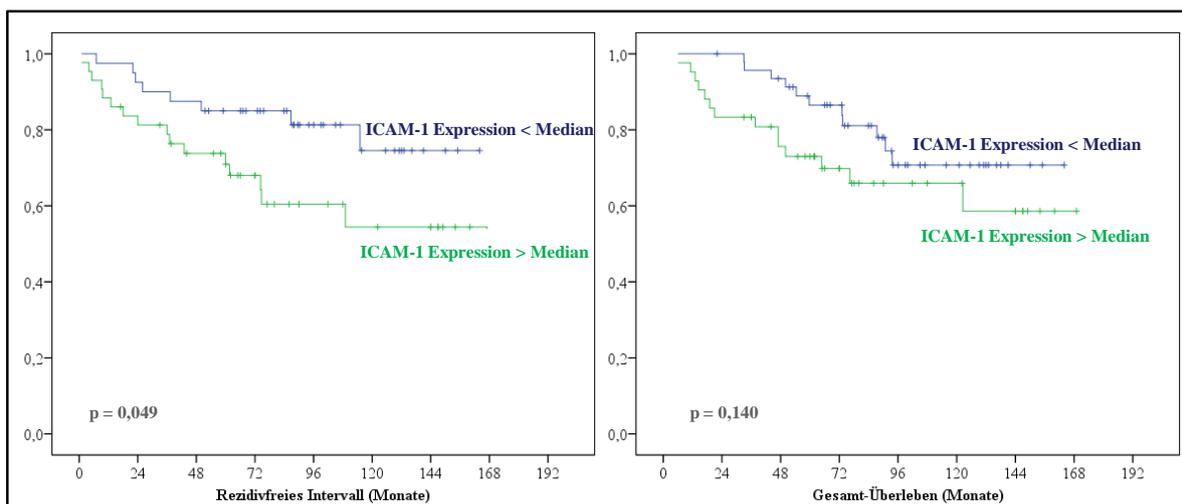


Abbildung 3.42: Kaplan-Meier Überlebenskurven der untersuchten Mammakarzinome anhand der Daten der Protein-Expression.

3.6.2.2 Genexpressionsstudien von ICAM-1 an RNA-Daten von klinischem Material

Die Genexpressionsanalyse von 167 Patientinnen (n = 167) mit dem cDNA-Microchip U133 wurde von Dr. Ralph Wirtz von der Firma Siemens Healthcare Diagnostic, Köln durchgeführt. Auf diesem Array befanden sich drei Probesets für ICAM-1 (215484_, 202638_ und 202637_). Zu Beginn der statistischen Analyse wurden die Expressionsdaten für die drei Probesets mit Hilfe des Pearson-Tests verglichen. Die Analyse ergab, dass die verwendeten Sets signifikant miteinander korrelierten, aber das Probeset 202637_ den höchsten Expressionslevel (Mittelwert 658,61 und Median 498,1) aufwies und daher für die weiteren Analysen zugrunde gelegt wurde.

Für die statistische Auswertung wurde das verwendete Patienten-Kollektiv (n = 167) in zwei gleiche Gruppen geteilt, wobei die erste Gruppe eine ICAM-1mRNA Expression unter dem Median (< 498,1) und die zweite Gruppe eine ICAM-1 mRNA Expression über dem Median (> 498,1) aufwies (siehe Histogramm Abb. 3.43).

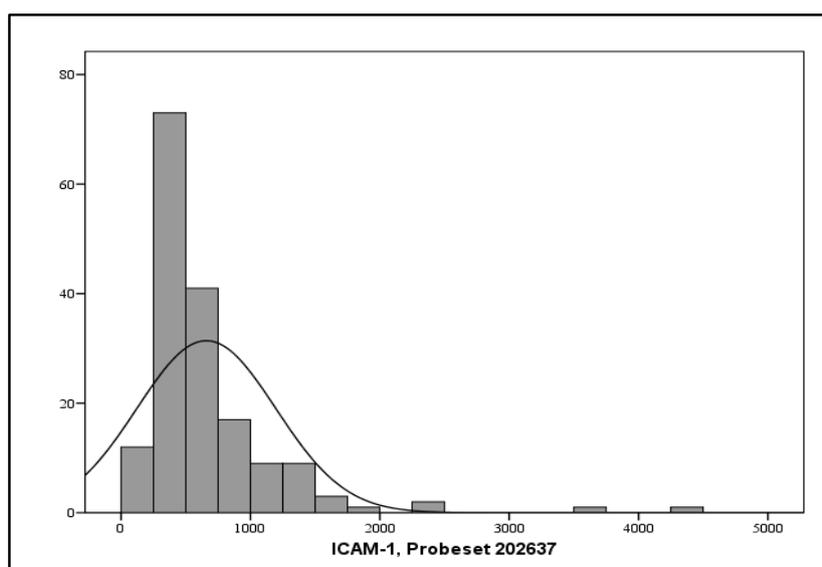


Abbildung 3.43: Histogramm nach Auswertung der ICAM-1 RNA Expression.

Es konnten zu den klinisch-pathologischen Parametern Nodalstatus, Grading dem Östrogen-Rezeptor-Status und dem Alter signifikante Korrelationen gefunden werden (Tab. 3.12; Abb. 3.44), aber keine signifikanten Korrelationen zum Progesteron-Rezeptor-Status, Stadium und histologischen Typ.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.12: Korrelationen der ICAM-1 mRNA-Expression zu verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern.

Pathologischer Parameter	Signifikanz ($p =$)*
Nodalstatus	0,017
Grading	0,009
Östrogen-Rezeptor-Status	0,002
Alter	0,011
Progesteron-Rezeptor-Status	0,111
Histologischer Typ	0,714
Stadium	0,140

* Signifikante Korrelationen sind fett gekennzeichnet.

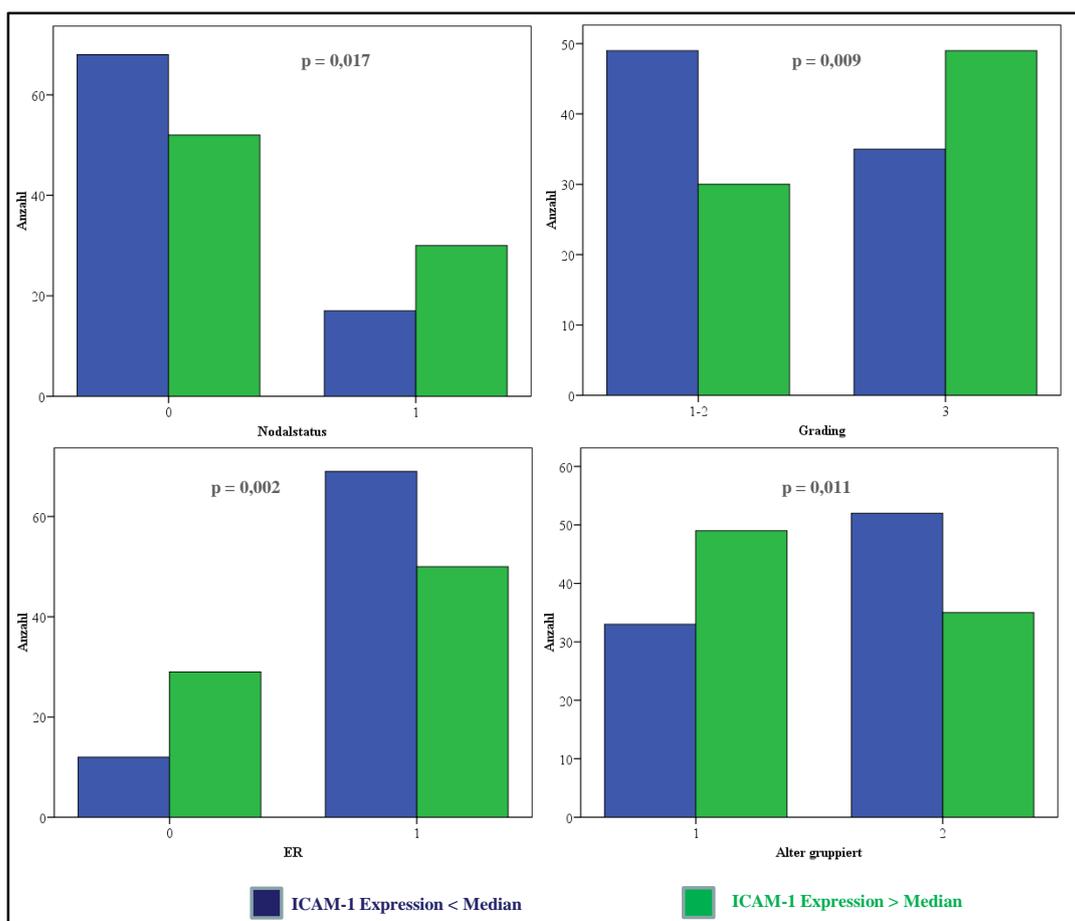


Abbildung 3.44: Korrelationen der ICAM-1-Expression zu Prognosemarkern, abgebildet in Balkendiagrammen. Die blauen Balken stellen die Tumore mit einer Expressionsstärke unter dem Median und die grünen Balken die Tumore mit einer ICAM-1-Expression über dem Median dar.

Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier zeigten keine signifikanten Unterschiede (Gesamt-Überleben: $p = 0,645$ und rezidivfreies Intervall: $p = 0,978$) und auf eine Abbildung der Diagramme wurde verzichtet.

4 Diskussion

Das maligne Mammakarzinom ist in den westlichen Industrienationen die häufigste Krebserkrankung der Frau. Die hohe Mortalität begründet sich daher, dass beim Mammakarzinom auch im Falle einer Diagnose eines lokal begrenzten Primärtumors eine Metastasierung des Tumors nicht ausgeschlossen werden kann. Im Laufe der Jahre sind viele Aspekte der Metastasierung beleuchtet worden, aber dennoch sind die Faktoren, die in diesem komplexen Vorgang essentiell sind, noch nicht hinreichend aufgeklärt (FIDLER, 2003).

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Frage, welche Rolle der Transkriptionsfaktor Fra-2 bei der Metastasierung des Mammakarzinoms einnimmt.

4.1 Expression von Fra-2 im klinischen Material

Die Expression des Transkriptionsfaktors Fra-2 wurde anhand eines Kollektivs von 56 Mammakarzinom-Patientinnen auf proteinbiochemischer Ebene analysiert. Dabei zeigte es sich, dass eine verstärkte Expression von Fra-2 im Hinblick auf die Rezidivhäufigkeit oder auch im Bezug auf die Gesamt-Überlebenszeit der Patientinnen ungünstig assoziiert ist. Erste Untersuchungen an klinischem Tumormaterial in unserer Arbeitsgruppe gaben bereits einen Hinweis darauf, dass ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Fra-2 Expression und dem Auftreten eines Rezidivs bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom besteht (BAMBERGER ET AL., 1999). Fra-2 ist ein Mitglied des AP-1 Komplexes, welcher sich aus nukleären Transkriptionsfaktoren der Fos-, Jun- und ATF-Familie zusammensetzt. Diese Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie angeregt durch externe Stimuli nach Formation von Dimeren verschiedene regulatorische Prozesse in der Zelle aktivieren (ANGEL ET AL., 1987b; LEE ET AL., 1987a; ANGEL UND KARIN ET AL., 1991; KARIN ET AL., 1997). Sie beeinflussen u.a. die Expression von Genen, die in Prozessen der Tumorprogression involviert sind. Aufgrund der Tatsache, dass die AP-1 Mitglieder einen wesentlichen Beitrag in der Onkogenese leisten und die Ergebnisse der Western Blot-Analyse am klinischen Tumormaterial darauf hinweisen, dass eine erhöhte Fra-2 Expression mit einer ungünstigen Prognose korreliert ist, sollte die Funktion von Fra-2 *in vitro* näher charakterisiert werden.

4.2 Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von Fra-2

Transfektion der Zelllinien mit Expressionssystemen für Fra-2

Um die biologische Wirkung von Fra-2 näher zu charakterisieren, wurden zwei humane Mammakarzinom-Zelllinien, die sich hinsichtlich ihres Hormonrezeptor-Status und ihres Wachstumsverhaltens unterschieden, mit Expressionsvektoren für Fra-2 transfiziert. Zunächst wurde ein Tetrazyklin-reguliertes Expressionssystem verwendet, welches erstmals von GOSSEN und BUJARD (1992) beschrieben wurde. In dem verwendeten TetON[®]-System der Firma Clontech (Palo Alto, USA) bindet ein reverser Transaktivator (rtTA) an einem minimalen CMV-Promotor ($P_{\min\text{CMV}}$) mit spezifischen Tet-Operatorsequenzen (tetO) und initiiert die Transkription, wenn ein Induktor (Tetracyclin) an rtTA gebunden ist. Bei Abwesenheit von Doxycyclin ist ein reverser Tet-Repressor (tetR) an das Operon gebunden und das zu untersuchende Gen kann nicht abgelesen werden (GOSSEN ET AL., 1995). Neben Tetrazyclin können auch dessen Derivate, darunter das in dieser Arbeit verwendete Doxycyclin als Induktor fungieren, das in den benötigten Konzentrationen (2 µg/ml) keinen letalen Einfluss auf die Zellen hat (GOSSEN ET AL., 1995; BARON & BUJARD, 2000). Nach MILLS ET AL. (2001) sollte ein solches System beim Einsatz in eukaryotischen Zellen folgende Bedingungen erfüllen:

- eine präzise Regulation ohne Hintergrund-Expression des inserierten Gens
- ein hohes Expressionsniveau des inserierten Gens nach Induktion, um die beabsichtigte physiologische Antwort in den Zellen zu erreichen
- Regulation des Gens nur durch den Induktor (Doxycyclin)
- keine Beeinflussung der Expression endogener Proteine
- reversible Expression des inserierten Gens.

Die Expression von Transgenen über das Tet-System wurde erfolgreich sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Anwendungen beschrieben (RESNITZKY ET AL., 1994; GONZALES ET AL., 2006; POLITI ET AL., 2006) und schien somit für die Untersuchung mit regulierter Fra-2 Expression in den Mammakarzinom-Zelllinien geeignet. Doch im Verlauf der Arbeit zeigte dieses System immer wieder Anfälligkeiten. Zunächst verlief die Transfektion des Regulatorplasmid Teton, welches den Tetracyclin-Repressor (rtetR) und den Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (rtetR) unter der Kontrolle des CMV-Promotors (P_{CMV}) sowie das Neomycin-Resistenz-Gen beinhaltet, in MCF-7 und MDA MB231 Zellen erfolgreich. Um zu überprüfen,

ob eine Integration in das Genom der Zellen sowie die Induzierbarkeit des Tetracyclin-Repressors gewährleistet war, wurden die selektionierten Teton-Klone transient mit dem Vektor pTRE2pur Luc transfiziert. Die nach Zugabe von Doxycyclin detektierte erhöhte Expression des Luciferase-Gens konnte die erfolgreiche Integration des Teton-Vektors in beiden Zelllinien bestätigen. Doch im Gegensatz zu den MCF-7 Zellen konnte bei den MDA MB231 Zellen nur ein Klon mit einer 6,5 fachen Erhöhung der Luciferase-Expression identifiziert werden, während in 46 von 48 selektionierten Klonen die Expressionsrate auch nach Induktion mit Doxycyclin eher niedrig war und diese auch ohne Induktion eine so genannte Basalaktivität des Luciferase-Gens aufwiesen. Die basale Aktivität des Promotors („Leaky Systems“) konnte auch in anderen Studien für andere Transgene gemessen werden (REND AHL ET AL., 1998, BOHL ET AL., 1998; MANO ET AL., 2000). Dennoch wurden für die zweite Transfektion je ein „Masterklon“ ausgesucht und mit dem Vektor pTRE2pur, der neben dem CMV-Minimalpromotor mit den Tetracyclin-responsiven Elementen (TRE) auch die komplette cDNA des Transkriptionsfaktors Fra-2 enthält, transfiziert. Nach einer Western Blot-Analyse wurden pro Zelllinie je zwei Klone mit der höchsten Induzierbarkeit und niedrigsten Basalaktivität ausgewählt, wobei sich für die transfizierten MCF-7 Zellen eine kaum quantitativ erfassbare Basalaktivität in den nicht-induzierten Klonen zeigte. Da sich das Tetracyclin-regulierte System gerade in Bezug auf die Fra-2 Transfektion in den MDA MB231 Zellen nicht als effizient erwies, wurde zusätzlich ein alternatives, nicht-induzierbares Expressionssystem für die Untersuchungen von Fra-2 verwendet.

Die Zelllinien MCF-7 und MDA MB231 wurden hierzu mit dem Vektor pIRES-Fra-2 transfiziert und parallel dazu als Vergleich zu den Untersuchungen zu Fra-2 mit dem Transkriptionsfaktor pIRES-Fra-1. Die stabile Transfektion mit Fra-2 Expressionsvektoren in den MCF-7 Zellen wurde von Stanislava Janke im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt und die stabil transfizierten Zellen wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Untersuchungen zur Bindungsaktivität an die AP-1 Consensussequenz

Als Voraussetzung für die folgenden Untersuchungen wurden die stabil transfizierten Klone zunächst auf ihre Fra-2-Bindungsfähigkeit an die AP-1 Consensus-Sequenz überprüft. Mit Hilfe des TransAM-Assays konnte nachgewiesen werden, dass in den Klonen mit erhöhter Fra-2 Expression eine verstärkte Bindung dieses Transkriptionsfaktors an die AP-1 Consensus-Sequenz erfolgt. Damit konnten diese Klone für die weiteren Experimente eingesetzt werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass in diesen Zelllinien eine

erniedrigte DNA-Bindung von Fra-1 stattfindet, während die Bindung von c-Fos und FosB auf niedrigem Niveau blieb.

