

Aus dem Institut für Gynäkopathologie
Diagnostik-Zentrum
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Th. Löning

**Untersuchungen zur Rolle der Transkriptionsfaktoren Fra1 und Fra2
in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231**

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

Ines Wagner
aus Frankfurt am Main

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 08.07.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Jänicke

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Mammakarzinom | 1 |
| 1.2 Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie | 7 |
| 1.2.1 Die Jun-Gruppe | 9 |
| 1.2.2 Die Fos-Gruppe | 11 |
| 1.3 Der Zellzyklus und seine Regulatoren | 16 |
| 1.4 Regulatoren der Invasivität | 18 |
| 1.4.1 Das uPA/uPAR/PAI-System | 19 |
| 1.4.2 Die Matrix-Metalloproteinasen | 20 |
| 1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit | 22 |
| | |
| 2 Material und Methoden | 23 |
| 2.1 Material | 23 |
| 2.1.1 Zelllinie | 23 |
| 2.1.2 Verwendete siRNA | 23 |
| 2.1.3 Verwendete Antikörper | 24 |
| 2.1.4 Verwendete Reagenzien | 25 |
| 2.1.5 Häufig verwendete Lösungen und Puffer | 26 |
| 2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 2.2 Methoden | 28 |
| 2.2.1 Zellkultur | 28 |
| 2.2.2 siRNA-Transfektion | 29 |
| 2.2.2.1 Ausplattieren der Zellen | 29 |
| 2.2.2.2 Transfektion | 29 |
| 2.2.2.3 Ernten der Zellen | 31 |
| 2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration | 31 |
| 2.2.4 Western Blot-Analyse | 32 |
| 2.2.4.1 Vorbereitung der Proben | 32 |
| 2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 32 |
| 2.2.4.3 Blotting | 33 |
| 2.2.4.4 Blockierung | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.4.5 Detektion | 34 |
| 2.2.4.6 Densitometrische Auswertung | 36 |
| 2.2.4.7 Reblot-Verfahren | 36 |
| 2.2.5 Invasionsassay | 36 |
| 2.2.5.1 Start des Invasionsassays | 36 |
| 2.2.5.2 Färben der Matrigel- und Control-Membranen | 38 |
| 2.2.5.3 Auswertung des Invasionsassays | 38 |
| 2.2.6 Zellproliferations-Test (MTT-Test) | 39 |
| 2.2.7 Objektträger | 40 |
| 3 Ergebnisse | 41 |
| 3.1 Erfolgskontrolle des Western-Blot | 41 |
| 3.2 Erfolgskontrolle der siRNA-Transfektion | 41 |
| 3.2.1 Negativ- und Positivkontrolle | 41 |
| 3.2.2 Fra1 | 42 |
| 3.2.3 Fra2 | 42 |
| 3.3 Morphologie | 43 |
| 3.3.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1 | 45 |
| 3.3.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2 | 45 |
| 3.4 Zielgene | 45 |
| 3.4.1 Mitglieder der AP1-Familie | 46 |
| 3.4.1.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1 | 46 |
| 3.4.1.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2 | 47 |
| 3.4.2 Regulatoren des Zellzyklus | 47 |
| 3.4.2.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1 | 48 |
| 3.4.2.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2 | 49 |
| 3.4.3 Regulatoren der Invasivität | 49 |
| 3.4.3.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1 | 50 |
| 3.4.3.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2 | 50 |
| 3.5 Gesamtproteinmengen | 51 |
| 3.6 Proliferation | 52 |
| 3.7 Invasivität | 54 |
| 3.7.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1 | 55 |
| 3.7.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2 | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 3.8 Motilität | 56 |
| 3.8.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1 | 57 |
| 3.8.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2 | 58 |
| 3.9 Invasionsindex | 58 |
| 4 Diskussion | 60 |
| 4.1 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf die Morphologie der MDA-MB231-Zellen | 60 |
| 4.2 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf Mitglieder der AP1-Familie als Zielgene in MDA-MB231-Zellen | 61 |
| 4.3 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf Proliferation, Gesamtproteinmenge und auf Regulatoren des Zellzyklus als AP1-Zielgene in MDA-MB231-Zellen | 63 |
| 4.4 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf Regulatoren der Invasivität als AP1-Zielgene in MDA-MB231-Zellen | 65 |
| 4.5 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf Invasivität und Motilität der MDA-MB231-Zellen | 66 |
| 5 Zusammenfassung | 71 |
| 6 Literaturverzeichnis | 73 |
| 7 Anhang | 97 |
| 7.1 Verwendete Abkürzungen | 97 |
| 7.2 Danksagung | 101 |
| 7.3 Lebenslauf | 102 |
| 7.4 Erklärung | 103 |

1 Einleitung

1.1 *Das Mammakarzinom*

Als häufigste maligne Neoplasie bei Frauen der westlichen Welt betrifft das Mammakarzinom, betrachtet man das Lebenszeitrisko, mehr als jede sechste Frau [Böcker 2001]. Mit einer Neuerkrankungsrate von 60-70 pro 100000 Frauen pro Jahr stellt es die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen 35 und 55 Jahren dar, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 62 Jahren liegt [Böcker 2001, GEKID 2006]. Als prädisponierende Faktoren lassen sich zunehmendes Alter, genetische Prädisposition, positive Familienanamnese, vermehrter Östrogeneinfluss, Adipositas und Umweltfaktoren nennen.