Promotorassay zur Analyse eines reprimierenden Effekts von Fra-2 auf Fra-1

Die erniedrigte Bindung von Fra-1 in den Fra-2 überexprimierenden Klonen gab einen Hinweis auf einen möglichen reprimierenden Effekt von Fra-2 auf Fra-1. In einer vorangegangenen Studie von MILDE-LANGOSCH ET AL. konnte nach Fra-2 RNA-Interferenz in einer Western Blot-Analyse eine erhöhte Fra-1 Proteinmenge und bei Fra-1 RNA-Interferenz eine erhöhte Fra-2 Proteinmenge (MILDE-LANGOSCH ET AL., 2008) detektiert werden. Um dieses Indiz weiterzuverfolgen, wurden Reporteranalysen durchgeführt, wobei uns dank einer Kooperation mit Dr. S.P. Reddy (Johns Hopkins University, Baltimore) drei verschiedene Promotorkonstrukte zur Verfügung standen (ADISESHIAH ET AL., 2003). Die Arbeitsgruppe zeigte in Promotor-Analysen an HBE-Zellen (humane Bronchialepithelial-Zellen), dass vorrangig drei *cis*-aktive Elemente wie EBS („*Ets-like binding site*“), GC-Box und TRE, die in der Region -379/-283 des Fra-1 Promotors liegen, essentiell für die TPA-induzierte Expression von Fra-1 sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Aktivierung der Transkription kooperierende Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren des AP-1 Komplexes obligatorisch sind. So führte eine Coexpression von Fra-2 (neben c-Jun und Jun D) zu einer verstärkten Transkription des Fra-1 Gens, was vermuten lässt, dass Fra-1 unter der Kontrolle von Fra-2 steht.

In einer Untersuchung an murinen embryonalen Fibroblasten wurde beobachtet, dass ein Verlust von c-Fos die serum-stimulierte Fra-1 Transkription verzögert, aber nicht vollständig verhindert, was vermuten lässt, dass andere Transkriptionsfaktoren wie z. B. Fra-2 in der Lage sind, das fehlende c-Fos bei der Regulation der Fra-1 Transkription zu kompensieren (BRUSSELBACH ET AL., 1995; SCHREIBER ET AL., 1997).

TULCHINSKY ET AL. postulierten im Jahre 2000, dass Fra-1 und Fra-2 im Gegensatz zu c-Fos und FosB keine Transaktivierungsdomänen besitzen und daher nicht in der Lage sind, artifizielle Promotoren mit AP-1 Bindungsstellen zu transaktivieren (TULCHINSKY ET AL., 2000), dennoch scheinen Fra-1 und Fra-2 einen bisher ungeklärten Mechanismus zu besitzen, der eine differentielle Regulation ohne diese Domänen ermöglicht.

Das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis des Reporterassays mit den Fra-1 Promotorkonstrukten ergab für die MCF-7 Zellen, dass die Aktivität des 283-luc Fragmentes durch Fra-2 signifikant erniedrigt, jedoch durch c-Fos erhöht wurde. Ein ebenfalls reprimierender Effekt

durch Fra-2 konnte auch beim 379-luc Fragmentes detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von ADISESHAI AH ET AL. nicht überein, sie haben in ihrer Studie dargelegt, dass eine Coexpression von Fra-2 zu einer verstärkten Transkription des Fra-1 Gens führt.

ADISESHAI AH ET AL. konnten nachweisen, dass die Region zwischen -283 und -105 für die basale Expression von Fra-1 verantwortlich ist. Ebenso erwies sich die Region um -379 bis -283 als essentiell für eine verstärkte TPA-induzierbare Fra-1 Transkription, da sich in diesem Bereich wichtige *cis*-aktive Elemente, die für die Minimal-, Basal- und TPA-induzierte Expression von Fra-1 notwendig sind, befinden. Durch die Coexpression mit Fra-2 könnte es in den Mammakarzinomzellen zu einer veränderten Regulation der AP-1 Untereinheiten kommen, da Fra-1 nicht wie in den HBE-Zellen verstärkt transkribiert wird, sondern durch Fra-2 reprimiert wird. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass in unterschiedlichen Zellsystemen die Regulation der AP-1 Untereinheiten divergent abläuft.

Analyse zur Proliferation

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die biologische Wirkung von Fra-2 in Mammakarzinomzellen weiter aufgeklärt werden. Die Mitglieder der AP-1 Familie sind in Prozessen wie dem Zell-Zyklus involviert. Der Einfluss auf die Proliferation kann durch ihre Fähigkeit, die Expression von Faktoren des Zellzyklus zu regulieren, bestimmt sein. Eine ausführliche Studie über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Fos- und Jun-Familie und einigen Zellzyklus-Regulatoren (wie z. B. Rb, p16, p21, p27, Cyclin D1, Cyclin E und Ki67) in Mammakarzinomgeweben sowie in vier verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien ergab positive Korrelationen von Fra-1 mit p16, Cyclin E und dem Proliferationsmarker Ki67 und positive Korrelationen von Fra-2 mit Cyclin E und Cyclin D (MILDE-LANGOSCH ET AL., 2000). Der Zusammenhang zwischen Fra-1 und Fra-2 mit Cyclin E war nicht erwartet, da Cyclin E im Gegensatz zu Cyclin D1 keine TRE-Bindungsdomäne in der Promotorregion aufweist. Eine Überexpression der Zellzyklus-Regulatoren Cyclin E und D1 ist für Patientinnen mit Mamma-, Ösophagus-, Kolon- und Pancreaskarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert (NAITOH ET AL., 1995; HALL & PETERS, 1996; MCINTOSH ET AL., 1995; MAEDA ET AL., 1998; GANSAUGE ET AL., 1997; KORNMAN ET AL., 1998b). Während nach verminderter Expression von Fra-1 in MCF-7 und MDA MB231 Zellen eine reduzierte Proliferation zu beobachten war (BELGUISE ET AL., 2005), liegen für Fra-2 diesbezüglich noch wenige Daten vor.

Es stellte sich daher die Frage, inwieweit Fra-2 einen Effekt auf das Proliferationsverhalten von Mammakarzinom-Zellen ausübt. In den durchgeführten Untersuchungen konnte in allen stabil mit Fra-2 oder Fra-1 transfizierten Klonen keine Veränderung der Proliferation festgestellt werden. BELGUISE ET AL. (2005) publizierten, dass eine Überexpression von Fra-1 in MCF-7 Zellen zu einer erhöhten Zell-Proliferation und Zell-Motilität führt, und durch RNA Interferenz von Fra-1 wurden diese beiden Parameter in MDA MB231 Zellen erniedrigt. Dass in unseren Experimenten für Fra-1 kein proliferationsfördernder Effekt beobachtet wurde, wie von BELGUISE ET AL. gezeigt, könnte daran liegen, dass serumsupplementiertes Medium verwendet wurde und nicht wie von BELGUISE ET AL. serumfreies Medium, da das eher ein artifizielles System darstellt. In Colonkarzinom-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Fra-1 keine Auswirkung auf die Zell-Proliferation hat (VIAL ET AL., 2003).

Analysen zur Invasivität und Motilität

Zusätzlich zur Proliferation wurden die transfizierten Zelllinien auf ihr invasives Verhalten untersucht. Ein wesentlicher Faktor bei der Metastasierung ist die Fähigkeit der Tumorzellen, über Gewebegrenzen hinweg invasiv in den Blutkreislauf und in die umliegenden Organe einzuwandern. Für diesen Prozess müssen die Zellen in der Lage sein, Komponenten der Basalmembran und der extrazellulären Matrix zu degradieren. Durch die Verwendung eines Invasionsassay mit einem Basalmembran-ähnlichen Matrigel wurden die mit Fra-2 und Fra-1 transfizierten MCF-7 und MDA MB231 Zellen auf ihr invasives Potential sowie ihre Motilität analysiert. Zunächst wurden die induzierbaren Teton-Fra-2 Zellen untersucht. Es konnte sowohl für die MCF-7-Teton als auch für die MDA MB231-Teton Zellen nach Zugabe von Doxycyclin eine erhöhte Transmigration durch die Matrigel-Matrix nachgewiesen werden. Aber aufgrund der hohen Schwankungsbreite zwischen den Wiederholungsexperimenten bei den MDA MB231-Teton Zellen, waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Hier zeigte sich außerdem schon nach Induktion der Kontroll-Klone, dass eine erhöhte Anzahl von Zellen durch das Matrigel gewandert ist. Vor diesem Hintergrund ist das Ergebnis bezüglich der MDA MB231-Teton Fra-2 Zellen eher auf einen durch das Doxycyclin hervorgerufenen Effekt zurückzuführen, während solche methodischen Probleme bei den MCF-7-Teton Klonen nicht auftraten.

Die mit den nicht-induzierbaren Expressionsvektoren pIRES-Fra-2 bzw. pIRES-Fra-1 transfizierten Zellen wiesen eine eindeutige Steigerung der Invasivität der Zellen auf. Diese Resultate deckten sich mit Daten aus anderen Studien. So konnte BELGUISE ET AL. (2005) in

Fra-1 transfizierten MCF-7 Zellen ebenfalls eine Zunahme der Invasivität feststellen. In einer Arbeit von MILDE-LANGOSCH ET AL. (2008) konnte dargelegt werden, dass sowohl Fra-2 als auch Fra-1 einen maßgeblichen Einfluss auf das invasive Potential in MDA MB231 und MCF-7 Zellen ausübt. Es konnte durch Verwendung von siRNA für die beiden Transkriptionsfaktoren in MDA MB231 Zellen eine deutliche Verminderung des invasiven Verhaltens demonstriert werden.

Eine erhöhte Motilität zeigten in dieser Arbeit nur die MCF-7-pIRES Fra-1 Zellen, die anderen untersuchten Zelllinien wiesen keine gesteigerte Motilität auf. Die durch Fra-1 hervorgerufene Motilitätssteigerung in MCF-7 Zellen wurde ebenfalls von BELGUISE ET AL. (2005) und auch in murinen Adenokarzinomzellen (CSML0) von KUSTIKOVA ET AL. (1998) beobachtet. Um die für die veränderte Motilität verantwortliche Region des Fra-1 Proteins zu identifizieren, wurden Fra-1 Konstrukte generiert, die zum einen eine fehlende N-terminale Domäne und zum anderen eine fehlende C-terminale Domäne beinhalteten. Dabei konnten TKACH ET AL. (2003) darlegen, dass die N-terminale Domäne einen entscheidenden Einfluss auf die erhöhte Motilität ausübt. Des Weiteren konnte in dieser Studie dokumentiert werden, dass nicht nur Fra-1, sondern auch Fra-2 am veränderten Migrationsverhalten von Zellen beteiligt sein kann. Dieses wurde aber nur in der Fra-1 und Fra-2 positiven murinen Fibroblasten Zelllinie L929 mittels transienter Inhibition beider Faktoren jeweils durch Antisense-Konstrukte demonstriert, was in beiden Fällen zu reduzierter Motilität der Zellen führte (TKACH ET AL., 2003). In einem weiteren Experiment dieser Studie konnte nur für Fra-1 ein motilitätsfördernder Effekt beobachtet werden, denn in der Fra-1 sowie Fra-2 negativen Zelllinie CSML0, wiesen nur die mit Fra-1 und nicht die mit Fra-2 transfizierten Zellen eine erhöhte Motilität auf.

Die Tatsache, dass Fra-1 und auch Fra-2 in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Effekte auf die Zell-Motilität ausüben, könnte daran liegen, dass diese Proteine mit verschiedenen Mitgliedern der AP-1 Familie dimerisieren und an die Enhancer verschiedener Zielgene binden (TKACH ET AL., 2003).

4.3 Analyse Fra-2 regulierter Zielgene

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate sowie die vorangegangenen Studien weisen darauf hin, dass Fra-2, ähnlich wie schon für Fra-1 beschrieben (BELGUISE ET AL., 2005), in der Regulation von Invasion und damit auch Metastasierung beteiligt ist und zur

Ausbildung eines aggressiven Phänotyps beim Mammakarzinom beiträgt. Um diese Hypothese mit weiteren Daten zu untermauern, wurden die mit Fra-2 transfizierten Zellen einer Microarray-basierten Gen-Expressionsanalyse unterzogen, die einen genaueren Aufschluss über die durch Fra-2 regulierten Gene liefern sollte. Der Prozess der Tumorprogression impliziert die Veränderung der Expression vieler beteiligter Gene und daher bietet die Verwendung eines cDNA Array Chip (Human Genome U133 Plus 2.0; Affymetrix) mit ca. 47000 Transkripten von 39500 Genen ein breites Spektrum, um die Expressionsdaten entsprechender involvierter Gene zu erfassen.

Anhand des im Ergebnisteil beschriebenen Auswertungsschemas konnte für die untersuchten Zelllinien eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die einer differentiellen Regulation durch Fra-2 bzw. Fra-1 unterliegen. Um einen Überblick zu erhalten, erfolgte eine Einordnung der Gene in Funktionsklassen. Es zeigte sich, dass die Transkriptionsfaktoren Fra-2 und Fra-1 in verschiedenen Prozessen beteiligt sind. Da in dieser Arbeit vorrangig die Rolle von Fra-2 hinsichtlich des Metastasierungsprozesses von Interesse war und in den funktionellen Untersuchungen demonstriert wurde, dass Fra-2 einen Einfluss auf das invasive Verhalten von Zellen hat, wurde ein spezielles Augenmerk auf die Gruppe von Genen gelegt, die in diese Prozesse involviert sind. Hauptmerkmal invasiver Tumorzellen ist es, dass diese Zellen spezielle Eigenschaften aufweisen, um sich aus dem Primärtumorverband zu lösen. Daher müssen sie in der Lage sein, eigene oder fremde Adhäsionsmoleküle zu modifizieren. Adhäsionsmoleküle sind für die notwendigen Interaktionen zwischen Tumorzellen untereinander, zwischen Tumorzellen und Stromazellen, Endothelzellen, dem intestinalen Stroma und der Basalmembran verantwortlich. Des Weiteren müssen Tumorzellen zur Proteolyse fähig sein, um die Basalmembran abzubauen. Für die Proteolyse produzieren Tumorzellen entweder selbst Proteasen, stimulieren umgebende Zellen dazu oder sie erzeugen Faktoren, welche lokal vorhandene Proteasen aktivieren (PRICE ET AL., 1997). Die wichtigsten Proteasen, die mit einer verstärkten proteolytischen Aktivität bei der Tumorprogression in Zusammenhang gebracht werden und daher als tumorassoziiert werden, sind die Matrix-Metalloproteasen (MMPs), das Plasminogen-Aktivator-System (uPA-System) und Cysteinproteasen (SATO ET AL., 2002). Im Focus der Microanalysen lag daher, Gene zu ermitteln, die in dem Prozess der Zell-Adhäsion oder der Proteolyse involviert sind.

Die Gruppe der Proteasen, die einer Regulation durch Fra-2 unterliegen, war entgegen den Erwartungen verhältnismäßig klein und es ergab sich nur ein kleiner Anteil an Vertretern der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und der Cysteinproteasen (u.a. Cathepsine) (siehe Tab. 3.1).

Es wurden sowohl in den MDA MB231-pIRES Fra-2 als auch in den MCF-7-Tet-on Fra-2 Zellen einige Mitglieder der ADAM-Metallopeptidasen-Familie (ADAM9 und ADAMTS12) sowie der Cathepsine (Cathepsin D) gefunden, die durch Fra-2 hochreguliert wurden. Cathepsin D ist eine ubiquitäre, lysosomale Aspartat-Endoproteinase (BARRETT, 1970) und wird als Mitogen für Tumorzellen, Stimulator der Metastasierung und als Angiogenese-Förderer beschrieben (GARCIA ET AL., 2008; LIAUDET-COOPMANN ET AL., 2006; BERCHEM ET AL., 2002).

Die Protein-Familie der ADAMs zählt zu den Metalloproteasen und besitzt bei über der Hälfte der Mitglieder das auf für MMPs typische katalytische Zink-Bindungsmotiv (JIA ET AL., 1996). Die Bezeichnung ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) spiegelt die Schlüsselposition dieser Proteinfamilie wieder. Sie bildet eine Gruppe von membranständigen Glycoproteinen, deren charakteristische Domänenstruktur u.a. eine Metalloprotease-Domäne und eine Disintegrin-Domäne umfasst. Die Metalloprotease-Domäne erfüllt proteolytische Aufgaben, wohingegen die Disintegrin-Domäne Adhäsionseigenschaften vermittelt (WOLFSBERG ET AL., 1995).

Einen wesentlich größeren Anteil nach Auswertung der Microarray-Daten stellte die Gruppe der Adhäsionsmoleküle dar (siehe Tab. 3.2). Ihnen kommt im Metastasierungsprozess eine ganz zentrale Bedeutung zu, da im initialen Schritt der Invasion eine Ablösung der Tumorzellen vom Primärtumorverband und somit eine Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion essentiell ist. Auch bei der Extravasation ist eine Beteiligung von Adhäsionsmolekülen Voraussetzung für eine erfolgreiche Anheftung der Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix und das Endothel. Einige dieser durch Fra-2 und auch Fra-1 regulierten Gene wurden mit besonderem Interesse betrachtet und ihre Expression auf proteinbiochemischer Ebene validiert, wobei aber der Schwerpunkt auf den durch Fra-2 regulierten Molekülen lag. Im folgenden Absatz wird auf zwei Zelladhäsionsmoleküle, die anhand der Mikroarray-Analysen identifiziert und auf proteinbiochemischer Ebene validiert worden sind näher eingegangen.

L1CAM

Anhand Microarray-Analyse der Zellen wurde als potentielles Target von Fra-2 das Zelladhäsionsmolekül L1CAM identifiziert. L1CAM ist das namensgebende Gründungsmitglied der vier Mitglieder umfassenden L1-Unterfamilie der Immunglobulin-Superfamilie. Allen L1-Mitgliedern gemeinsam ist die Beteiligung an der Entwicklung des Nervensystems und ihre Funktion besteht allgemein gefasst in der Vermittlung von Zell-

Zellkontakten, Zellmigration, axonalem Wachstum und axonaler Wegfindung (BRÜMMENDORF, 1998; BRÜMMENDORF & RATHJEN, 1996).

Die L1-Mitglieder werden aber auch von einigen nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert, so wurde für L1CAM und NrCAM eine Expression in metastasierten Karzinomzellen nachgewiesen (PRIMIANO ET AL., 2003; CONACCI-SORRELL ET AL., 2002). Daneben konnten weitere Studien belegen, dass L1CAM auch auf unterschiedlichen Tumorentitäten wie Melanomen, Neuroblastomen, Gliomen, Bronchial-, Nierenzell- und Pankreaskarzinomen sowie gastrointestinalen und kolorektalen Tumoren exprimiert wird und mit einer schlechten Prognose einhergeht (THIES ET AL., 2002; ALLORY ET AL., 2005; BOO ET AL., 2007; FOGEL ET AL., 2003b; GAVERT ET AL., 2005; KAIFI ET AL., 2006b, 2007; MELI ET AL., 1999; SENNER ET AL., 2002).

L1CAM weist wie einige weitere Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie neben homophilen auch heterophile Bindungseigenschaften auf (LEMMON ET AL., 1989; FELDING-HABERMANN ET AL., 1997; RUPPERT ET AL., 1995). Einige Liganden, die über eine heterophile Bindung mit L1CAM interagieren, sind z. B. das F3/F11/Contactin (BRÜMMENDORF ET AL., 1993), TAG-1/Axonin-1 (KUHN ET AL., 1991; KUNZ ET AL., 1996 UND 2002), die Proteoglycane Neurocan und Phosphacan (MILEV ET AL. 1994; FRIEDLANDER ET AL., 1994) NCAM (HORSTKOTTE ET AL., 1993), CD24 (KADMON ET AL., 1995) und Laminin (GRUMET ET AL., 1993). Außerdem befindet sich in der 6.Ig Domäne eine RGD-(Arg-Gly-Asp-) Sequenz, die mit einigen Integrinen wie z. B. dem Fibronectin-Rezeptor ($\alpha_5\beta_1$) und dem Vitronectin-Rezeptor ($\alpha_v\beta_3$) Bindungen eingeht (RUPPERT ET AL., 1995; EBELING ET AL., 1996; MONTGOMERY ET AL., 1996; FELDING-HABERMANN ET AL., 1997).

Die Bedeutung von L1CAM in Mammakarzinomen ist bisher noch unklar, in einer immunhistochemischen Studie von 25 duktalem Mammakarzinomen konnte HUSZAR ET AL. (2006) für L1CAM keine Expression zeigen.

ICAM-1

Als ein weiteres bemerkenswertes durch Fra-2 reguliertes Zielgen, konnte das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 anhand der Mikroarray-Analyse identifiziert sowie auf proteinbiochemischer Ebene durch Western Blot-Analysen und FACS bestätigt werden. ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Viele verschiedene zellassoziierte und lösliche Liganden binden an diesen Zelladhäsionsrezeptor, wobei die meist beschriebenen Liganden die membrangebundenen β_2 -Integrine LFA-1 (CD11a/CD18 oder $\alpha_L\beta_2$) und MAC-1 (CD11b/CD18 oder $\alpha_M\beta_2$) sind.

LFA-1 (*leukocyte function associated molecule-1*) wird vornehmlich auf Leukozyten exprimiert, wohingegen MAC-1 (*membrane attach complex-1*) hauptsächlich auf Makrophagen, Monozyten und Granulozyten gefunden wird (HAMACHER & SCHABERG, 1994). Weitere bekannte Liganden für ICAM-1 sind Sialophorin (CD43), das auf Leukozyten und Thrombozyten vorkommt, das lösliche Molekül Fibrinogen sowie vermutlich Hyaluronsäure (VAN DE STOLPE & VAN DER SAAG, 1996). Ob Hyaluronsäure als Ligand für ICAM-1 fungiert, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. MCCOURT & GUSTAFSON (1997) postulierten, dass sowohl ICAM-1 als auch Hyaluronsäure unspezifisch an Hexamethylengruppen binden, die Bindungsgrundlage der Affinitätschromatographie für den Nachweis von ICAM-1 als Hyaluronsäure-Rezeptor waren. Im Gegenzug beschrieben HIRAMITSU ET AL. (2006) ICAM-1 als funktionalen Rezeptor für Hyaluronsäure in RS-Fibroblasten (*rheumatoid synovial fibroblasts*). Hyaluronsäure ist ein ubiquitäres Glycosaminoglykan der extrazellulären Matrix und beeinflusst die Zell-Zelladhäsion, die räumliche Orientierung und Wanderung von Zellen sowie deren Proliferation und Differenzierung (LAURENT & FRASER, 1992). Dementsprechend ist die Hyaluronsäure an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt wie der Angiogenese oder der Migration von Tumorzellen (WEST ET AL., 1985; TURLEY ET AL., 1993; MASELLIS-SMITH ET AL., 1996). In Tumoren wie z. B. Mammakarzinomen wird oftmals eine verstärkte Hyaluronsäure-Syntheserate bzw. ein erhöhter Gehalt an Hyaluronsäure gefunden und dieses korreliert häufig mit einer erhöhten Invasivität (DE LA TORRE ET AL., 1993; TOOLE ET AL., 1979). Es wird vermutet, dass die Funktion von Hyaluronsäure maßgeblich durch die Interaktion mit extrazellulären Hyaluronsäure-bindenden Proteinen oder Hyaluronsäure-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wie z. B. ICAM-1 vermittelt wird (LAURENT & FRASER, 1992).

Analyse zur Expression der Adhäsionsmoleküle L1CAM und ICAM-1 in klinischem Material

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels cDNA-Mikroarrays sowie der Validierung anhand der FACS-Analyse weisen darauf hin, dass die Adhäsionsmoleküle L1CAM und ICAM-1 einen Einfluss auf Mammakarzinom-Zellen haben. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit noch weiter bestätigt werden, indem die L1CAM und ICAM-1 Expression an klinischem Tumormaterial auf proteinbiochemischer Ebene sowie anhand von cDNA-Arrays analysiert wurde.

L1CAM Expression in klinischem Tumormaterial

Durch die Western Blot-Analyse von 106 Mammakarzinomen konnte festgestellt werden, dass nur ca. 15 % der untersuchten Tumore eine hohe L1CAM-Expression aufwiesen. Diese zeigten jedoch nach statistischer Auswertung, dass sie signifikant häufiger mit einem positiven Lymphknotenbefall, einem hohen Grading (schlecht differenzierte Tumore), einem fortgeschrittenen Stadium sowie einem negativen Östrogen-Rezeptorstatus assoziiert sind. Daraus resultierte, dass eine hohe L1CAM Expression in Mammakarzinomen für die betroffenen Patientinnen eher mit einer ungünstigen Prognose einhergeht. Eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier konnte anhand der Protein-Expressionsdaten nicht erstellt werden. Diese konnte aber anhand der Gen-Expressionsanalyse, in der die RNA-Daten von 167 Patientinnen bezogen auf die L1CAM Expression analysiert wurde, erstellt werden. Nachdem auch hier signifikante Korrelationen zum positiven Nodalstatus, Grading und einem negativen Östrogen-Rezeptor-Status gefunden wurden, wurde in Hinblick darauf, ob die L1CAM mRNA-Expression in den Tumoren als prädiktiver Marker herangezogen werden kann, die Überlebenskurven erstellt.

Es zeigte sich für das rezidivfreie Intervall sowie das Gesamt-Überleben, dass bei hoher L1CAM Expression die Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs bzw. bis zum Versterben der Patientinnen signifikant kürzer ist, als bei niedriger L1CAM Expression in den Tumoren.

Eine anschließende Cox-Regressionsanalyse, die L1CAM als prognostisch unabhängigen Marker identifizieren sollte, war jedoch nur im Bezug auf das Gesamt-Überleben für die L1CAM Expression eine grenzwertig ($p = 0,053$) und für das Stadium ($p = 0,014$) signifikant. Auf RNA-Basis konnte das Ergebnis der vorangegangenen Protein-Analyse für L1CAM bestätigt werden, es kann von einer schlechten Prognose für die Patientinnen ausgegangen werden, deren Tumore eine hohe L1CAM Expression aufweisen. In einer weiteren Analyse wurden die RNA-Daten herangezogen, um die L1CAM Expression mit biologisch-relevanten Prognosemarkern zu korrelieren. Die Pearson-Analyse bestätigte die inverse Korrelation zum Östrogen-Rezeptorstatus und ergab signifikante Assoziationen von L1CAM zu Her2/ErbB2, PAI-I und Mitgliedern der VEGF-Familie (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C). Diese Korrelation zu dem tumorassoziierten Urokinaserezeptor uPAR und dem Inhibitor PAI-I deutet darauf hin, dass sich Tumore mit hoher L1CAM-Expression durch einen invasiven Phänotyp durch die auszeichnen. Diese beiden Faktoren tragen zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen bei. Verschiedene Studien belegten, dass hohe Konzentrationen von uPA und PAI-1 im Primärtumor mit einem erhöhtem Metastasierungsrisiko und einem kürzerem

Gesamtüberleben einhergehen (HAYES ET AL., 1996; LAKHANI ET AL., 2002; JÄNICKE, 1993). Auch sprechen die Korrelationen zur VEGF-Familie für eine Tendenz zur Angiogenese. Die Korrelation zu Her2/ErbB2 und der Verlust der hormonellen Regulation gekennzeichnet durch einen negativen Östrogen-Rezeptorstatus ist assoziiert mit einer schlechten Prognose.

Das Onkogen Her2/ErbB2 fungiert als Mediator für Proliferation und Differenzierung. Eine Überexpression dieses Onkogens tritt bei ca. 20-30 % aller Mammakarzinom-Patientinnen auf und ist mit einem aggressiven Verlauf der Erkrankung assoziiert (CUMMINGS ET AL., 1999). Retrospektive Analysen deuten darauf hin, dass eine erhöhte Expression von Her2/ErbB2 mit einer Resistenz des Chemotherapeutikums Tamoxifen einhergeht.

In der Literatur wird L1CAM in erster Linie in neuronalen Zellen exprimiert (FUSHIKI & SCHACHNER, 1986; SAAD ET AL., 1991), demzufolge wurde die L1CAM-Expression mit Synaptophysin, Chromogranin A, Chromogranin B und der Neuron-spezifischen Enolase, die als neuroendokrinen Marker fungieren, anhand des Pearson-Tests verglichen. Jedoch konnten keine statistischen Zusammenhänge beobachtet werden, was somit die These von HUSZAR ET AL. widerlegt, dass L1CAM positive Tumore von neuronaler Herkunft sind (HUSZAR ET AL., 2006). Außerdem konnte in dieser Arbeit im Gegensatz zu HUSZAR ET AL. eine positive Färbung von L1CAM in duktalem Mammakarzinomen detektiert werden. Die L1CAM Expression war hauptsächlich am Rand des Stromas, also an der Invasionsfront der Zellen lokalisiert.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass das Zelladhäsionsmolekül L1CAM, wie schon in vorangegangenen Studien an verschiedenen Karzinomen gezeigt, eine Bedeutung in der Tumorprogression des Mammakarzinoms hat und mit einem aggressiven Phänotyp einhergeht.

ICAM-1 Expression in klinischem Tumormaterial

Die Vermutung, dass das Adhäsionsmolekül ICAM-1 eine Rolle in der Progression des Mammakarzinoms spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit noch weiter gefestigt, indem die ICAM-1 Expression an klinischem Tumormaterial auf proteinbiochemischer Ebene sowie anhand von cDNA-Arrays analysiert wurde.

Die Western Blot-Studie von 106 Mammakarzinom-Patientinnen ergab nach statistischer Auswertung signifikante Korrelationen von hoher ICAM-1 Expression mit einem positiven Nodalstatus, niedrigem Differenzierungsgrad und fortgeschrittenem Stadium, also prognostisch ungünstigen Parametern. Daraus resultierte die Frage, ob auch die ICAM-1

Expression in Bezug auf das Gesamt-Überleben sowie das rezidivfreie Intervall als prognostischer Marker herangezogen werden kann. Die anhand der Kaplan-Meier-Methode erstellten Überlebenskurven konnten darlegen, dass hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls Patientinnen mit Tumoren mit hoher ICAM-1 Expression eine kürzere Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs aufwiesen, als Patientinnen mit niedriger ICAM-1 Expression. Für das Gesamt-Überleben konnte nur die Tendenz beobachtet werden, dass die Wahrscheinlichkeit einen längeren Zeitraum zu überleben bei Patientinnen mit Tumoren mit hoher ICAM-1 Expression niedriger ist. Dieses Ergebnis war nicht statistisch signifikant.

Auch die Ergebnisse der Gen-Expressionsanalyse auf RNA-Basis und der nachfolgenden Korrelation mit klinisch-pathologischen Prognosemarkern zeigten, dass bei einer hohen ICAM-1 Expression in den Tumoren bei den betroffenen Patientinnen von einer schlechten Prognose ausgegangen werden kann. Denn eine Prognose ist als eher ungünstig einzuschätzen, je mehr Lymphknoten befallen sind, je größer der Tumor ist, je schlechter der Differenzierungsgrad und je jünger die Patientin ist. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass zwischen dem Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 und der Tumorprogression beim Mammakarzinom ein Zusammenhang besteht und weiterführende Studien angebracht sind.

4.4 Untersuchungen des Adhäsionsverhalten der Fra-2 überexprimierenden Zellen

Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix

Es stellte sich die Frage, inwieweit die durch Fra-2 regulierten Adhäsionsmoleküle einen Einfluss auf das Verhalten der Tumorzellen haben und ob eine Interaktion mit dem Endothel von Blutgefäßen oder den Komponenten der extrazellulären Matrix stattfindet. Hierfür wurden zwei artifizielle Systeme verwendet, die einen Einblick gewähren sollten. Zum einen wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt, anhand dessen die Interaktion zwischen den Fra-2 überexprimierenden Zellen und fünf Komponenten der extrazellulären Matrix analysiert wurde. Es konnte eine verstärkte Adhäsion der Zellen an die Kollagene (Collagen I und IV) sowie an Fibronektin und Vitronektin beobachtet werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass durch Fra-2 viele Adhäsionsmoleküle in ihrer Regulation beeinflusst werden. Gerade Integrine, die ebenfalls einer Regulation durch Fra-2 unterliegen (siehe Tab. 3.2) fungieren als zelluläre Rezeptoren für Komponenten der ECM

Zellflusseexperimente

In einem weiteren Experiment wurde die Interaktion der Fra-2 überexprimierenden MCF-7 und MDA MB231 Zellen mit dem Endothelmarker E-Selektin mit Hilfe eines Zellflussversuches untersucht. Grundlage dieses Versuches ist die Annahme, dass Tumorzellen zur Evasion aus dem Blutstrom die gleichen Moleküle nutzen, wie aus dem Blutstrom auswandernde Leukozyten bei der Leukozytenemigration.

Anhand der Zellflusseexperimente sollte der physiologische Zustand von postkapillären Venolen und der mögliche erste Schritt der Extravasation simuliert werden. E-Selektin ist auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen exprimiert und vermittelt die Wechselwirkung mit der Gefäßwand.

Die als „Zellrollen“ bezeichnete Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel stellt eine Sonderform der Zelladhäsion dar und wird seit vielen Jahren phänomenologisch untersucht. Während eines Entzündungsvorganges ist das Zellrollen eine abbremsende Bewegung von Leukozyten aus dem Blut, während sie getrieben vom Scherstrom am Gefäßendothel entlang rollen. Dieses Selektin-vermitteltes Zellrollen steht immer am Anfang der Adhäsionskaskade einer Leukozyten-Emigration, die sich in weiteren Schritten wie feste Adhäsion und Extravasation weiter fortsetzt (siehe Abb. 4.1.).

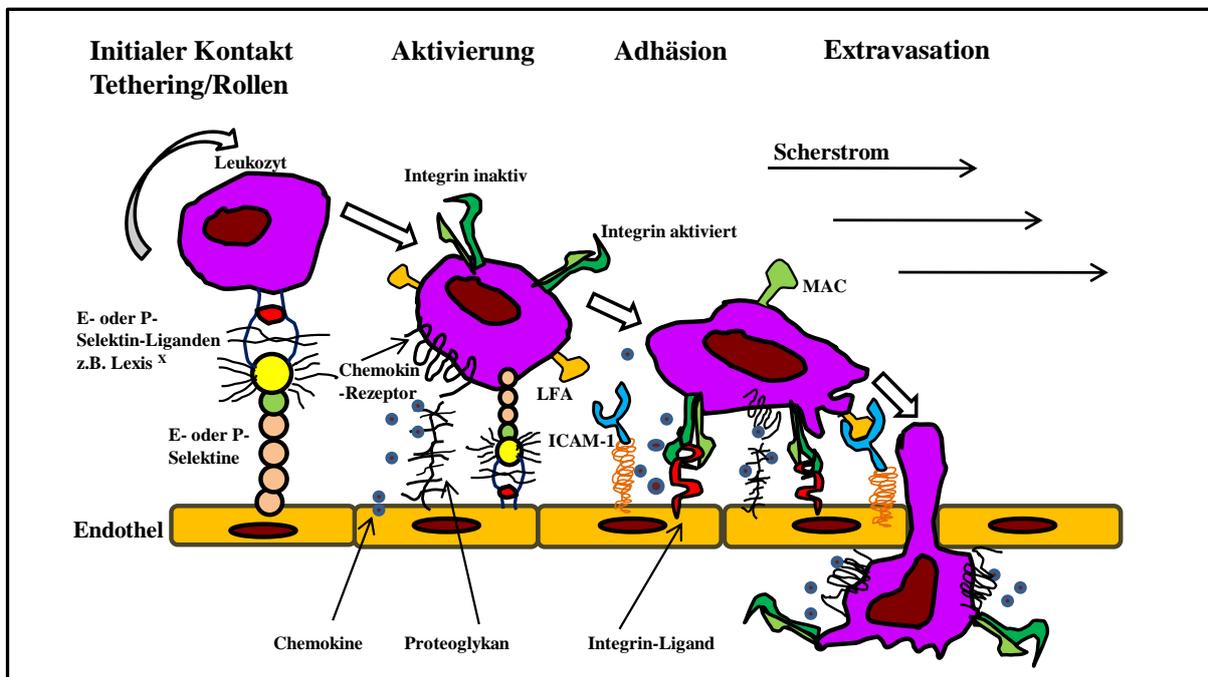


Abbildung 4.1.: Die Adhäsions- und Transmigrationskaskade der Leukozyten. Verändert nach LUSTER & MACLEAN, 2000.