Genetische Mutationen lassen sich nur in den wenigsten Fällen, in ca. 5-10 %, nachweisen. Im Modell der Mehrschrittcarzinogenese wird diskutiert, wie es aufgrund von molekularen Veränderungen auf genetischer Ebene über die Zwischenschritte der Hyperplasie, der prä-malignen Veränderung und des Carcinoma in situ schließlich zur Ausbildung des invasiven Stadiums des Mammakarzinoms kommen kann [Beckmann et al. 1997]. Hierbei stehen vor allem Mutationen von Tumorsuppressorgenen, wie z.B. BRCA-1, BRCA-2 (Mamma-Ovarialkarzinom-Syndrom) oder p53 (Li-Fraumeni-Syndrom), sowie von Onkogenen, z.B. der Gene des EGF-Rezeptors oder des HER2/neu-Rezeptors, im Vordergrund. Ist auch der Großteil aller Krebserkrankungen der weiblichen Brustdrüse ohne erkennbare genetische Ursache, so lässt doch die Tatsache, dass sich das eigene Erkrankungsrisiko um das 1,2 bis 3fache erhöht, wenn schon ein Familienmitglied ersten Grades erkrankt ist, darauf schließen, dass weitere vererbliche Faktoren eine Rolle spielen müssen [Böcker 2001].

Ein langer oder vermehrter Östrogeneinfluss, z.B. durch frühe Menarche bzw. späte Menopause, Kinderlosigkeit oder hohes Alter bei der ersten Schwangerschaft, gehen ebenfalls mit einem erhöhten Risiko einher. Im Rahmen dessen wird auch die Einnahme von Kontrazeptiva und eine Hormonsubstitutionstherapie, teils kontrovers, diskutiert [Diedrich 2000, Flötotto et al. 2001, Antoine et al. 2004]. Eine neuere Studie berichtet in diesem Zusammenhang über eine wahrscheinliche Verbindung zwischen dem verminderten Einsatz der Hormonsubstitu-

tionstherapie und der Abnahme der Brustkrebs-Inzidenz in postmenopausalen Frauen in den USA [Ravdin et al. 2007].

Bei den Umweltfaktoren kommt dem so genannten „Life-Style“ eine gewisse Bedeutung zu, da man belegen konnte, dass der industrielle Status des Landes nicht allein maßgebend für die Inzidenz des Mammakarzinoms ist. Weitere Bedeutung finden hier Faktoren wie Ernährungsgewohnheiten und in diesem Sinne besonders die Aufnahme von Fetten und Alkohol, sowie bestimmte ethnische Zugehörigkeit und allgemeine Lebensbedingungen [Gilliland 1997, Diedrich 2000, Gerber und Mylonas 2003].

Eingeteilt werden die Mammakarzinome in die Gruppe der duktaalen und der lobulären Karzinome. Diese Einteilung bezieht sich auf den Ursprungsort der entartenden Epithelzellen. Bei den duktaalen Karzinomen befindet sich dieser in den Milchgängen, von wo aus die Karzinomzellen zunächst segmental, kohäsiv in den Drüsenbaum einwachsen, wohingegen die malignen Zellen bei den lobulären Karzinomen ihren Ausgang von der terminalen duktuolobulären Einheit nehmen. Sie haben hierbei häufig ihren Zellzusammenhang aufgrund einer Mutation im Gen des E-Cadherin, eines Adhäsionsmoleküls, verloren [Berx et al. 1995]. Des Weiteren werden die präinvasiven In-situ-Karzinome mit noch nicht durchbrochener Basalmembran von den invasiven Karzinomen unterschieden. Bei den Präkanzerosen wird auch hier die duktaale von der lobulären Form unterschieden: DCIS (duktaales Carcinoma in situ), welches 95 % aller In-situ-Karzinome ausmacht, und CLIS (Carcinoma lobulare in situ), welches die restlichen 5 % stellt. Ist die Basalmembran einmal durchbrochen, d.h. ist der Tumor vom prämaligen Stadium in ein invasives Stadium übergegangen, so finden sich ca. 40-75 % duktaale und ca. 5-15 % lobuläre Karzinome. Hierbei ist zu beachten, dass die invasiv duktaalen Tumoren keine einheitliche histologische Entität darstellen und daher auch unter dem Begriff NOS-Karzinome (not otherwise specified) zusammengefasst werden. Die restlichen Prozente entfallen auf seltenere Unterformen, z.B. auf das tubuläre, das invasive kribriiforme oder das medulläre Karzinom [Diedrich 2000, Böcker 2001, Tavassoli und Devilee 2003].