Neben der zentralen Funktion bei der Leukozytenadhäsion während inflammatorischer Prozesse konnte für E-Selektin auch eine Rolle bei der Bindung von Tumorzellen an vaskuläres Endothel und somit auch eine Rolle bei der Metastasierung nachgewiesen werden (DEJANA ET AL., 1992; MANNORI ET AL., 1997; BIANCONI ET AL., 1996; BRODT ET AL., 1997; KRAUSE & TURNER, 1999). Auch zeigten verschiedene Studien, dass in Mammakarzinomen eine erhöhte Expression von E-Selektin auf Tumor-Endothelzellen vorliegt (MATSUURA ET AL., 1997; FOX ET AL., 1995).

Die Ergebnisse des Zellflusseexperimentes zeigten, dass bei einer physiologischen Scherkraft von 5 dyn/cm^2 das in der Literatur vielfach beschriebene Zellrollen bei den Fra-2 überexprimierenden MCF-7 und MDA MB231 Zellen gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht war. Im Falle der MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen konnte in der FACS-Analyse gezeigt werden, dass auf der Oberfläche dieser Zellen vermehrt CD15 vorkommt. CD15 ist ein adhäsives Polysaccharidantigen, das als Lewis^X-Antigen bezeichnet wird. Es reagiert durch schwache Adhäsionsinteraktionen mit E-Selektin an der Oberfläche von Gefäßendothelien, was die Basis für das Rollen der Leukozyten entlang des Endothels im Rahmen einer entzündlichen Reaktion ist (NELSON ET AL., 1993, LAWRENCE ET AL., 1991). Diese Adhäsionsinteraktion zwischen E-Selektin und CD15 auf der Oberfläche der MCF-7-pIRES Fra-2 Zellen könnte möglicherweise für das beobachtete Zellrollen verantwortlich sein.

Eine weitere Erklärung für das beobachtete Zellrollen der Fra-2 überexprimierenden Zellen wäre auch eine Interaktion mit anderen von Fra-2 regulierten Zelladhäsionsmolekülen mit E-Selektin auf dem Endothel (experimentell auf den beschichteten Kapillaren).

Ein möglicher Interaktionspartner wäre zum einen das zuvor beschriebene Zelladhäsionsmolekül ICAM-1. Eine zentrale Aufgabe von ICAM-1 ist im Rahmen der Leukozyten-Kaskade die Vermittlung der Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel (Abb. 4.1). Eine Bindung von ICAM-1 an E-Selektin ist zwar bisher noch nicht beschrieben worden, aber durch Glycosylierungsvorgänge an den Bindungsstellen von ICAM-1 durchaus denkbar (persönliche Mitteilung Prof. U. Schumacher).

Es liegt die Vermutung somit nahe, dass ICAM-1 ebenso wie bei der Leukozyten-Emigration auch eine besondere Bedeutung bei dem komplexen Vorgang der Metastasierung beigemessen werden könnte, da die molekularen Abläufe sehr ähnlich verlaufen.

Des Weiteren könnte das Zelloberflächenmolekül CD44, welches anhand der Microarray-Analyse als mögliches Zielgen von Fra-2 identifiziert wurde, verantwortlich für das beobachtete Zellrollen sein.

CD44 bezeichnet eine Gruppe von heterogenen Glycoproteinen, die in unterschiedlichen Formen in den verschiedensten Zellen und Geweben gebildet werden. Strukturell und funktionell gehört CD44 zur Familie der Hyaluronsäure-bindenden Hyaladherine (ARUFFO ET AL., 1990) und fördert Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion sowie die Migration (WAGENER, 1999). Die Rolle von CD44 in der Metastasierungskaskade ist noch nicht vollständig geklärt, dennoch ist die Beteiligung von CD44 an der Fähigkeit der Lymphozyten, den Blutfluss zu verlassen, durch Gefäßwände zu transmigrieren, sich festzusetzen und dort zu vermehren, durch viele Befunde bestätigt. Welche Stellung CD44 jedoch im metastasierenden Mammakarzinom einnimmt, wird von vielen Arbeitsgruppen diskutiert. Es wird ein kausaler Zusammenhang von CD44 mit metastatischem Verhalten von Mammakarzinomen gesehen, aber keine Aussagen über Korrelationen mit den klassischen Parametern getroffen. Hinweise, dass CD44 in Mammakarzinomen ein unabhängiger Prognosefaktor ist, ergaben sich bisher nicht (IDA ET AL., 1995).

Wie schon erwähnt, ist CD44 sehr heterogen und durch alternatives Splicen entstehen verschiedene CD44-Isoformen, von denen die so genannte Standardform CD44s und die varianten CD44-Isoformen (CD44v) die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Formen sind (GÜNTHER ET AL., 1993; LESLEY ET AL., 1993; SCREATON ET AL., 1993). Gerade die varianten Isoformen CD44v werden hoch exprimiert in verschiedenen invasiv wachsenden Mammakarzinom-Zelllinien wie MDA MB231 und MDA MB468 (WANG ET AL., 2005; DIAZ ET AL., 2005; LIU ET AL., 2007) und implizieren damit eine mögliche Rolle von CD44v in der Tumorprogression. Des Weiteren konnte von ZEN ET AL. (2008) gezeigt werden, dass CD44v4 als Ligand für E-Selektin in metastasierenden Mammakarzinom-Zelllinien agiert und somit eine entscheidende Funktion in der transendothelialen Invasion von Tumorzellen ausübt. Dieser sehr interessante Aspekt deutet darauf hin, dass das beobachtete Zellverhalten der Fra-2 überexprimierenden Zellen auch auf einer Interaktion von E-Selektin auf den Kapillaren mit CD44 beruhen könnte. Eine Erklärung dafür, dass die Zellen nicht fest an die mit E-Selektin beschichtete Kapillare adhären, sondern mit verlangsamter Geschwindigkeit darüber hinweg rollen, ist, dass möglicherweise nicht die von ZEN ET AL. (2008) beschriebene Isoform CD44v4 auf der Oberfläche der Fra-2 überexprimierenden Zellen exprimiert wird, sondern eine weitere Isoform, die jedoch nur eine lose Interaktion mit E-Selektin und keine feste Bindung vermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen Isoformen von CD44 nicht näher charakterisiert und somit kann keine Aussage getroffen werden, welche Spleißvariante von CD44 in den Fra-2 überexprimierenden Zellen vorliegt.

Die Zellflussversuche stellen eine Methode dar, die sich für weitere Untersuchungen als sehr vielversprechend erweist. So wäre es sinnvoll, die Kapillare mit weiteren Komponenten des Endothels zu beschichten, um mögliche Interaktionspartner für die durch Fra-2 regulierten Adhäsionsmoleküle zu identifizieren. Auch könnte man, eine Beschichtung mit Hyaluronsäure verwenden, da sowohl CD44 als auch ICAM-1 als HA-Rezeptoren beschrieben werden (ARUFFO ET AL., 1990; HIRAMITSU ET AL. 2006).

Ein sinnvoller Ansatz wäre es, die Kapillare mit einem Endothelmonolayer zu beschichten, um eine *in vivo* Situation besser darzustellen und im Zuge dessen weitere Moleküle der Metastasierungskaskade im Mammakarzinom zu charakterisieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die durch Fra-2 verstärkt exprimierten Zelladhäsionsmoleküle eine vielversprechende Bedeutung bei der Metastasierung von Mammakarzinomen haben könnten.

5 Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit sollte die pathophysiologische Bedeutung des Transkriptionsfaktors Fra-2 beim Mammakarzinom analysiert werden.

Durch Untersuchungen am klinischen Tumormaterial konnte ein erster Hinweis erhalten werden, dass eine erhöhte Fra-2 Expression in Mammakarzinomen mit einem ungünstigen Verlauf der Krankheit für die Patientinnen korreliert ist.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden zwei humane Mammakarzinom-Zelllinien (MDA MB231 und MCF-7) mit Expressionsvektoren für Fra-2 transfiziert. Zum einen fand das Tetrazyklin-gesteuerte und induzierbare TetON[®]-System Anwendung und zum anderen wurden die Zellen mit dem nicht-induzierbaren Expressionsvektor pIRES-Fra-2 transfiziert. Zum Vergleich mit Fra-2 wurden die Zelllinien auch mit Vektoren für Fra-1, einem weiteren Mitglied der AP-1 Familie, transfiziert.

Nach erfolgreicher Etablierung und Charakterisierung der stabil transfizierten, Fra-2 bzw. Fra-1 überexprimierenden Zellklone konnte gezeigt werden, dass sowohl Fra-2 als auch Fra-1 keinen Einfluss auf die Proliferation, aber einen signifikanten verstärkenden Effekt auf das invasive Wachstumsverhalten der Zellen hat.

Mit Hilfe von cDNA Mikroarrays wurden anschließend Gen-Expressionsanalysen mit diesen Zellen durchgeführt, die eine Vielzahl von Genen aufdeckten, die in ihrer Expression einer Regulation durch die Transkriptionsfaktoren Fra-2 bzw. Fra-1 unterliegen. Nach Auswertung der Daten wurde die Expression potentieller Zielgene wie z. B. ICAM-1, L1CAM und Cx43 auf proteinbiochemischer Ebene mittels Western Blot- und FACS-Analyse bestätigt.

Die Ergebnisse des Zellfluss-Experimentes verdeutlichten, dass die durch Fra-2 regulierten Adhäsionsmoleküle, ähnlich wie bei der Leukozytenemigration beschrieben, für den initialen Schritt dieser Kaskade, das Zellrollen, verantwortlich sind, welches ähnlich auch bei der Extravasation von Tumorzellen während der Metastasierung stattfindet.

Da aufgrunddessen den Adhäsionsmolekülen eine zentrale Bedeutung in der Metastasierung beigemessen wird, wurden die durch Fra-2 regulierten Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und L1CAM in einer Studie an klinischem Tumormaterial näher charakterisiert. Sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene konnten für ICAM-1 und L1CAM signifikante Korrelationen zum positiven Nodalstatus, niedrigen Differenzierungsgrad und negativen Östrogen-Rezeptorstatus beobachtet werden. Des Weiteren steht eine hohe Expression beider Moleküle in den Tumoren im Zusammenhang mit einer kürzeren Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs sowie eine hohe Expression von L1CAM mit einer kürzeren

Überlebenszeit für die betroffenen Patientinnen. Daraus schlussfolgernd ist eine erhöhte Expression beider Adhäsionsmoleküle in den Tumoren mit einer ungünstigen Prognose für die Patientinnen assoziiert.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass dem Transkriptionsfaktor Fra-2 eine Rolle in der Tumorprogression zugeschrieben werden kann. Durch die Identifikation zweier durch Fra-2 regulierter Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und L1CAM), deren potentielle klinische Relevanz hier eingehend diskutiert wurde, konnte bestätigt werden, dass Fra-2 in der Regulation der Invasivität und damit an der Metastasierung im Mammakarzinom involviert ist.

6 Literaturverzeichnis

- ADISESHIAH P.**, PAPAIAHGARI S.R., VUONG H., KALVAKOLANU D.V. & REDDY S.P. 2003. Multiple cis-elements mediate the transcriptional activation of human fra-1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* **278**: 47423-47433.
- ALANI R.**, BROWN P., BINETRUY B., DOSAKA H., ROSENBERG R.K., ANGEL P., KARIN M. & BIRRER M.J. 1991. The transactivating domain of the c-Jun proto-oncoprotein is required for cotransformation of rat embryo cells. *Mol Cell Biol* **11**: 6286-6295.
- ALBANESE C.**, D'AMICO M., REUTENS A.T., FU M., WATANABE G., LEE R.J., KITSIS R.N., HENGLEIN B., AVANTAGGIATI M., SOMASUNDARAM K., THIMMAPAYA B. & PESTELL R.G. 1999. Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J Biol Chem* **274**: 34186-34195.
- ALBERTS B.**, BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. 1994. Molecular biology of the cell. Garland, New York.
- ALBERTS G.F.**, PEIFLEY K.A., JOHNS A., KLEHA J.F. & WINKLES J.A. 1994. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* **269**: 10112-10118.
- ALLORY Y.**, MATSUOKA Y., BAZILLE C., CHRISTENSEN E.I., RONCO P. & DEBIEC H. 2005. The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **11**: 1190-1197.
- ALI S.**, Coobes RC. 2002. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* **2**:101-122.
- ANDERSEN H.**, MAHMOOD S., TKACH V., COHN M., KUSTIKOVA O., GRIGORIAN M., BEREZIN V., BOCK E., LUKANIDIN E. & TULCHINSKY E. 2002. The ability of Fos family members to produce phenotypic changes in epithelioid cells is not directly linked to their transactivation potentials. *Oncogene* **21**: 4843-4848.
- ANGEL P.**, ALLEGRETTO E.A., OKINO S.T., HATTORI K., BOYLE W.J., HUNTER T. & KARIN M. 1988a. Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* **332**: 166-171.
- ANGEL P.**, HATTORI K., SMEAL T. & KARIN M. 1988b. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**: 875-885.
- ANGEL P.**, IMAGAWA M., CHIU R., STEIN B., IMBRA R.J., RAHMSDORF H.J., JONAT C., HERRLICH P. & KARIN M. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**: 729-739.
- ANGEL P. & KARIN M.** 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-157.
- APLIN A.E.**, HOWE A., ALAHARI S.K. & JULIANO R.L. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* **50**: 197-263.
- ARONHEIM A.**, ZANDI E., HENNEMANN H., ELLEDGE S.J. & KARIN M. 1997. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* **17**: 3094-3102.
- ARUFFO A.**, STAMENKOVIC I., MELNICK M., UNDERHILL C.B. & SEED B. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**: 1303-1313.
- ASPLIN I.R.**, WU S.M., MATHEW S., BHATTACHARJEE G. & PIZZO S.V. 2001. Differential regulation of the fibroblast growth factor (FGF) family by alpha(2)-macroglobulin: evidence for selective modulation of FGF-2-induced angiogenesis. *Blood* **97**: 3450-3457.