Die meisten Mammakarzinome finden sich im lateralen, oberen Quadranten der Brustdrüse, da hier auch der größte Anteil an Drüsengewebe vorhanden ist. In der überwiegenden Zahl der Fälle wird der Tumor von der Frau selbst durch Tasten entdeckt. Die Ausbreitung erfolgt frühzeitig über eine lymphogene und hämatogene Metastasierung, wobei über die Lymphwege bevorzugt die axillären Lymphknotenstationen betroffen werden und die Aussaat von Tu-

morzellen über die Blutbahn hauptsächlich zu Metastasen in Skelett (70 %), Lunge (60 %) und Leber (50 %) führt [Böcker 2001].

Unter prognostischen Gesichtspunkten lassen sich die „klassischen“ von den neueren Prognosefaktoren abgrenzen. Zu Ersteren zählt man neben der internationalen TNM-Klassifikation den histologischen Subtyp, dessen Grading und Steroidhormonrezeptorstatus sowie das Alter der Patientin.

Die Ausbreitung des Tumors im Körper, das so genannte Staging, ist prognostisch wichtigster Parameter. In der in den 50er Jahren entwickelten pTNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) sind Größe des Primärherdes, Lokalisation, Größe und Anzahl der befallenen Lymphknoten sowie der Fernmetastasen zusammengefasst. Zusätzlich dazu teilt man im Grading die Malignität unter Berücksichtigung von Differenzierungsgrad, Kernpolymorphismen und Anzahl der Mitosen in drei verschiedene Grade ein, wobei höhere Grade mit einer weitaus ungünstigeren Prognose einhergehen als niedrigere Grade.

Ein weiteres, vor allem therapeutisch wichtiges Kriterium zur Risikoabschätzung ist die immunhistochemische Bestimmung des Status der Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptoren (PR). Bei prämenopausalen Patientinnen weist das Mammakarzinom in 50-60 % der Fälle Östrogenrezeptoren auf, während sich die Zahl bei postmenopausalen Patientinnen sogar auf 70-80 % beläuft. Bei Letzteren ist der Rezeptorgehalt mehr als um das Dreifache gegenüber dem der prämenopausalen Patientinnen erhöht. Progesteronrezeptoren sind in 40 % der Fälle nachweisbar und in 30-35 % wurden sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren beschrieben [Schmidt-Matthiesen et al. 2002].

Allgemein kann man sagen, dass Östrogene, zumindest im Endometrium, stimulierende Effekte auf Wachstum und Proliferation von Zellen haben, während Gestagene die Synthese von Steroidhormonrezeptoren hemmen und antiproliferativ differenzierend wirken. Im Brustdrüsengewebe erscheinen diese Verhältnisse weniger klar.

Östrogen- wie auch Progesteronrezeptoren gehören zur Familie der nukleären, ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren und vermitteln ihre Wirkung mit Hilfe von Koregulatoren entweder direkt über den „klassischen“ Weg der „hormone responsive elements“ ihrer Zielgene oder indirekt über den so genannten „transcriptional cross-talk“, bei dem es sich um Protein-Protein-Interaktionen und nur sekundäre Interaktion mit der DNA handelt, und in den auch Mitglieder der AP1-Transkriptionsfaktorfamilie involviert sind [Rocheffort 1995, Mangelsdorf et al. 1995, Katzenellenbogen 1996, Göttlicher et al. 1998, Flötotto et al. 2001]. Sowohl der

Östrogen- als auch der Progesteron-Rezeptor liegen in jeweils zwei Isoformen vor: ER α und ER β sowie PR-A und PR-B.

Die Progesteronrezeptorsubtypen wurden erstmals von Sherman et al. im Jahre 1970 an Hühnereileitern beschrieben [Sherman et al. 1970]. Beim Menschen werden beide Formen auf dem gleichen Gen codiert, aber abhängig von verschiedenen Promotoren exprimiert, so dass sich PR-A durch das Fehlen von 164 AS in der N-terminalen Region von PR-B unterscheidet [Conneely und Lydon 2000]. Für die meisten Zellen lässt sich sagen, dass PR-B eher als Aktivator der Transkription progesteronabhängiger Gene wirkt, PR-A hingegen die Transkription von Steroidhormonrezeptoren, z.B. die des PR-B und des ER, hemmt [Wen et al. 1994]. Gleichzeitig stellten sich die Promotorregionen beider PR als Östrogen-sensibel heraus [Kastner et al. 1990]. In einer Studie von Bamberger et al. konnte außerdem im Mammakarzinom eine positive Korrelation von PR-A und PR-B mit einem höher differenzierten Tumorphänotyp einerseits sowie mit einer erhöhter Expression des ER andererseits festgestellt werden [Bamberger et al. 2000].

Die beiden Unterformen des ER vermitteln die Wirkungen von Östrogenen und Antiöstrogenen in Brustkrebsgewebe und anderen östrogenabhängigen Zielgeweben. Sie weisen trotz ausgeprägter Homologien unterschiedliche Charakteristika bei der Bindung der Liganden auf [Olefsky 2001, Hayashi et al. 2003], was unter anderem eine Erklärung für die teils gegensätzlichen, zielgewebs- und promotorspezifischen Effekte von Östrogenen und Antiöstrogenen sein könnte.

Hieraus entwickelte sich schon vor mehr als 50 Jahren der Ansatz für die endokrine Therapie des Mammakarzinoms. Über die Beeinflussung des hormonellen Milieus werden beispielsweise ablative Verfahren wie die Ovariectomie oder der medikamentöse Einsatz des Antiöstrogens Tamoxifen, von Aromatasehemmern und LHRH-Agonisten angewandt. Unter adjuvanter Tamoxifen-Therapie konnte die Rezidivrate in ER-positiven Tumoren in 5 Jahren um 50 %, beim ER-negativen Mammakarzinom um 6 % gesenkt werden [Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998, Duffy 2005].

In der Forschung der letzten Jahre wurden immer mehr Faktoren entdeckt, die in der Pathogenese des Mammakarzinoms und damit auch in dessen Prognose eine Rolle spielen, und die man daher als „neuere“ Prognosefaktoren bezeichnet. Auf die Wichtigsten soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

HER2/neu-Rezeptor

Die für die Karzinogenese von Tumoren der Mamma wichtigsten Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind der EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor oder auch HER1) sowie der ihm nah verwandte HER2/neu-Rezeptor, auch unter dem Namen c-erbB2 bekannt, dessen Ligand noch nicht bekannt ist. Bei beiden handelt es sich um transmembranäre Tyrosinkinase-Rezeptoren, die in 40 % bzw. 25-30 % aller Mammakarzinome überexprimiert werden und negativ mit dem Östrogenrezeptorstatus korrelieren [Coradini und Daidone 2004]. Diese vermehrte Expression wirkt sich negativ auf das tumorfreie Überleben aus [Torregrosa et al. 1997, Tsutsui et al. 2002]. An Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von HER2/neu mit erhöhter Mitoserate, Zellmotilität und Invasionsneigung, sowie mit vermehrter maligner Transformation und Metastasierung einhergeht [Olayioye et al. 2000]. Der aus dieser Erkenntnis abgeleitete therapeutische Ansatz führte zur Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab, der spezifisch an die extrazelluläre Domäne von HER2/neu bindet. In der Therapie mit Trastuzumab allein werden Ansprechraten von 26 %, in der Kombination mit Chemotherapeutika sogar von 63 % bis 79 % erzielt [Ocaña et al. 2005]. Weil eine Überexpression von HER2/neu für eine Tumorregression durch Trastuzumab Voraussetzung ist, und weil Trastuzumab neben anderen Wirkungsmechanismen eine zytotoxische Immunantwort induziert, die direkt mit der Menge an exprimiertem HER2/neu in Verbindung steht, ist die HER2/neu-Bestimmung mittels immunhistochemischer Verfahren oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von entscheidender Bedeutung.

Weitere Erfolg versprechende therapeutische Ansätze sind die neuartigen Tyrosinkinase-Inhibitoren. Hierzu gehört beispielsweise das Lapatinib, welches als dualer Tyrosinkinase-Inhibitor selektiv die EGFR- und HER2/neu-Autophosphorylierung hemmt und darüber die Proliferation von Tumoren beeinflusst [Nelson und Dolder 2006]. Es erwies sich besonders in Trastuzumab-refraktären Mammakarzinomen als vorteilhaft [Reid et al. 2007]. Aber auch EGFR-spezifische Inhibitoren der Tyrosinkinase wie Erlotinib, in Deutschland bereits für die Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des Pankreaskarzinoms zugelassen, oder Gefitinib bieten neue Möglichkeiten der Therapie und befinden sich für die Anwendung bei Brustkrebs in der Studienphase [Agrawal et al. 2005].