- BÄSSLER R.** 1997. Mamma. In: Remmele W. Pathologie; *Springer Verlag, Berlin Heidelberg*.
- BAKIRI L., LALLEMAND D., BOSSY-WETZEL E. & YANIV M.** 2000. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J* **19**: 2056-2068.
- BAKIRI L., MATSUO K., WISNIEWSKA M., WAGNER E.F. & YANIV M.** 2002. Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol* **22**: 4952-4964.
- BAKIRI L., TAKADA Y., RADOLF M., EFERL R., YANIV M., WAGNER E.F. & MATSUO K.** 2007. Role of heterodimerization of c-Fos and Fra1 proteins in osteoclast differentiation. *Bone* **40**: 867-875.
- BAMBERGER A.M., BAMBERGER C.M., AUPERS S., MILDE-LANGOSCH K., LONING T. & MAKRIGIANNAKIS A.** 2004. Expression pattern of the activating protein-1 family of transcription factors in the human placenta. *Mol Hum Reprod* **10**: 223-228.
- BAMBERGER A.M., KAPPES H., METHNER C., RIECK G., BRUMMER J., WAGENER C., LONING T. & MILDE-LANGOSCH K.** 2002. Expression of the adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, BGP, C-CAM) in breast cancer is associated with the expression of the tumor-suppressor genes Rb, Rb2, and p27. *Virchows Arch* **440**: 139-144.
- BAMBERGER A.M., METHNER C., LISBOA B.W., STADTLER C., SCHULTE H.M., LONING T. & MILDE-LANGOSCH K.** 1999. Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int J Cancer* **84**: 533-538.
- BAMBERGER A.M., MILDE-LANGOSCH K., ROSSING E., GOEMANN C. & LONING T.** 2001. Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**: 545-550.
- BAO S., WU Q., LI Z., SATHORNSUMETEE S., WANG H., MCLENDON R.E., HIJELMELAND A.B. & RICH J.N.** 2008. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res* **68**: 6043-6048.
- BARCLAY A.N., BRADY R.L., DAVIS S.J. & LANGE G.** 1993. CD4 and the immunoglobulin superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **342**: 7-12.
- BARRETT A.J.** 1970. Cathepsin D: purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem J* **117**:601-607.
- BEAVON I.R.** 2000. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* **36**: 1607-1620.
- BEHRENS J., WEIDNER K.M., FRIXEN U.H., SCHIPPER J.H., SACHS M., ARAKAKI N., DAIKUHARA Y. & BIRCHMEIER W.** 1991. The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility. *EXS* **59**: 109-126.
- 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.
- BEN-ARIE A., HUSZAR M., BEN-ZVI N., SMIRNOV A., ALTEVOGT P. & FOGEL M.** 2008. The role of L1-CAM immunohistochemical staining in the diagnosis of abdominal-pelvic cancer of uncertain primary site in women. *Eur J Surg Oncol* **34**: 795-799.
- BENBROOK D.M. & JONES N.C.** 1990. Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* **5**: 295-302.
- BERANGER G.E., MOMIER D., GUIGONIS J.M., SAMSON M., CARLE G.F. & SCIMECA J.C.** 2007. Differential binding of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 and JunD/Fra2 accounts for RANKL-induced Tc1r1 gene expression during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* **22**: 975-983.
- BERCHEM G., GLONDU M., GLEIZES M., BROUILLET J.P., VIGNON F., GARCIA M., LIAUDET-COOPMAN E.** 2002. Cathepsin D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* **21**:5951-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- BERMAN A.E., KOZLOVA N.I. & MOROZEVICH G.E.** 2003. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc)* **68**: 1284-1299.
- BERNARDS R. & WEINBERG R.A.** 2002. A progression puzzle. *Nature* **418**: 823.
- BERX G., BECKER K.F., HOFER H. & VAN ROY F.** 1998. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* **12**: 226-237.
- BEVILACQUA M.P., POBER J.S., MENDRICK D.L., COTRAN R.S. & GIMBRONE M.A., JR.** 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 9238-9242.
- BEVILACQUA M.P., STENGELIN S., GIMBRONE M.A., JR. & SEED B.** 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* **243**: 1160-1165.
- BIRCHMEIER W., BEHRENS J., WEIDNER K.M., FRIXEN U.H. & SCHIPPER J.** 1991. Dominant and recessive genes involved in tumor cell invasion. *Curr Opin Cell Biol* **3**: 832-840.
- BISSELL M.J. & RADISKY D.** 2001. Putting tumors in context. *Nat Rev Cancer* **1**: 289-293.
- BOGENRIEDER T. & HERLYN M.** 2002. Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* **44**: 1-15.
- BOGENRIEDER T. & HERLYN M.** 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**: 6524-6536.
- BOO Y.J., PARK J.M., KIM J., CHAE Y.S., MIN B.W., UM J.W. & MOON H.Y.** 2007. L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* **14**: 1703-1711.
- BOS T.J., MONTECLARO F.S., MITSUNOBU F., BALL A.R., JR., CHANG C.H., NISHIMURA T. & VOGT P.K.** 1990. Efficient transformation of chicken embryo fibroblasts by c-Jun requires structural modification in coding and noncoding sequences. *Genes Dev* **4**: 1677-1687.
- BOUCK N., STELLMACH V. & HSU S.C.** 1996. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* **69**: 135-174.
- BOWEN M.A. & ARUFFO A.** 1999. Adhesion molecules, their receptors, and their regulation: analysis of CD6-activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) interactions. *Transplant Proc* **31**: 795-796.
- BOZEC A., BAKIRI L., HOEBERTZ A., EFERL R., SCHILLING A.F., KOMNENOVIC V., SCHEUCH H., PRIEMEL M., STEWART C.L., AMLING M. & WAGNER E.F.** 2008. Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature* **454**: 221-225.
- BRADFORD M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
- BRAY F., SANKILA R., FERLAY J. & PARKIN D.M.** 2002. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* **38**: 99-166.
- BRAZMA A.** 2001. On the importance of standardisation in life sciences. *Bioinformatics* **17**: 113-114.
- BRAZMA A., HINGAMP P., QUACKENBUSH J., SHERLOCK G., SPELLMAN P., STOECKERT C., AACH J., ANSORGE W., BALL C.A., CAUSTON H.C., GAASTERLAND T., GLENISSON P., HOLSTEGE F.C., KIM I.F., MARKOWITZ V., MATESE J.C., PARKINSON H., ROBINSON A., SARKANS U., SCHULZE-KREMER S., STEWART J., TAYLOR R., VILO J. & VINGRON M.** 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**: 365-371.
- BRAZMA A. & VILO J.** 2001. Gene expression data analysis. *Microbes Infect* **3**: 823-829.
- BRODT P., FALLAVOLLITA L., BRESALIER R.S., METERISSIAN S., NORTON C.R. & WOLITZKY B.A.** 1997. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer* **71**: 612-619.

- BRUEHL R.E.**, SPRINGER T.A. & BAINTON D.F. 1996. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **44**: 835-844.
- BRUMMENDORF T.**, KENWRICK S. & RATHJEN F.G. 1998. Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol* **8**: 87-97.
- BRUMMENDORF T.** & RATHJEN F.G. 1993. Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem* **61**: 1207-1219.
- BRUMMENDORF T. & RATHJEN F.G.** 1995. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* **2**: 963-1108.
- BRUMMENDORF T. & RATHJEN F.G.** 1996. Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* **6**: 584-593.
- BRUSSELBACH S.**, MOHLE-STEINLEIN U., WANG Z.Q., SCHREIBER M., LUCIBELLO F.C., MULLER R. & WAGNER E.F. 1995. Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene* **10**: 79-86.
- BUCK C.A. & HORWITZ A.F.** 1987a. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu Rev Cell Biol* **3**: 179-205.
- BUCK C.A. & HORWITZ A.F.** 1987b. Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion. *J Cell Sci Suppl* **8**: 231-250.
- CAMERON D.A.**, GREGORY W.M., BOWMAN A., ANDERSON E.D., LEVACK P., FOROUHI P. & LEONARD R.C. 2000a. Identification of long-term survivors in primary breast cancer by dynamic modelling of tumour response. *Br J Cancer* **83**: 98-103.
- CAMERON M.D.**, SCHMIDT E.E., KERKVLIT N., NADKARNI K.V., MORRIS V.L., GROOM A.C., CHAMBERS A.F. & MACDONALD I.C. 2000b. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* **60**: 2541-2546.
- CARLSON B.**, LAHUSEN T., SINGH S., LOAIZA-PEREZ A., WORLAND P.J., PESTELL R., ALBANESE C., SAUSVILLE E.A. & SENDEROWICZ A.M. 1999. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res* **59**: 4634-4641.
- CASALINO L.**, BAKIRI L., TALOTTA F., WEITZMAN J.B., FUSCO A., YANIV M. & VERDE P. 2007. Fra-1 promotes growth and survival in RAS-transformed thyroid cells by controlling cyclin a transcription. *EMBO J* **26**: 1878-1890.
- CAVALLARO U. & CHRISTOFORI G.** 2000. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *J Neurooncol* **50**: 63-70.
- CAVALLARO U. & CHRISTOFORI G.** 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* **1552**: 39-45.
- CAVALLARO U. & CHRISTOFORI G.** 2004a. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 118-132.
- CAVALLARO U. & CHRISTOFORI G.** 2004b. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* **1014**: 58-66.
- CAVALLARO U.**, NIEDERMAYER J., FUXA M. & CHRISTOFORI G. 2001. N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol* **3**: 650-657.
- CAVALLARO U.**, SCHAFFHAUSER B. & CHRISTOFORI G. 2002. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* **176**: 123-128.

- CHAMBERS A.F. & MATRISIAN L.M.** 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1260-1270.
- CHEN Y., YAKHINI Z., BEN-DOR A., DOUGHERTY E., TRENT J.M. & BITTNER M.** 2001. Analysis of expression patterns: the scope of the problem, the problem of scope. *Dis Markers* **17**: 59-65.
- CHIAPPETTA G., TALLINI G., DE BIASIO M.C., PENTIMALLI F., DE NIGRIS F., LOSITO S., FEDELE M., BATTISTA S., VERDE P., SANTORO M. & FUSCO A.** 2000. FRA-1 expression in hyperplastic and neoplastic thyroid diseases. *Clin Cancer Res* **6**: 4300-4306.
- CHRISTOFORI G. & SEMB H.** 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* **24**: 73-76.
- CLARK E.A. & LEDBETTER J.A.** 1994. How B and T cells talk to each other. *Nature* **367**: 425-428.
- COBLEIGH M.A., VOGEL C.L., TRIPATHY D., ROBERT N.J., SCHOLL S., FEHRENBACHER L., WOLTER J.M., PATON V., SHAK S., LIEBERMAN G. & SLAMON D.J.** 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* **17**: 2639-2648.
- COHNHEIM J.** 1889. Lectures on general pathology: A handbook for practitioners and students. *London, The Sydenham Society.*
- COLE G.J. & AKESON R.** 1989. Identification of a heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM using synthetic peptides. *Neuron* **2**: 1157-1165.
- CONACCI-SORRELL M., ZHURINSKY J. & BEN-ZE'EV A.** 2002a. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* **109**: 987-991.
- CONACCI-SORRELL M.E., BEN-YEDIDIA T., SHTUTMAN M., FEINSTEIN E., EINAT P. & BEN-ZE'EV A.** 2002b. Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* **16**: 2058-2072.
- COUSSENS L.M. & WERB Z.** 1996. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* **3**: 895-904.
- CROSSIN K.L. & KRUSHEL L.A.** 2000. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* **218**: 260-279.
- CROWE D.L. & BROWN T.N.** 1999. Transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activity by a c-fos/estrogen receptor fusion protein is mediated by the proximal AP-1 site of the MMP-9 promoter and correlates with reduced tumor cell invasion. *Neoplasia* **1**: 368-372.
- CROWE D.L. & SHULER C.F.** 1999. Regulation of tumor cell invasion by extracellular matrix. *Histol Histopathol* **14**: 665-671.
- CUMMINGS S.R., ECKERT S., KRUEGER K.A., GRADY D., POWLES T.J., CAULEY J.A., NORTON L., NICKELSEN T., BJARNASON N.H., MORROW M., LIPPMAN M.E., BLACK D., GLUSMAN J.E., COSTA A. & JORDAN V.C.** 1999. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA* **281**: 2189-2197.
- CUNNINGHAM B.A., HEMPERLY J.J., MURRAY B.A., PREDIGER E.A., BRACKENBURY R. & EDELMAN G.M.** 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**: 799-806.
- DAMERON K.M., VOLPERT O.V., TAINSKY M.A. & BOUCK N.** 1994. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* **265**: 1582-1584.
- DAVIS J.N. & ROUSSEL M.F.** 1996. Cloning and expression of the murine Elf-1 cDNA. *Gene* **171**: 265-269.
- DAYHOFF M.O., BARKER W.C. & HUNT L.T.** 1983. Establishing homologies in protein sequences. *Methods Enzymol* **91**: 524-545.

- DE LA TORRE M.,** WELLS A.F., BERGH J. & LINDGREN A. 1993. Localization of hyaluronan in normal breast tissue, radial scar, and tubular breast carcinoma. *Hum Pathol* **24**: 1294-1297.
- DEICHMANN M.,** KURZEN H., EGNER U., ALTEVOGT P. & HARTSCHUH W. 2003. Adhesion molecules CD171 (L1CAM) and CD24 are expressed by primary neuroendocrine carcinomas of the skin (Merkel cell carcinomas). *J Cutan Pathol* **30**: 363-368.
- DEJANA E.,** MARTIN-PADURA I., LAURI D., BERNASCONI S., BANI M.R., GAROFALO A., GIAVAZZI R., MAGNANI J., MANTOVANI A. & MENARD S. 1992. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type I carbohydrate chain. *Lab Invest* **66**: 324-330.
- DELOACH J.,** HAYES J., STAIR M., LUDWIG F., BEVANS D., FIELDER C. & HARSHFIELD D. 1996. Radiological case of the month. Ductal carcinoma in situ. *J Ark Med Soc* **92**: 415-418.
- DIAMOND M.S.,** STAUNTON D.E., MARLIN S.D. & SPRINGER T.A. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**: 961-971.
- DIAZ L.K.,** ZHOU X., WRIGHT E.T., CRISTOFANILLI M., SMITH T., YANG Y., SNEIGE N., SAHIN A. & GILCREASE M.Z. 2005. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**: 3309-3314.
- DORSEY M.J.,** TAE H.J., SOLLENBERGER K.G., MASCARENHAS N.T., JOHANSEN L.M. & TAPAROWSKY E.J. 1995. B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene* **11**: 2255-2265.
- DU X.,** GU M., WEISEL J.W., NAGASWAMI C., BENNETT J.S., BOWDITCH R. & GINSBERG M.H. 1993. Long range propagation of conformational changes in integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem* **268**: 23087-23092.
- EBELING O.,** DUCZMAL A., AIGNER S., GEIGER C., SCHOLLHAMMER S., KEMSHEAD J.T., MOLLER P., SCHWARTZ-ALBIEZ R. & ALTEVOGT P. 1996. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol* **26**: 2508-2516.
- EDELMAN G.M.,** MURRAY B.A., MEGE R.M., CUNNINGHAM B.A. & GALLIN W.J. 1987. Cellular expression of liver and neural cell adhesion molecules after transfection with their cDNAs results in specific cell-cell binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8502-8506.
- EFERL R.,** HASSELBLATT P., RATH M., POPPER H., ZENZ R., KOMNENOVIC V., IDARRAGA M.H., KENNER L. & WAGNER E.F. 2008. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10525-10530.
- EMSLEY J.,** KNIGHT C.G., FARNDALE R.W., BARNES M.J. & LIDDINGTON R.C. 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* **101**: 47-56.
- ERLANDSEN S.L.,** MACECHKO P.T., VAN KEULEN H. & JARROLL E.L. 1996. Formation of the Giardia cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J Eukaryot Microbiol* **43**: 416-429.
- EUER N.I.,** KAUL S., DEISSLER H., MOBUS V.J., ZEILLINGER R. & WEIDLE U.H. 2005. Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens. *Oncol Rep* **13**: 375-387.
- FELDING-HABERMANN B.,** SILLETTI S., MEI F., SIU C.H., YIP P.M., BROOKS P.C., CHERESH D.A., O'TOOLE T.E., GINSBERG M.H. & MONTGOMERY A.M. 1997. A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J Cell Biol* **139**: 1567-1581.
- FERLAY J.,** BRAY F., PISANI P., PARKIN D., BLOBOCAN 2000. Cancer incidence, mortality and prevention worldwide. Version 1.0. IARC *Cancer Base* **N0.5** IARC Press 2001.

- FIDLER I.J. 2003.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-458.
- FIDLER I.J. & HART I.R.** 1982a. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* **217**: 998-1003.
- FIDLER I.J. & HART I.R.** 1982b. The development of biological diversity and metastatic potential in malignant neoplasms. *Oncodev Biol Med* **4**: 161-176.
- FIDLER I.J. & HART I.R.** 1982c. Recent observations on the pathogenesis of cancer metastasis. *Prog Clin Biol Res* **85 Pt B**: 601-619.
- FIDLER I.J. & POSTE G.** 1982. Macrophages and cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* **155**: 65-75.
- FINAS D., HUSZAR M., AGIC A., DOGAN S., KIEFEL H., RIEDLE S., GAST D., MARCOVICH R., NOACK F., ALTEVOGT P., FOGEL M. & HORNUNG D.** 2008. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) as a pathogenetic factor in endometriosis. *Hum Reprod* **23**: 1053-1062.
- FISHMAN G.I., EDDY R.L., SHOWS T.B., ROSENTHAL L. & LEINWAND L.A.** 1991a. The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structures. *Genomics* **10**: 250-256.
- FISHMAN G.I., HERTZBERG E.L., SPRAY D.C. & LEINWAND L.A.** 1991b. Expression of connexin43 in the developing rat heart. *Circ Res* **68**: 782-787.
- FITZGIBBONS P.L., PAGE D.L., WEAVER D., THOR A.D., ALLRED D.C., CLARK G.M., RUBY S.G., O'MALLEY F., SIMPSON J.F., CONNOLLY J.L., HAYES D.F., EDGE S.B., LICHTER A. & SCHNITT S.J.** 2000. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* **124**: 966-978.
- FOGEL M., GUTWEIN P., MECHTERSHEIMER S., RIEDLE S., STOECK A., SMIRNOV A., EDLER L., BEN-ARIE A., HUSZAR M. & ALTEVOGT P.** 2003a. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* **362**: 869-875.
- FOGEL M., MECHTERSHEIMER S., HUSZAR M., SMIRNOV A., ABU-DAHI A., TILGEN W., REICHRATH J., GEORG T., ALTEVOGT P. & GUTWEIN P.** 2003b. L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* **189**: 237-247.
- FOLKMAN J.** 1996a. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Harvey Lect* **92**: 65-82.
- FOLKMAN J.** 1996b. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer* **32A**: 2534-2539.
- FOLKMAN J.** 1996c. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med* **2**: 167-168.
- FOLKMAN J. & D'AMORE P.A.** 1996. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* **87**: 1153-1155.
- FOX S.B., TURNER G.D., GATTER K.C. & HARRIS A.L.** 1995. The increased expression of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins on breast cancer endothelium. *J Pathol* **177**: 369-376.
- FRANK M. & KEMLER R.** 2002. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 557-562.
- FRANKE W.W., COWIN P., SCHMELZ M. & KAPPRELL H.P.** 1987a. The desmosomal plaque and the cytoskeleton. *Ciba Found Symp* **125**: 26-48.
- FRANKE W.W., KAPPRELL H.P. & COWIN P.** 1987b. Immunolocalization of plakoglobin in endothelial junctions: identification as a special type of Zonulae adhaerentes. *Biol Cell* **59**: 205-218.
- FRANKE W.W., KOCH P.J., SCHAFFER S., HEID H.W., TROYANOVSKY S.M., MOLL I. & MOLL R.** 1994. The desmosome and the syndesmos: cell junctions in normal development and in malignancy. *Princess Takamatsu Symp* **24**: 14-27.