p53

Der Tumorsuppressor p53 gilt als der bedeutsamste negative Regulator des Zellzyklus und ist damit in die Inhibition des Zellzyklus und der Angiogenese, in die Induktion der Apoptose sowie in die Kontrolle der Stabilität des Genoms involviert [Vogelstein et al. 2000]. In 20-40 % aller humanen Krebsleiden liegt sein Gen in mutierter Form vor [Coradini und Daidone 2004], was oftmals über einen Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindungs-fähigkeit zu Störungen der Zellzyklusregulation führt. In Brustkrebs ist dies generell mit einer Verschlechterung der Prognose verbunden, wobei sich für das abnorme p53 eine positive Korrelation mit der Zellproliferationsrate und dem Grading bei gleichzeitiger negativer Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus zeigt [Bässler 1997]. Lisboa et al. fanden durch Untersuchungen an malignem und benignem Tumorgewebe in 55,7 % der infiltrierenden Karzinome sowie in 31,5 % der dukta- len In-situ-Karzinome (DCIS) Genabberationen des p53. Es zeigten sich außerdem positive Korrelationen mit High-grade Tumoren und mit den seltenen Komedokarzinomen, jedoch keinerlei statistisch signifikante Zusammenhänge mit dem Alter der Patientinnen, dem Menopausen- und Hormonrezeptorstatus, der Größe des Tumors oder der lymphatischen Invasion. Da die p53-Mutationen nicht nur in In-situ-Karzinomen, sondern auch in einer atypischen dukta- len Hyperplasie gefunden wurden, ließ sich daraus schließen, dass die Veränderungen des p53-Gens zeitlich früh in der Kanzerogenese auftreten [Lisboa et al. 1997]. Bergh et al. beschrieben, dass adjuvante Strahlen-, Chemo- und Hormontherapien durch Mutationen im p53-Gen in ihrer Effektivität negativ beeinflusst werden [Bergh et al. 1995].

Ki67

Das Zellproliferations-assoziierte Antigen Ki67 wurde 1991 von Gerdes et al. als nukleäres Protein identifiziert, welches unter Gebrauch des Antikörpers MIB1 an Paraffinschnitten immunhistochemisch dargestellt werden kann. Als Ausdruck der Proliferationskinetik korreliert es gut mit anderen Markern der Zellumsatzrate wie z.B. der S-Phase-Fraktion.

Es konnte gezeigt werden, dass sich in p53-mutierten Brustdrüsentumoren regelmäßig erhöhte, durch Ki67 bestimmte Proliferationsraten finden, und dass Ki67 negativ mit dem ER-Status und positiv mit dem Grading, der Tumorgröße und der Überexpression von HER2/neu korreliert. Ein hoher Wert an Ki67 geht außerdem mit einer besseren Ansprechrate auf Che-

motherapie einher, ist aber an sich ein Zeichen generell schlechter Prognose [Bässler 1997, Urruticoechea et al. 2005].

Da die Auswahl der Therapieoptionen und die Erfassung und Einteilung der Patienten in verschiedene Risikogruppen auf prognostischen und prädiktiven Faktoren beruht, werden in der derzeitigen Forschung immer mehr Faktoren diesbezüglich untersucht. Dazu zählen neben den bereits Genannten eine Vielzahl von Onkogenen (z.B. c-myc), Tumorsuppressorgenen (z.B. AT1, Rb1, BRCA1, BRCA2), Mediatoren des Zellzyklus wie z.B. die Cycline, Apoptose-assoziierte Proteine wie das Survivin als Inhibitor der Apoptose, Proteasen der extrazellulären Matrix und der Basalmembran (uPA/PAI1-System, MMPs, Cathepsin) sowie Faktoren der Neoangiogenese (VEGF). Auf einige hiervon wird später im Näheren eingegangen.

1.2 Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie

Transkriptionsfaktoren bilden das Endglied der zellulären Signaltransduktionskaskade, indem sie auf extrazelluläre Stimuli über die Regulation der Genexpression ihrer Zielgene mit einer komplexen biologischen Antwort reagieren. Unter dem Begriff der AP1-Familie (activating protein 1) fasst man dimerbildende Proteine zusammen, die entweder der Jun-Gruppe (JunB, c-Jun, JunD) oder der Fos-Gruppe (FosB sowie dessen kleinere Spleißvarianten FosB2 und Δ FosB, c-Fos, Fra1, Fra2) angehören. Die Dimerbildung findet jeweils an der sogenannten „leucine zipper region“ statt; einer Region, in der sich an jeder siebten Stelle die Aminosäure Leucin befindet, welche die Zusammenlagerung zweier AP1-Faktoren durch die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen ermöglicht. Unter den Jun- und Fos-Gruppen kommt es zu Heterodimerbildung, innerhalb der Jun-Gruppe auch zur Bildung von Homodimeren [Ransone und Verma 1990, Angel und Karin 1991, Karin et al. 1997]. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass Jun-Fos-Heterodimere sowohl eine grössere Stabilität als auch eine höhere Affinität zur DNA aufweisen als Jun-Jun-Homodimere [Halazonetis et al. 1988, Ryseck und Bravo 1991]. Darüber hinaus wird die Anzahl der möglichen Dimere auch noch durch die Dimerisation mit anderen bZip (basic leucine zipper)-Proteinen wie JDPs (Jun dimerization partners), ATF's (activating transcription factors), Maf-Proteinen (musculoaponeurotic fibrosarcoma) oder Maf-verwandten Proteinen erhöht [Shaulian und Karin 2001].