LITERATURVERZEICHNIS

- FRELINGER A.L., 3RD, DU X.P., PLOW E.F. & GINSBERG M.H.** 1991. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol Chem* **266**: 17106-17111.
- FRIEDLANDER D.R., MILEV P., KARTHIKEYAN L., MARGOLIS R.K., MARGOLIS R.U. & GRUMET M.** 1994. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* **125**: 669-680.
- FRILING R., YASSUR Y., LEVY R., KOST J., SCHWARTZ B., MIKHAILOWSKY R. & LAMPRECHT S.A.** 1996. A role of transforming growth factor-beta 1 in the control of corneal neovascularization. *In Vivo* **10**: 59-64.
- FRIXEN U.H., BEHRENS J., SACHS M., EBERLE G., VOSS B., WARDA A., LOCHNER D. & BIRCHMEIER W.** 1991. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* **113**: 173-185.
- FUNK M., POENSGEN B., GRAULICH W., JEROME V. & MULLER R.** 1997. A novel, transformation-relevant activation domain in Fos proteins. *Mol Cell Biol* **17**: 537-544.
- FUSHIKI S. & SCHACHNER M.** 1986. Immunocytological localization of cell adhesion molecules L1 and N-CAM and the shared carbohydrate epitope L2 during development of the mouse neocortex. *Brain Res* **389**: 153-167.
- GANSAUGE F., GANSAUGE S., RAU B., SCHEIBLICH A., POCH B., SCHOENBERG M.H. & BEGER H.G.** 1997a. Low serum levels of soluble CD44 variant 6 are significantly associated with poor prognosis in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* **80**: 1733-1739.
- GANSAUGE S., GANSAUGE F., RAMADANI M., STOBBE H., RAU B., HARADA N. & BEGER H.G.** 1997b. Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Res* **57**: 1634-1637.
- GARCIA M., PLATET N., LIAUDET E., LAURENT V., DEROQ D., BROUILLET J.P., ROCHEFORT H.** 1996. Biological and Clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* **14**:642-650.
- GARROD D., CHIDGEY M. & NORTH A.** 1996. Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 670-678.
- GARROD D.R.** 1996. Epithelial development and differentiation: the role of desmosomes. The Watson Smith Lecture 1996. *J R Coll Physicians Lond* **30**: 366-373.
- GAST D., RIEDLE S., ISSA Y., PFEIFER M., BECKHOVE P., SANDERSON M.P., ARLT M., MOLDENHAUER G., FOGEL M., KRUGER A. & ALTEVOGT P.** 2008. The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene* **27**: 1281-1289.
- GAST D., RIEDLE S., SCHABATH H., SCHLICH S., SCHNEIDER A., ISSA Y., STOECK A., FOGEL M., JOUMAA S., WENGER T., HERR I., GUTWEIN P. & ALTEVOGT P.** 2005. L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* **115**: 658-665.
- GAVERT N., CONACCI-SORRELL M., GAST D., SCHNEIDER A., ALTEVOGT P., BRABLETZ T. & BEN-ZE'EV A.** 2005. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* **168**: 633-642.
- GENG J.G., BEVILACQUA M.P., MOORE K.L., MCINTYRE T.M., PRESCOTT S.M., KIM J.M., BLISS G.A., ZIMMERMAN G.A. & MCEVER R.P.** 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* **343**: 757-760.
- GIBBS P. & TURNBULL L.W.** 2003. Textural analysis of contrast-enhanced MR images of the breast. *Magn Reson Med* **50**: 92-98.
- GIERSIEPEN K., HEITMANN C., JAHNSEN K., LANGE C.** 2005. Brustkrebs; Gesundheitsberichtserstattung des Bundes. Band 25, RKI, Berlin.

- GOERKE K.,** STELLER J., VALET A. 2008. Klinikleitfaden Gynäkologie und Geburtshilfe. *Elsevier-Verlag, Heidelberg*.
- GOETZ J.,** CHATTON B., MATTEI M.G. & KEDINGER C. 1996. Structure and expression of the ATFa gene. *J Biol Chem* **271**: 29589-29598.
- GONZALES S.,** PEREZ M.J., PERAZZO J.C. & TOMARO M.L. 2006. Antioxidant role of heme oxygenase-1 in prehepatic portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol* **12**: 4149-4155.
- GOSSEN M. & BUJARD H.** 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5547-5551.
- GOSSEN M. & BUJARD H.** 1995. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques* **19**: 213-216; discussion 216-217.
- GOSSEN M.,** FREUNDLIEB S., BENDER G., MULLER G., HILLEN W. & BUJARD H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**: 1766-1769.
- GRAEFF H.,** WILMANN W., JÄNICKE F., SAUER H., CLASSEN S. 1997. Prognostische und therapierelevante Faktoren beim Mammakarzinom. Ergebnisse einer Konsensuskonferenz. In: *Onkologie* **3**:409-412.
- GRUMET M.,** FRIEDLANDER D.R. & EDELMAN G.M. 1993. Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes Commun* **1**: 177-190.
- GRUMET M.,** MILEV P., SAKURAI T., KARTHIKEYAN L., BOURDON M., MARGOLIS R.K. & MARGOLIS R.U. 1994. Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J Biol Chem* **269**: 12142-12146.
- GUILFORD P.,** HOPKINS J., HARRAWAY J., MCLEOD M., MCLEOD N., HARAWIRA P., TAITE H., SCOULAR R., MILLER A. & REEVE A.E. 1998. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* **392**: 402-405.
- GUM R.,** LENGUEL E., JUAREZ J., CHEN J.H., SATO H., SEIKI M. & 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.
- GUMBNER B.M.** 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* **148**: 399-404.
- GUNTHER U.** 1993. CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* **184**: 47-63.
- GUNTHER U.** 1996. CD44 in malignant disorders. *Curr Top Microbiol Immunol* **213 (Pt 1)**: 271-285.
- GUNTHER U.,** HOFMANN M., RUDY W., REBER S., ZOLLER M., HAUSSMANN I., MATZKU S., WENZEL A., PONTA H. & HERRLICH P. 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**: 13-24.
- GUNTHER U.,** SCHWARZLER C., WITTIG B., LAMAN J., RUIZ P., STAUDER R., BLOEM A., SMADJA-JOFFE F., ZOLLER M. & ROLINK A. 1998. Functional involvement of CD44, a family of cell adhesion molecules, in immune responses, tumour progression and haematopoiesis. *Adv Exp Med Biol* **451**: 43-49.
- GUNTHER U.,** STAUDER R., MAYER B., TERPE H.J., FINKE L. & FRIEDRICH K. 1995. Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression? *Cancer Surv* **24**: 19-42.
- GURZOV E.N.,** BAKIRI L., ALFARO J.M., WAGNER E.F. & IZQUIERDO M. 2008. Targeting c-Jun and JunB proteins as potential anticancer cell therapy. *Oncogene* **27**: 641-652.
- GUTWEIN P.,** MECHTERSHEIMER S., RIEDLE S., STOECK A., GAST D., JOUMAA S., ZENTGRAF H., FOGEL M. & ALTEVOGT D.P. 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J* **17**: 292-294.

LITERATURVERZEICHNIS

- HAI T. & CURRAN T.** 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3720-3724.
- HALL M. & PETERS G.** 1996. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* **68**: 67-108.
- HAMACHER J. & SCHABERG T.** 1994. Adhesion molecules in lung diseases. *Lung* **172**: 189-213.
- HANAHAHAN D. & FOLKMAN J.** 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.
- HANAHAHAN D. & WEINBERG R.A.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- HAPKE S., KESSLER H., LUBER B., BENGE A., HUTZLER P., HOFER H., SCHMITT M. & REUNING U.** 2003. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem* **384**: 1073-1083.
- HASHIMOTO F., HORIGOME T., KANBAYASHI M., YOSHIDA K., SUGANO H.** 1983. An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal Biochem* **129**:192-9.
- HASPEL J. & GRUMET M.** 2003. The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Biosci* **8**: s1210-1225.
- HARBECK N.** 2002. Clinical utility of uPA and PAI-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts. *Clin Breast Cancer* **3**:196-200.
- HATTORI R., HAMILTON K.K., FUGATE R.D., MCEVER R.P. & SIMS P.J.** 1989. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* **264**: 7768-7771.
- HENGERER B., LINDHOLM D., HEUMANN R., RUTHER U., WAGNER E.F. & THOENEN H.** 1990. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3899-3903.
- HENNIGAN R.F., HAWKER K.L. & OZANNE B.W.** 1994. Fos-transformation activates genes associated with invasion. *Oncogene* **9**: 3591-3600.
- HERR I., VAN DAM H. & ANGEL P.** 1994. Binding of promoter-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the c-jun promoter by TPA and UV irradiation. *Carcinogenesis* **15**: 1105-1113.
- HILLENBRAND R., MOLTHAGEN M., MONTAG D. & SCHACHNER M.** 1999. The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions. *Eur J Neurosci* **11**: 813-826.
- HIRAMITSU T., YASUDA T., ITO H., SHIMIZU M., JULOVI S.M., KAKINUMA T., AKIYOSHI M., YOSHIDA M. & NAKAMURA T.** 2006. Intercellular adhesion molecule-1 mediates the inhibitory effects of hyaluronan on interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production in rheumatoid synovial fibroblasts via down-regulation of NF-kappaB and p38. *Rheumatology (Oxford)* **45**: 824-832.
- HSU-LIN S., BERMAN C.L., FURIE B.C., AUGUST D. & FURIE B.** 1984. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem* **259**: 9121-9126.
- HSU J.C., LAZ T., MOHN K.L. & TAUB R.** 1991. Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3511-3515.
- HSU M.Y., MEIER F. & HERLYN M.** 2002. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **70**: 522-536.
- HSU T.C. & FURLONG C.** 1991. The role of ethanol in oncogenesis of the upper aerodigestive tract; inhibition of DNA repair. *Anticancer Res* **11**: 1995-1998.

- HUNTER K.W.**, CRAWFORD N.P. & ALSARRAJ J. 2008. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res* **10 Suppl 1**: S2.
- HUSZAR M.**, MOLDENHAUER G., GSCHWEND V., BEN-ARIE A., ALTEVOGT P. & FOGEL M. 2006. Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and targeted therapy. *Hum Pathol* **37**: 1000-1008.
- HYNES R.O.** 2002a. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687.
- HYNES R.O.** 2002b. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* **8**: 918-921.
- HYNES R.O.**, BADER B.L. & HODIVALA-DILKE K. 1999. Integrins in vascular development. *Braz J Med Biol Res* **32**: 501-510.
- HYNES R.O.**, LIVELY J.C., MCCARTY J.H., TAVERNA D., FRANCIS S.E., HODIVALA-DILKE K. & XIAO Q. 2002. The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**: 143-153.
- IHNEN M.**, MULLER V., WIRTZ R.M., SCHRODER C., KRENKEL S., WITZEL I., LISBOA B.W., JANICKE F. & MILDE-LANGOSCH K. 2008. Predictive impact of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **112**: 419-427.
- IDA N. & BOURGUIGNON L.Y.** 1995. New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J Cell Physiol* **162**: 127-133.
- ISSA Y.**, NUMMER D., SEIBEL T., MUERKOSTER S.S., KOCH M., SCHMITZ-WINNENTHAL F.H., GALINDO L., WEITZ J., BECKHOVE P. & ALTEVOGT P. 2009. Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J Mol Med* **87**: 99-112.
- ISSEKUTZ A.C.**, ROWTER D. & SPRINGER T.A. 1999. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc Biol* **65**: 117-126.
- ISSEKUTZ T.B.** 1999. Integrins regulating the interaction of lymphocytes with vascular endothelium. *Transplant Proc* **31**: 1600-1601.
- JACKSON D.G.**, SCREATON G.R., BELL M.V. & BELL J.I. 1993. CD44 and cancer. *Lancet* **341**: 252-253.
- JÄNICKE F.** 1993. uPA and its inhibitor PAI-1 are strong independent prognostic factors in node negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **24**: 123-130.
- JASIENSKA G.**, ZIOMKIEWICZ A., LIPSON S.F., THUNE I. & ELLISON P.T. 2006. High ponderal index at birth predicts high estradiol levels in adult women. *Am J Hum Biol* **18**: 133-140.
- JIA M.C.**, RAVINDRANATH N., PAPADOPOULOS V., DYM M. 1996. Regulation of c-fos mRNA expression in Sertoli cells by cyclic AMP, calcium and protein kinase C mediated pathways. *Mol Cell Biochem* **156**:43-9.
- JIANG W.G.** 1996. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* **83**: 437-446.
- JOHNSON M.H.**, MARO B. & TAKEICHI M. 1986. The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J Embryol Exp Morphol* **93**: 239-255.
- JOHNSON R.**, SPIEGELMAN B., HANAHAH D. & WISDOM R. 1996. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol Cell Biol* **16**: 4504-4511.
- KADMON G.**, IMHOF B.A., ALTEVOGT P. & SCHACHNER M. 1995. Adhesive hierarchy involving the cell adhesion molecules L1, CD24, and alpha 6 integrin in murine neuroblastoma N2A cells. *Biochem Biophys Res Commun* **214**: 94-101.
- KAIFI J.T.**, HEIDTMANN S., SCHURR P.G., REICHEL T., MANN O., YEKEBAS E.F., WACHOWIAK R., STRATE T., SCHACHNER M. & IZBICKI J.R. 2006a. Absence of L1 in pancreatic masses distinguishes adenocarcinomas from poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Anticancer Res* **26**: 1167-1170.

- KAIFI J.T.**, STRELOW A., SCHURR P.G., REICHELT U., YEKEBAS E.F., WACHOWIAK R., QUAAS A., STRATE T., SCHAEFER H., SAUTER G., SCHACHNER M. & IZBICKI J.R. 2006b. L1 (CD171) is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* **19**: 399-406.
- KAIFI J.T.**, ZINNKANN U., YEKEBAS E.F., SCHURR P.G., REICHELT U., WACHOWIAK R., FIEGEL H.C., PETRI S., SCHACHNER M. & IZBICKI J.R. 2006c. L1 is a potential marker for poorly-differentiated pancreatic neuroendocrine carcinoma. *World J Gastroenterol* **12**: 94-98.
- KAM J.L.**, REGIMBALD L.H., HILGERS J.H., HOFFMAN P., KRANTZ M.J., LONGENECKER B.M. & HUGH J.C. 1998. MUC1 synthetic peptide inhibition of intercellular adhesion molecule-1 and MUC1 binding requires six tandem repeats. *Cancer Res* **58**: 5577-5581.
- KARIN M.**, LIU Z. & ZANDI E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 240-246.
- KARIN M.** & SHAULIAN E. 2001. AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life* **52**: 17-24.
- KARRETH F.**, HOEBERTZ A., SCHEUCH H., EFERL R. & WAGNER E.F. 2004. The AP1 transcription factor Fra2 is required for efficient cartilage development. *Development* **131**: 5717-5725.
- KARTENBECK J.**, SCHWECHHEIMER K., MOLL R. & FRANKE W.W. 1984. Attachment of vimentin filaments to desmosomal plaques in human meningioma cells and arachnoidal tissue. *J Cell Biol* **98**: 1072-1081.
- KERR L.D.**, HOLT J.T. & MATRISIAN L.M. 1988a. Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science* **242**: 1424-1427.
- KERR L.D.**, OLASHAW N.E. & MATRISIAN L.M. 1988b. Transforming growth factor beta 1 and cAMP inhibit transcription of epidermal growth factor- and oncogene-induced transin RNA. *J Biol Chem* **263**: 16999-17005.
- KOCH P.J.** & FRANKE W.W. 1994. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 682-687.
- KOHN E.C.**, FRANCIS E.A., LIOTTA L.A. & SCHIFFMANN E. 1990. Heterogeneity of the motility responses in malignant tumor cells: a biological basis for the diversity and homing of metastatic cells. *Int J Cancer* **46**: 287-292.
- KORNMANN M.**, ISHIWATA T., ARBER N., BEGER H.G. & KORC M. 1998a. Increased cyclin D1 expression in chronic pancreatitis. *Pancreas* **17**: 158-162.
- KORNMANN M.**, ISHIWATA T., ITAKURA J., TANGVORANUNTAKUL P., BEGER H.G. & KORC M. 1998b. Increased cyclin D1 in human pancreatic cancer is associated with decreased postoperative survival. *Oncology* **55**: 363-369.
- KOUZARIDES T.** & ZIFF E. 1988. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* **336**: 646-651.
- KOWITZ A.**, KADMON G., ECKERT M., SCHIRRMACHER V., SCHACHNER M. & ALTEVOGT P. 1992. Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol* **22**: 1199-1205.
- KOWITZ A.**, KADMON G., VERSCHUEREN H., REMELS L., DE BAETSELIER P., HUBBE M., SCHACHNER M., SCHIRRMACHER V. & ALTEVOGT P. 1993. Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* **11**: 419-429.
- KRAUSE T.** & TURNER G.A. 1999. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis* **17**: 183-192.
- KRISTIANSEN G.**, PILARSKY C., WISSMANN C., STEPHAN C., WEISSBACH L., LOY V., LOENING S., DIETEL M. & ROSENTHAL A. 2003. ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions. *Prostate* **54**: 34-43.
- KUHN T.B.**, STOECKLI E.T., CONDRAU M.A., RATHJEN F.G. & SONDEREGGER P. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* **115**: 1113-1126.

LITERATURVERZEICHNIS

- KUNZ B., LIERHEIMER R., RADER C., SPIRIG M., ZIEGLER U. & SONDEREGGER P.** 2002. Axonin-1/TAG-1 mediates cell-cell adhesion by a cis-assisted trans-interaction. *J Biol Chem* **277**: 4551-4557.
- KUSTIKOVA O., KRAMEROV D., GRIGORIAN M., BEREZIN V., BOCK E., LUKANIDIN E. & TULCHINSKY E.** 1998. Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* **18**: 7095-7105.
- LAEMMLI U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- LAKHANI S.R., VAN DE VIJVER M.J., JACQUEMIER J., ANDERSON T.J., OSIN P.P., MCGUFFOG L. & EASTON D.F.** 2002. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* **20**: 2310-2318.
- LALLEMAND D., SPYROU G., YANIV M. & PFARR C.M.** 1997. Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts. *Oncogene* **14**: 819-830.
- LAMB R.F., HENNIGAN R.F., TURNBULL K., KATSANAKIS K.D., MACKENZIE E.D., BIRNIE G.D. & OZANNE B.W.** 1997. AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol* **17**: 963-976.
- LANDSCHULZ W.H., JOHNSON P.F. & MCKNIGHT S.L.** 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.
- LANGER S., SINGER C.F., HUDELIST G., DAMPIER B., KASERER K., VINATZER U., PEHAMBERGER H., ZIELINSKI C., KUBISTA E. & SCHREIBNER M.** 2006. Jun and Fos family protein expression in human breast cancer: correlation of protein expression and clinicopathological parameters. *Eur J Gynaecol Oncol* **27**: 345-352.
- LAURENT T.C. & FRASER J.R.** 1992. Hyaluronan. *FASEB J* **6**: 2397-2404.
- LAWRENCE M.B., Springer T.A.** 1991. Leukocyte roll on a selectin at physiological flow rates:distinction from prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**: 859-873.
- LEANER V.D., CHICK J.F., DONNINGER H., LINNIOLA I., MENDOZA A., KHANNA C. & BIRRER M.J.** 2009. Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *Am J Pathol* **174**: 265-275.
- LEE J.O., BANKSTON L.A., ARNAOUT M.A. & LIDDINGTON R.C.** 1995. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* **3**: 1333-1340.
- LEE W., MITCHELL P. & TJIAN R.** 1987. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752.
- LEMMON V., FARR K.L. & LAGENAUR C.** 1989. L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* **2**: 1597-1603.
- LEPPA S., SAFFRICH R., ANSORGE W. & BOHMANN D.** 1998. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J* **17**: 4404-4413.
- LESLEY J., HYMAN R. & KINCADE P.W.** 1993a. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* **54**: 271-335.
- LESLEY J., KINCADE P.W. & HYMAN R.** 1993b. Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody. *Eur J Immunol* **23**: 1902-1909.
- LEWINSOHN D.M., BARGATZE R.F. & BUTCHER E.C.** 1987. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol* **138**: 4313-4321.

- LIAUDET-COOPMAN E.,** BEAUJOUIN M., DEROCQ D., GARCIA M., GLONDU-LASSIS M., LAURENT-MATHA V., PREBOIS C., ROCHEFORT H., VIGNON F. 2006. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* **237**:167-69.
- LINDNER J.,** RATHJEN F.G. & SCHACHNER M. 1983. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* **305**: 427-430.
- LIOTTA L.** 1990. The role of cellular proteases and their inhibitors in invasion and metastasis. Introductory overview. *Cancer Metastasis Rev* **9**: 285-287.
- LIOTTA L.A. & KOHN E.** 1990. Cancer invasion and metastases. *JAMA* **263**: 1123-1126.
- LIOTTA L.A. & STETLER-STEVENSON W.G.** 1990. Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* **1**: 99-106.
- LIU B.,** KONG W., GONG S., YANG C., WANG G. & ZHU L. 2005. Relationship between the expression of CD44v6 and development, progress, invasion and metastasis of laryngeal carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **25**: 351-353, 364.
- LUSTER A.D. & MACLEAN J.** 2000. Chemokines and Chemokine receptors. In Transmigration of Leukocytes (ed. K.F. Ley) pp 90-110. *Oxford University Press*, New York.
- MAEDA K.,** CHUNG Y., KANG S., OGAWA M., ONODA N., NISHIGUCHI Y., IKEHARA T., NAKATA B., OKUNO M. & SOWA M. 1998. Cyclin D1 overexpression and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Oncology* **55**: 145-151.
- MAKRETSOV N.,** GILKS C.B., COLDMAN A.J., HAYES M. & HUNTSMAN D. 2003. Tissue microarray analysis of neuroendocrine differentiation and its prognostic significance in breast cancer. *Hum Pathol* **34**: 1001-1008.
- MANDRIOTA S.J. & PEPPER M.S.** 1997. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* **110** (Pt 18): 2293-2302.
- MANNORI G.,** SANTORO D., CARTER L., CORLESS C., NELSON R.M. & BEVILACQUA M.P. 1997. Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am J Pathol* **151**: 233-243.
- MANO T.,** LUO Z., SUHARA T., SMITH R.C., ESSER S. & WALSH K. 2000. Expression of wild-type and noncleavable Fas ligand by tetracycline-regulated adenoviral vectors to limit intimal hyperplasia in vascular lesions. *Hum Gene Ther* **11**: 1625-1635.
- MARHABA R. & ZOLLER M.** 2004. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* **35**: 211-231.
- MARUYA S.,** KIM H.W., WEBER R.S., LEE J.J., KIES M., LUNA M.A., BATAKIS J.G. & EL-NAGGAR A.K. 2004. Gene expression screening of salivary gland neoplasms: molecular markers of potential histogenetic and clinical significance. *J Mol Diagn* **6**: 180-190.
- MASELLIS-SMITH A.,** BELCH A.R., MANT M.J., TURLEY E.A. & PILARSKI L.M. 1996. Hyaluronan-dependent motility of B cells and leukemic plasma cells in blood, but not of bone marrow plasma cells, in multiple myeloma: alternate use of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) and CD44. *Blood* **87**: 1891-1899.
- MATSUI M.,** TOKUHARA M., KONUMA Y., NOMURA N. & ISHIZAKI R. 1990. Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene* **5**: 249-255.
- MATSUI W. & KIRCHHAUSEN T.** 1990. Stabilization of clathrin coats by the core of the clathrin-associated protein complex AP-2. *Biochemistry* **29**: 10791-10798.
- MATSUURA N.,** NARITA T., MITSUOKA C., KIMURA N., KANNAGI R., IMAI T., FUNAHASHI H. & TAKAGI H. 1997a. Increased concentration of soluble E-selectin in the sera of breast cancer patients. *Anticancer Res* **17**: 1367-1372.

- MATSUURA N.**, NARITA T., MITSUOKA C., KIMURA N., KANNAGI R., IMAI T., FUNAHASHI H. & TAKAGI H. 1997b. Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patients with distant metastases. *Jpn J Clin Oncol* **27**: 135-139.
- MCCOURT P.A.** & **GUSTAFSON S.** 1997. On the adsorption of hyaluronan and ICAM-1 to modified hydrophobic resins. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1179-1189.
- MCGUIRE W.L.** 1991. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Nat Cancer Inst* **83**: 154-155.
- MCEVER R.P.**, BECKSTEAD J.H., MOORE K.L., MARSHALL-CARLSON L. & BAINTON D.F. 1989. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* **84**: 92-99.
- MCEVER R.P.** & **MARTIN M.N.** 1984. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* **259**: 9799-9804.
- MCGUIRE W.L.** 1991. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst* **83**: 154-155.
- MCINTOSH G.G.**, ANDERSON J.J., MILTON I., STEWARD M., PARR A.H., THOMAS M.D., HENRY J.A., ANGUS B., LENNARD T.W. & HORNE C.H. 1995. Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. *Oncogene* **11**: 885-891.
- MECHTA F.**, LALLEMAND D., PFARR C.M. & YANIV M. 1997. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* **14**: 837-847.
- MELI M.L.**, CARREL F., WAIBEL R., AMSTUTZ H., CROMPTON N., JAUSI R., MOCH H., SCHUBIGER P.A. & NOVAK-HOFER I. 1999. Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer* **83**: 401-408.
- MERZENICH H.**, GIERSIEPEN K., KIESCHKE J. & ZEEB H. 2005. [Screening for colorectal cancer: what is the most effective strategy?]. *Gesundheitswesen* **67**: 803-808.
- MEYER M.**, CLAUSS M., LEPPLE-WIENHUES A., WALTENBERGER J., AUGUSTIN H.G., ZICHE M., LANZ C., BUTTNER M., RZIHA H.J. & DEHIO C. 1999. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **18**: 363-374.
- MILDE-LANGOSCH K.** 2005. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer* **41**: 2449-2461.
- MILDE-LANGOSCH K.**, BAMBERGER A.M., METHNER C., RIECK G. & LONING T. 2000. Expression of cell cycle-regulatory proteins rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members. *Int J Cancer* **87**: 468-472.
- MILDE-LANGOSCH K.**, BAMBERGER A.M., RIECK G., GRUND D., HEMMINGER G., MULLER V. & LONING T. 2005. Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. *Br J Cancer* **92**: 2206-2215.
- MILDE-LANGOSCH K.**, JANKE S., WAGNER I., SCHRODER C., STREICHERT T., BAMBERGER A.M., JANICKE F. & LONING T. 2008. Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility. *Breast Cancer Res Treat* **107**: 337-347.
- MILDE-LANGOSCH K.**, KAPPES H., RIETHDORF S., LONING T. & BAMBERGER A.M. 2003. FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **77**: 265-275.
- MILDE-LANGOSCH K.**, RODER H., ANDRITZKY B., ASLAN B., HEMMINGER G., BRINKMANN A., BAMBERGER C.M., LONING T. & BAMBERGER A.M. 2004. The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **86**: 139-152.

LITERATURVERZEICHNIS

- MILEV P.**, FRIEDLANDER D.R., SAKURAI T., KARTHIKEYAN L., FLAD M., MARGOLIS R.K., GRUMET M. & MARGOLIS R.U. 1994. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* **127**: 1703-1715.
- MILLS A.A.** 2001. Changing colors in mice: an inducible system that delivers. *Genes Dev* **15**: 1461-1467.
- MIYATAKE N.**, SHIKATA K., SUGIMOTO H., KUSHIRO M., SHIKATA Y., OGAWA S., HAYASHI Y., MIYASAKA M. & MAKINO H. 1998. Intercellular adhesion molecule 1 mediates mononuclear cell infiltration into rat glomeruli after renal ablation. *Nephron* **79**: 91-98.
- MONTGOMERY A.M.**, BECKER J.C., SIU C.H., LEMMON V.P., CHERESH D.A., PANCOOK J.D., ZHAO X. & REISFELD R.A. 1996. Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* **132**: 475-485.
- MUNDY G.R.** 1997. Mechanisms of bone metastasis. *Cancer* **80**: 1546-1556.
- MURAKAMI M.**, SONOBE M.H., UI M., KABUYAMA Y., WATANABE H., WADA T., HANDA H. & IBA H. 1997. Phosphorylation and high level expression of Fra-2 in v-src transformed cells: a pathway of activation of endogenous AP-1. *Oncogene* **14**: 2435-2444.
- NABESHIMA K.**, INOUE T., SHIMAO Y. & SAMESHIMA T. 2002. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* **52**: 255-264.
- NAITOH H.**, SHIBATA J., KAWAGUCHI A., KODAMA M. & HATTORI T. 1995. Overexpression and localization of cyclin D1 mRNA and antigen in esophageal cancer. *Am J Pathol* **146**: 1161-1169.
- NAKAMURA Y.**, TAMURA H., HORINOUCHE K. & SHIOSAKA S. 2006. Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J Cell Sci* **119**: 1341-1349.
- NELSON R.M.**, Dolich S., Aruffo A., Cecconi O., Bevilacqua M.P. 1993. Higher affinity oligosaccharide ligands for E-Selectin. *J Clin Invest.* **91**:1157-1166.
- NERLOV C.**, RORTH P., BLASI F. & JOHNSEN M. 1991. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* **6**: 1583-1592.
- NG D.C.**, SHAFARAE S., LEE D. & BIKLE D.D. 2000. Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem* **275**: 24080-24088.
- NISHIZAWA M.**, KATAOKA K., GOTO N., FUJIWARA K.T. & KAWAI S. 1989. v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 7711-7715.
- OGAWA Y.**, HIRAKAWA K., NAKATA B., FUJIHARA T., SAWADA T., KATO Y., YOSHIKAWA K. & SOWA M. 1998. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in invasive breast cancer reflects low growth potential, negative lymph node involvement, and good prognosis. *Clin Cancer Res* **4**: 31-36.
- OSHIMA R.G.**, ABRAMS L. & KULESH D. 1990. Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev* **4**: 835-848.
- OWENS G.C.**, EDELMAN G.M. & CUNNINGHAM B.A. 1987. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 294-298.
- OZANNE B.W.**, MCGARRY L., SPENCE H.J., JOHNSTON I., WINNIE J., MEAGHER L. & STAPLETON G. 2000. Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme. *Eur J Cancer* **36**: 1640-1648.
- PAGET S.** 1989. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**: 98-101.

- PANCOOK J.D.**, REISFELD R.A., VARKI N., VITIELLO A., FOX R.I. & MONTGOMERY A.M. 1997. Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J Immunol* **158**: 4413-4421.
- PANKOV R.**, NEZANANOV N., UMEZAWA A. & OSHIMA R.G. 1994. AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid-dependent induction of keratin 18 in embryonic cells. *Mol Cell Biol* **14**: 7744-7757.
- PANTEL K. & BRAKENHOFF R.H.** 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* **4**: 448-456.
- PANTEL K.**, SCHLIMOK G., ANGSTWURM M., PASSLICK B., IZBICKI J.R., JOHNSON J.P. & RIETHMULLER G. 1995. Early metastasis of human solid tumours: expression of cell adhesion molecules. *Ciba Found Symp* **189**: 157-170; discussion 170-153, 174-156.
- PASSEGUE E. & WAGNER E.F.** 2000. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* **19**: 2969-2979.
- PHILIPS A.**, TEYSSIER C., GALTIER F., RIVIER-COVAS C., REY J.M., ROCHEFORT H. & CHALBOS D. 1998. FRA-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **12**: 973-985.
- PICKER L.J.**, KISHIMOTO T.K., SMITH C.W., WARNOCK R.A. & BUTCHER E.C. 1991a. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* **349**: 796-799.
- PICKER L.J.**, WARNOCK R.A., BURNS A.R., DOERSCHUK C.M., BERG E.L. & BUTCHER E.C. 1991b. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* **66**: 921-933.
- PIERCEALL W.E.**, WOODARD A.S., MORROW J.S., RIMM D. & FEARON E.R. 1995. Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **11**: 1319-1326.
- POLITI K.**, ZAKOWSKI M.F., FAN P.D., SCHONFELD E.A., PAO W. & VARMUS H.E. 2006. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* **20**: 1496-1510.
- PONTA H.**, SHERMAN L. & HERRLICH P.A. 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 33-45.
- PREVOST N.**, WOULFE D., TANAKA T. & BRASS L.F. 2002. Interactions between Eph kinases and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation once cell-to-cell contact has occurred. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9219-9224.
- PRIMIANO T.**, BAIG M., MALIYEKKEK A., CHANG B.D., FELLARS S., SADHU J., AXENOVICH S.A., HOLZMAYER T.A. & RONINSON I.B. 2003. Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell* **4**: 41-53.
- RAVEH S.**, GAVERT N. & BEN-ZE'EV A. 2009. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett.*
- REDDY S.P.**, VUONG H. & ADISESHIAH P. 2003. Interplay between proximal and distal promoter elements is required for squamous differentiation marker induction in the bronchial epithelium: role for ESE-1, Sp1, and AP-1 proteins. *J Biol Chem* **278**: 21378-21387.
- REDIES C.** 1997. Cadherins and the formation of neural circuitry in the vertebrate CNS. *Cell Tissue Res* **290**: 405-413.
- REGIMBALD L.H.**, PILARSKI L.M., LONGENECKER B.M., REDDISH M.A., ZIMMERMANN G. & HUGH J.C. 1996. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res* **56**: 4244-4249.
- REILLY R.B.**, POLSEN J.A. & LUCHI R.J. 1994. Erythropoietin therapy for anemia in two nonagenarians. *J Am Geriatr Soc* **42**: 114-115.