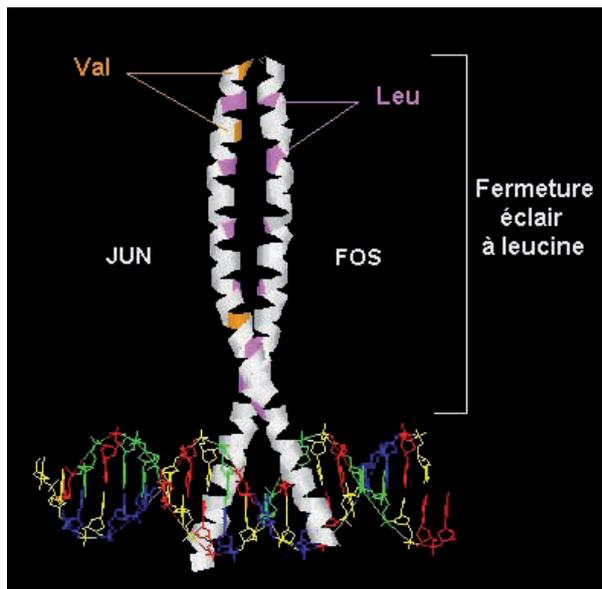


Abbildung 1.1

Graphische Darstellung der bZIP-Region eines an die AP1-Bindungsstelle der DNA gebundenen c-Jun/c-Fos-Heterodimerkomplexes.

[http://www.biochimie.univ-montp2.fr/licence/interact_adn/facteur_trscript/cjun/introcjun.htm am 04.02.2008]

Über die Bindung der Jun/Jun- oder Jun/Fos-Dimere an spezifische palindromische Sequenzen auf der DNA, die sogenannten 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA)-responsive elements (TREs) oder auch einfach AP1-Bindungsstellen, die in der Promotorregion und Enhancerregion von Zielgenen liegen, wird die Genaktivierung und damit die Transkription bestimmt [Lee et al. 1987].

Die Aktivität der Jun- und Fos-Proteine selbst ist hochkomplex und von vielerlei verschiedenen Einflüssen abhängig. Einerseits wird ihre Expressierung durch die Kontrolle ihrer eigenen Transkriptionsrate bestimmt, wobei für einige Faktoren der AP1-Familie auch autoregulatorische Mechanismen bekannt sind. c-Jun beispielsweise besitzt in seinem Promotor eine AP1-Bindungsstelle, über die eine positive Steuerung seines eigenen Genproduktes möglich ist, während sich bei c-Fos und FosB eine negative Autoregulation beobachten lässt. Andererseits kann die Aktivität der Transkriptionsfaktoren auch noch post-translational modifiziert werden. So beeinflusst die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen (MAPK, cdc2, PKA, PKC) die Stabilität der Fos-Proteine, ihre DNA-Bindungsaktivität und ihr Potential zur Transaktivierung [Gruda et al. 1994, Rosenberger et al. 1999, Hurd et al. 2002]. Weiterhin unterliegt ihre Aktivität dem Einfluss extrazellulärer Stimuli, hier im Besonderen von Zytokinen, z.B. IL-1 [Muegge et al. 1989] und TNF α [Brenner et al. 1989], Karzinogenen, Tumorpromotoren, Wachstumsfaktoren und klassischerweise dem Phorbol-ester TPA, sowie auch dem umweltbedingter Stressoren, z.B. kurzweiliger UV-Strahlung. Da die Genexpression der AP1-

Faktoren hierbei teilweise sehr rasch induziert wird, werden sie auch als „immediate early genes“ bezeichnet [Angel und Karin 1991, Karin 1995, Ransone und Verma 1990].

Unterschiedliche Aktivitäten ergeben sich auch unabhängig von extrazellulären Einflüssen aus der Vielzahl unterschiedlich kombinierter Dimerisationspartner. Die Wirkung auf die verschiedenen Promotoren hängt also zielgewebsspezifisch von ihrem jeweiligen Dimerisationspartner, dem Promotor selbst sowie von anderen auf diesen einwirkenden Transkriptionsfaktoren oder Ko-Aktivatoren ab [van Dam und Castellazzi 2001]. Auf Proteinebene können AP1-Dimere darüber hinaus mit Mitgliedern der Superfamilie nukleärer Rezeptoren wie dem ER, PR oder GR interagieren [Pfahl 1993].

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass maligne Transformation, Induktion von Apoptose oder Differenzierung ebenso wie verstärkte Invasivität und Vermehrung der Proliferation mit einer Veränderung in der Zusammensetzung des AP1-Komplexes einhergehen [Mechta et al. 1997, Pospelova et al. 1999, Darne et al. 2000, Soto et al. 2000, Finzer et al. 2000, Ng et al. 2000, Krosi und Sauvageau 2000]. In welchem Zusammenhang diese veränderte Expression steht, soll im Folgenden zu jedem Faktor der AP1-Familie kurz erläutert werden.

1.2.1 Die Jun-Gruppe

JunB

Aufgrund von verschiedenen Experimenten an Fibroblasten und granulozytären Progenitorzellen transgener Mäuse konnte durch die Ausschaltung von JunB diesem eine Funktion als Negativ-Regulator des Zellzyklus zugeschrieben werden, wobei die Wirkung über den expressionsfördernden Einfluss von JunB auf den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p16 (INK4a) bzw. über seinen hemmenden Effekt auf Cyclin D1 vermittelt wird [Bakiri et al. 2000, Passegué und Wagner 2000, Passegué et al. 2001]. Dieser antiproliferative und zu c-jun antagonistische Effekt konnte durch eine Studie an mesenchymal-epidermalen Hautmodellen von Szabowski et al. aus dem Jahre 2000 belegt werden. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass JunB in der Abwesenheit von c-Jun einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation hat [Passegué et al. 2002]. Daneben spielt JunB bei der regelrechten Plazentation in Mäuseembryonen eine Rolle, wobei in JunB-defizienten Embryos auch MMP9 und uPA im Tro-

phoblasten dereguliert sind [Jochum et al. 2001]. In myeloiden Zellen führt die Inaktivierung von JunB zu verminderter Apoptose und damit zu einem der menschlichen chronisch myeloidischen Leukämie (CML)-ähnlichen Phänotyp [Passegué et al. 2001]. Dies deckt sich mit Untersuchungen an CML-Patienten, bei denen eine Down-Regulation von JunB beobachtet werden konnte [Yang et al. 2003]. Untersuchungen an Brustkrebs-Gewebematerial und Lymphknotenmetastasen zeigten für JunB in der Immunhistochemie in der Vielzahl der Fälle geringe oder gar keine Anfärbung. Im Gegensatz zu fast allen anderen im Rahmen dieser Studie untersuchten AP1-Faktoren, bei denen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression abhängig vom Lymphknotenstatus zeigten, stellte sich die Expression von JunB in Lymphknoten-positiven gegenüber Lymphknoten-negativen Tumoren signifikant niedriger dar [Langer et al. 2006]. In einer anderen Studie konnte diese Korrelation allerdings nicht gefunden werden, sondern JunB erwies sich dort als von Steroidhormonrezeptorstatus, HER2/neu-Expression, Histologie des Tumors, histologischem Grading, Alter der Patientin und Menopausen-Status unabhängig und zeigte in den 53 untersuchten Mammakarzinom-Proben eine verhältnismäßig gleichmäßige, mittelstarke Expression [Bamberger et al. 1999].

c-Jun

c-Jun wird als die zentrale Komponente des AP-1-Komplexes angesehen und entspricht als menschliches Homolog dem retroviralen Onkoprotein v-Jun des „avian sarcoma virus 17“ [Maki et al. 1987, Karin 1995]. Seine Fähigkeit zur Transformation kann durch Phosphorylierung mit Hilfe von Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) gesteigert werden. Im Bezug auf den Zellzyklus besitzt c-Jun durch seine proliferationsfördernde Wirkung eine antagonistische Funktion zu JunB, denn genau entgegengesetzt zu diesem fördert es Cyclin D1 und hemmt p16, und bewirkt dadurch den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase [Bakiri et al. 2000, Passegué und Wagner 2000, Szabowski et al 2000]. Gleichzeitig wirkt c-Jun auch über eine direkte AP1-Bindungsstelle im Promotor des Tumorsuppressorgens p53 negativ regulatorisch auf Letzteres [Schreiber et al. 1999].

In Mäusen ist c-Jun in die Ausbildung eines normalen kardialen Ausflusstraktes, in eine regelrechte Hepatogenese und hepatische Hämatopoiese involviert [Hilberg et al. 1993, Eferl et al. 1999]. Im Jahre 1999 wurde in einer Studie an der menschlichen Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie MCF7 von Smith et al. berichtet, dass mitogene Stimulation durch Insulin oder IGF (insulin-like growth factor) eine vermehrte Expression von c-Jun zur Folge hatte. Gleichzeitig

fürte die Überexpression von c-Jun in diesem experimentellen Modell zu einem veränderten Expressionsmuster anderer AP1-Faktoren, z.B. der drastischen Reduktion von JunB-mRNA, zu erhöhter Motilität, über vermehrtes MMP9 zu erhöhter Invasivität, aber auch zu einem verlangsamten Zellwachstum und Resistenz gegenüber Östrogen und Tamoxifen [Smith et al. 1999].