LITERATURVERZEICHNIS

- RENDAHL K.G.,** LEFF S.E., OTTEN G.R., SPRATT S.K., BOHL D., VAN ROEY M., DONAHUE B.A., COHEN L.K., MANDEL R.J., DANOS O. & SNYDER R.O. 1998. Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors. *Nat Biotechnol* **16**: 757-761.
- RESNITZKY D.,** GOSSEN M., BUJARD H. & REED S.I. 1994. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* **14**: 1669-1679.
- RHODES K. & OSHIMA R.G.** 1998. A regulatory element of the human keratin 18 gene with AP-1-dependent promoter activity. *J Biol Chem* **273**: 26534-26542.
- RISSE-HACKL G.,** ADAMKIEWICZ J., WIMMEL A. & SCHUERMAN M. 1998. Transition from SCLC to NSCLC phenotype is accompanied by an increased TRE-binding activity and recruitment of specific AP-1 proteins. *Oncogene* **16**: 3057-3068.
- RKI** 2000. Krebskrankheiten. Robert Koch Institut, Berlin, <http://www.rki.de>
- ROSETTE C.,** ROTH R.B., OETH P., BRAUN A., KAMMERER S., EKBLUM J. & DENISSENKO M.F. 2005. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **26**: 943-950.
- ROUGON G. & HOBERT O.** 2003. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu Rev Neurosci* **26**: 207-238.
- RUBIN H.** 1999. Cell damage, aging and transformation: a multilevel analysis of carcinogenesis. *Anticancer Res* **19**: 4877-4886.
- RUBIN P.,** SONI A. & WILLIAMS J.P. 1999. The molecular and cellular biologic basis for the radiation treatment of benign proliferative diseases. *Semin Radiat Oncol* **9**: 203-214.
- RUOSLAHTI E. & PIERSCHBACHER M.D.** 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**: 491-497.
- RUOSLAHTI E.,** SUZUKI S., HAYMAN E.G., ILL C.R. & PIERSCHBACHER M.D. 1987. Purification and characterization of vitronectin. *Methods Enzymol* **144**: 430-437.
- RUPPERT M.,** AIGNER S., HUBBE M., YAGITA H. & ALTEVOGT P. 1995. The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol* **131**: 1881-1891.
- SAAD B.,** CONSTAM D.B., ORTMANN R., MOOS M., FONTANA A. & SCHACHNER M. 1991. Astrocyte-derived TGF-beta 2 and NGF differentially regulate neural recognition molecule expression by cultured astrocytes. *J Cell Biol* **115**: 473-484.
- SABBAH M.,** COURILLEAU D., MESTER J. & REDEUILH G. 1999. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11217-11222.
- SATO S.,** KOPITZ C., SCHMALIX W.A., KESSLER H., SCHMITT M., KRUGER A., MAGDOLEN V. 2002. High affinity urokinase-derived cyclic peptides inhibiting urokinase/urokinase receptor interaction: effects on tumor growth and spread. *FEBS Lett* **528**:212-216.
- SCHINDLER U. & BAICHWAL V.R.** 1994. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* **14**: 5820-5831.
- SCHREIBER M.,** KOLBUS A., PIU F., SZABOWSKI A., MOHLE-STEINLEIN U., TIAN J., KARIN M., ANGEL P. & WAGNER E.F. 1999. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* **13**: 607-619.
- SCHREIBER M.,** POIRIER C., FRANCHI A., KURZBAUER R., GUENET J.L., CARLE G.F. & WAGNER E.F. 1997. Structure and chromosomal assignment of the mouse fra-1 gene, and its exclusion as a candidate gene for oc (osteosclerosis). *Oncogene* **15**: 1171-1178.
- SEBENS MUERKOSTER S.,** KOTTERITZSCH J., GEISMANN C., GAST D., KRUSE M.L., ALTEVOGT P., FOLSCH U.R. & SCHAFFER H. 2009. alpha5-integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Oncol* **34**: 243-253.

LITERATURVERZEICHNIS

- SENNER V., KISMANN E., PUTTMANN S., HOESS N., BAUR I. & PAULUS W.** 2002. L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. *Glia* **38**: 146-154.
- SETIADI H., DISDIER M., GREEN S.A., CANFIELD W.M. & MCEVER R.P.** 1995. Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J Biol Chem* **270**: 26818-26826.
- SHAULIAN E. & KARIN M.** 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**: 2390-2400.
- SHTUTMAN M., LEVINA E., OHOUO P., BAIG M. & RONINSON I.B.** 2006. Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* **66**: 11370-11380.
- SHTUTMAN M., ZHURINSKY J., SIMCHA I., ALBANESE C., D'AMICO M., PESTELL R. & BEN-ZE'EV A.** 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5522-5527.
- SIMMONS D., MAKGOBA M.W. & SEED B.** 1988. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* **331**: 624-627.
- SLAMON D.J., LEYLAND-JONES B., SHAK S., FUCHS H., PATON V., BAJAMONDE A., FLEMING T., EIERMANN W., WOLTER J., PEGRAM M., BASELGA J. & NORTON L.** 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **344**: 783-792.
- SMEAL T., ANGEL P., MEEK J. & KARIN M.** 1989. Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev* **3**: 2091-2100.
- SONDEREGGER P., KUNZ S., RADER C., BUCHSTALLER A., BERGER P., VOGT L., KOZLOV S.V., ZIEGLER U., KUNZ B., FITZLI D. & STOECKLI E.T.** 1998. Discrete clusters of axonin-1 and NgCAM at neuronal contact sites: facts and speculations on the regulation of axonal fasciculation. *Prog Brain Res* **117**: 93-104.
- SPRINGER T.A.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-314.
- STEFANOVA I., HILGERT I., BAZIL V., KRISTOFOVA H. & HOREJSI V.** 1989. Human leucocyte surface glycoprotein CDw44 and lymphocyte homing receptor are identical molecules. *Immunogenetics* **29**: 402-404.
- STETLER-STEVENSON W.G.** 1999. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* **103**: 1237-1241.
- STRALEY K.S. & GREEN S.A.** 2000. Rapid transport of internalized P-selectin to late endosomes and the TGN: roles in regulating cell surface expression and recycling to secretory granules. *J Cell Biol* **151**: 107-116.
- SUZUKI S.T.** 1996a. Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J Cell Sci* **109 (Pt 11)**: 2609-2611.
- SUZUKI S.T.** 1996b. Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J Cell Biochem* **61**: 531-542.
- SUZUKI T., HASHIMOTO Y., OKUNO H., SATO H., NISHINA H. & IBA H.** 1991a. High-level expression of human c-jun gene causes cellular transformation of chicken embryo fibroblasts. *Jpn J Cancer Res* **82**: 58-64.
- SUZUKI T., OKUNO H., YOSHIDA T., ENDO T., NISHINA H. & IBA H.** 1991b. Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Res* **19**: 5537-5542.
- SWAROOP A., XU J.Z., PAWAR H., JACKSON A., SKOLNICK C. & AGARWAL N.** 1992. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 266-270.
- TCHERNITSA O.I., SERS C., ZUBER J., HINZMANN B., GRIPS M., SCHRAMME A., LUND P., SCHWENDEL A., ROSENTHAL A. & SCHAFFER R.** 2004. Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells. *Oncogene* **23**: 4536-4555.

- TESSIER-LAVIGNE M. & GOODMAN C.S.** 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**: 1123-1133.
- THELEN K., KEDAR V., PANICKER A.K., SCHMID R.S., MIDKIFF B.R. & MANESS P.F.** 2002. The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* **22**: 4918-4931.
- THIES A., MAUER S., FODSTAD O. & SCHUMACHER U.** 2007. Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer* **96**: 609-616.
- THIES A., MOLL I., BERGER J. & SCHUMACHER U.** 2001a. Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *Br J Cancer* **84**: 819-823.
- THIES A., MOLL I., BERGER J., WAGENER C., BRUMMER J., SCHULZE H.J., BRUNNER G. & SCHUMACHER U.** 2002a. CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol* **20**: 2530-2536.
- THIES A., PFULLER U., SCHACHNER M., HORNY H.P., MOLLS I. & SCHUMACHER U.** 2001b. Binding of mistletoe lectins to cutaneous malignant melanoma: implications for prognosis and therapy. *Anticancer Res* **21**: 2883-2887.
- THIES A., SCHACHNER M., MOLL I., BERGER J., SCHULZE H.J., BRUNNER G. & SCHUMACHER U.** 2002b. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* **38**: 1708-1716.
- TKACH V., TULCHINSKY E., LUKANIDIN E., VINSON C., BOCK E. & BEREZIN V.** 2003. Role of the Fos family members, c-Fos, Fra-1 and Fra-2, in the regulation of cell motility. *Oncogene* **22**: 5045-5054.
- TOOLE B.P., BISWAS C. & GROSS J.** 1979. Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 6299-6303.
- TULCHINSKY E.** 2000. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol Histopathol* **15**: 921-928.
- TUMORZENTRUM MÜNCHEN 2005.** Manual Mammakarzinom. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 10. Auflage.
- TURLEY E.A., AUSTEN L., MOORE D. & HOARE K.** 1993. Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion. *Exp Cell Res* **207**: 277-282.
- TUVIA S., GARVER T.D. & BENNETT V.** 1997. The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines ankyrin-binding activity and patterns of cell segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12957-12962.
- TZIRCOTIS G., THORNE R.F. & ISACKE C.M.** 2005. Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding. *J Cell Sci* **118**: 5119-5128.
- UHR J.W., SCHEUERMANN R.H., STREET N.E. & VITETTA E.S.** 1997. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med* **3**: 505-509.
- URLINGER S., BARON U., THELLMANN M., HASAN M.T., BUJARD H. & HILLEN W.** 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7963-7968.
- VACHEROT F., TERRY S., FAUCON H., QUEIRES L., CHEN M.W., YANG X., GIL DIEZ DE MEDINA S., VERDIER A., AZOULAY S., ALLORY Y., ABBOU C.C., BUTTYAN R. & DE LA TAILLE A.** 2005. [Protocadherin-PC discovery and its implication in prostate cancer progression]. *Prog Urol* **15**: 1294-1302.
- VALLONE D., BATTISTA S., PIERANTONI G.M., FEDELE M., CASALINO L., SANTORO M., VIGLIETTO G., FUSCO A. & VERDE P.** 1997. Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product. *EMBO J* **16**: 5310-5321.

LITERATURVERZEICHNIS

- VAN DAM H. & CASTELLAZZI M. 2001. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* **20**: 2453-2464.
- VAN DAM H., DUYN DAM M., ROTTIER R., BOSCH A., DE VRIES-SMITS L., HERRLICH P., ZANTEMA A., ANGEL P. & VAN DER EB A.J. 1993. Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J* **12**: 479-487.
- VAN DE STOLPE A., JACOBS N., HAGE W.J., TERTOOLEN L., VAN KOOYK Y., NOVAKOVA I.R. & DE WITTE T. 1996. Fibrinogen binding to ICAM-1 on EA.hy 926 endothelial cells is dependent on an intact cytoskeleton. *Thromb Haemost* **75**: 182-189.
- VAN DE STOLPE A. & VAN DER SAAG P.T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* **74**: 13-33.
- VAN DER FLIER A. & SONNENBERG A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**: 285-298.
- VAN DER LOOP F.T., SCHAART G., LANGMANN H., RAMAEKERS F.C. & VIEBAHN C. 1995. Rearrangement of intercellular junctions and cytoskeletal proteins during rabbit myocardium development. *Eur J Cell Biol* **68**: 62-69.
- VEIKKOLA T. & ALITALO K. 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* **9**: 211-220.
- VIAL E. & MARSHALL C.J. 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.
- VIAL E., SAHAI E. & MARSHALL C.J. 2003. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* **4**: 67-79.
- VOGT B., MUSHACK J., SEFFER E. & HARING H.U. 1990. The phorbol ester TPA induces a translocation of the insulin sensitive glucose carrier (GLUT4) in fat cells. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 1089-1094.
- VOGT P.K. & BOS T.J. 1990. jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res* **55**: 1-35.
- VOGT P.K. & MORGAN I. 1990. The genetics of jun. *Semin Cancer Biol* **1**: 27-36.
- VOURA E.B., RAMJEESINGH R.A., MONTGOMERY A.M. & SIU C.H. 2001. Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* **12**: 2699-2710.
- WALSH F.S. & DOHERTY P. 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 425-456.
- WALSH F.S., MEIRI K. & DOHERTY P. 1997. Cell signalling and CAM-mediated neurite outgrowth. *Soc Gen Physiol Ser* **52**: 221-226.
- WANG C.H. & TANG C.W. 2002. [Inhibition of activator protein-1 on the growth of gastric cancer by octreotide]. *Ai Zheng* **21**: 850-854.
- WANG H.S., HUNG Y., SU C.H., PENG S.T., GUO Y.J., LAI M.C., LIU C.Y. & HSU J.W. 2005. CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (alpha L beta2) and VLA-4 (alpha4beta1). *Exp Cell Res* **304**: 116-126.
- WATTS R.G., HUANG C., YOUNG M.R., LI J.J., DONG Z., PENNIE W.D. & COLBURN N.H. 1998. Expression of dominant negative Erk2 inhibits AP-1 transactivation and neoplastic transformation. *Oncogene* **17**: 3493-3498.
- WEINBERG R.A. 1995. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci* **758**: 331-338.
- WELLER A., ISENMANN S. & VESTWEBER D. 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* **267**: 15176-15183.

LITERATURVERZEICHNIS

- WERB Z.** 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**: 439-442.
- WILLIAMS A.F. & BARCLAY A.N.** 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* **6**: 381-405.
- WISDON R. & VERMA I.M.** 1993. Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol Cell Biol* **13**: 7429-7438.
- WISNIEWSKA M.B., AMEYAR-ZAZOUA M., BAKIRI L., KAMINSKA B., YANIV M. & WEITZMAN J.B.** 2007. Dimer composition and promoter context contribute to functional cooperation between AP-1 and NFAT. *J Mol Biol* **371**: 569-576.
- WOLFSBERG T.G., PRIMAKOFF P., MYLES D.G., WHITE J.M.** 1995. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* **131**:275-8.
- WOODHOUSE E.C., CHUAQUI R.F. & LIOTTA L.A.** 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer* **80**: 1529-1537.
- WU Q. & MANIATIS T.** 1999. A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell* **97**: 779-790.
- XIONG J.P., LI R., ESSAFI M., STEHLE T. & ARNAOUT M.A.** 2000. An isoleucine-based allosteric switch controls affinity and shape shifting in integrin CD11b A-domain. *J Biol Chem* **275**: 38762-38767.
- YAGI T. & TAKEICHI M.** 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* **14**: 1169-1180.
- YANCOPOULOS G.D., DAVIS S., GALE N.W., RUDGE J.S., WIEGAND S.J. & HOLASH J.** 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**: 242-248.
- YOUNG M.R., LI J.J., RINCON M., FLAVELL R.A., SATHYANARAYANA B.K., HUNZIKER R. & COLBURN N.** 1999. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9827-9832.
- ZEN K., LIU D.Q., GUO Y.L., WANG C., SHAN J., FANG M., ZHANG C.Y. & LIU Y.** 2008. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS ONE* **3**: e1826.
- ZENZ R., EFERL R., SCHEINECKER C., REDLICH K., SMOLEN J., SCHONTHALER H.B., KENNER L., TSCHACHLER E. & WAGNER E.F.** 2008. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* **10**: 201.
- ZERIAL M., TOSCHI L., RYSECK R.P., SCHUERMANN M., MULLER R. & BRAVO R.** 1989. The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J* **8**: 805-813.
- ZIFF E.B.** 1990. Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site. *Trends Genet* **6**: 69-72.
- ZOUMPOURLIS V., PAPASSAVA P., LINARDOPOULOS S., GILLESPIE D., BALMAIN A. & PINTZAS A.** 2000. High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene* **19**: 4011-4021.

Ohne die Menge an Unterstützungen, sowohl in fachlicher als auch in moralischer Hinsicht, wäre die vorliegende Dissertation nicht zustande gekommen. All jenen, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit abzuschließen, möchte ich hiermit danken.

In erster Linie möchte ich mich herzlich bei meiner „Doktormutter“ Frau Dr. rer. nat. habil Karin Milde-Langosch für die Überlassung des interessanten Themas bedanken. Ganz besonders danke ich ihr, dass ich zu jeder Zeit mit allen Fragen und Problemen zu ihr kommen konnte und sie durch ihre stete Diskussionsbereitschaft und vielen hilfreichen Ratschlägen im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Elke Pratje danke ich ganz herzlich für die Bereitschaft, diese Dissertation als Vertreterin des Fachbereiches Biologie zu begutachten.

Herrn Prof. Dr. med. Fritz Jänicke, dem Institutsdirektor der Frauenklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich nicht nur für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor fortzuführen, sondern auch für sein Interesse meine Arbeit vorbehaltlos zu unterstützen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning, in dessen Laboren der Gynäkopathologie der erste Teil dieser Arbeit angefertigt wurde und den ehemaligen Mitarbeiterinnen Gabriele Rieck und Bianca Kelb für die nette Zusammenarbeit und die Einführung in die ersten Zellkultur-Methoden.

Besondere Dankesworte möchte ich an meinen neuen Chef Prof. Dr. med. Udo Schumacher richten, er hat mir nicht nur ermöglicht diese Arbeit in seinen Räumlichkeiten zuende zu führen, sondern hat auch dieses Manuskript kritisch durchgesehen und stand mir mit seinen unermühtlichen Anregungen und Ideen zu jeder Zeit zur Seite.

Zudem danke ich Dr.rer.nat. Daniel Wicklein für die Hilfe bei der Durchführung der FACS-Analysen und Ullrich Richter für die Einführung in die Zellflussversuche.

Dr. Thomas Streichert und Kristin Reeck vom Institut für klinische Chemie sowie Dr. Ralph Wirtz von der Firma Siemens Medical Solution danke ich für die Durchführung der Genexpressionsanalysen.

Für die offene und familiäre Atmosphäre sowie ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft im Labor möchte ich mich ganz herzlich bei Sylke Krenkel, Kati Beck und Dr. rer. nat. Sibyll Hein bedanken, die mir im Laufe der Zeit zu wirklichen Freunden geworden sind.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit, die zahlreichen Tipps, Aufmunterungen und vor allem für unsere nette und gemütliche Atmosphäre in unserem kleinen Büro danke ich Dr. rer. nat. Imke Müller.

Weiterhin geht mein Dank auch an meine „neue“ Arbeitsgruppe im Institut für Anatomie II, die mich freundlich und offen aufgenommen hat und mir gerade während des Schreibens mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank an Frau Ursula Makowski, für ihre Geduld beim Formatieren dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders auch bei meinen Freunden Moni, Karsten, Miri, Elmar, Stephanie, Hannes und Jan, die mich in allen Situationen immer freundschaftlich begleitet haben und das Projekt „Dr.-Arbeit“ mit Geduld und seelischer Fürsorge unterstützt haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, mit denen ich die alltäglichen Laborprobleme jederzeit besprechen konnte und die mir durch unseren Zusammenhalt half, die notwendigen Energiereserven wieder aufzutanken oder mich wieder zum Lachen brachten, wenn mir einmal nicht mehr zum Lachen zu mute war.

Danke...!

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt habe oder mich anderwertig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 21.07.2009 Christine Schröder