JunD

Ähnlich wie JunB kann auch JunD als Negativregulator der Zellproliferation agieren, und ebenso wie JunB kann es auch den „switch“ vom Wachstumssuppressor zum Wachstumspromotor vollziehen, und zwar in Abhängigkeit des Tumorsuppressorproteins Menin [Agarwal et al. 2003, Hess et al. 2004]. Die Funktion von JunD ist also abhängig vom zellulären Kontext und moduliert über den Ras/p53-Weg den Zellzyklus [Jochum et al. 2001]. In Fibroblasten wies JunD eine anti-apoptotische Wirkung auf [Weitzman et al. 2000, Hess et al. 2004].

In einer Studie an 53 Mammakarzinom-Gewebeproben ließ sich hinsichtlich der JunD-Expression eine große Variabilität, aber keine signifikante Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern beobachten [Bamberger et al 1999]. Langer et al. beschrieben in einer von ihnen durchgeführten Studie allerdings signifikante Koexpressionen von JunD mit JunB, Fra1 und c-Jun. Die Expression von JunD in Tumorgewebe der Brustdrüse zeigte sich hier als in 24 % der Fälle stark und in 58 % der Fälle mittelstark ausgeprägt [Langer et al. 2006].

1.2.2 Die Fos-Gruppe

FosB

FosB wird, genauso wie c-Fos, sehr rasch nach Serumstimulation in Fibroblasten induziert, seine Expression klingt aber im Vergleich zu den später induzierten Fos-Mitgliedern Fra1 und Fra2 auch schnell wieder ab [Kovary und Bravo 1992]. Eine weitere Gemeinsamkeit von FosB und c-Fos ist ihre jeweils C-terminale, für die Fähigkeit zur Transformation entscheidenden-

de Transaktivierungsdomäne, die bei Fra1 und Fra2 nicht vorhanden ist [Wisdom und Verma 1993]. In vitro besitzt FosB in Fibroblasten transformierende Aktivität [Kovary et al. 1991, Schuermann et al. 1991]; FosB transgene Mäuse neigen aber dennoch nicht zur Ausbildung von Tumoren [Grigoriadis et al. 1993]. In Studien an klinisch-pathologischem Tumormaterial menschlicher Mammakarzinome konnte eine positive Korrelation zwischen FosB-Expression, einem positiven Steroidhormonrezeptor-Status, einem differenzierten Tumor-Phänotyp und negativer oder schwacher HER2/neu-Expression aufgezeigt werden. Auch fand sich eine starke nukleäre FosB-Aktivität in den Epithelzellen der normalen Lobuli und Ductuli bei gleichzeitigem Verlust an FosB-Expression im Karzinomgewebe. Dies ließ darauf schließen, dass FosB für die reguläre Proliferation und Differenzierung der mammären Epithelzellen nötig sein könnte [Bamberger et al. 1999, Milde-Langosch et al. 2003]. Daneben zeigte sich sowohl in Mammakarzinom-Zelllinien als auch in Tumorgewebe eine negative Korrelation von FosB mit Fra1 [Bamberger et al. 1999]. Bei der Untersuchung der Zusammenhänge von FosB mit verschiedenen Proteinen des Zellzyklus ließ sich eine inverse Korrelation zwischen FosB, dem Zellzyklus-Inhibitor p16 und dem Proliferationsmarker Ki67 sowie ein positiver Zusammenhang zwischen FosB-Expression und dem Zellzyklus-Inhibitor Rb aufweisen. In Bezug auf Faktoren der Invasivität korrelierte FosB positiv mit der Expression der Kollagenase MMP1 [Milde-Langosch et al. 2000, Milde-Langosch et al. 2003, Milde-Langosch et al. 2004].

c-Fos

Ebenso wie die Entdeckung von c-Jun durch sein virales Homolog begünstigt wurde, wurde auch das menschliche c-Fos durch seine ausgeprägte Homologie zum transformierenden Onkogen v-Fos des FBJ-MSV (Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma virus) beschrieben [Curran et al. 1983]. Seine transformierende Wirkung liegt wie auch bei FosB in dem Vorkommen besonderer Struktur motive in der Transaktivierungsdomäne am C-Terminus begründet. Neben der vom Phosphorylierungsstadium abhängigen Aktivität von c-Fos ist auch seine Fähigkeit zur Down-Regulation seines eigenen Promotors, also zur negativen Autoregulation bekannt [Lucibello et al. 1989, Tulchinsky 2000]. Versuche an c-Fos-knock-out Mäusen haben gezeigt, dass diese keine Osteoklasten besitzen, damit zur Osteopetrose neigen und außerdem durch Störungen bei der Hämatopoiese auffallen [Johnson et al. 1992, Wang et al. 1992, Grigoriadis et al. 1994].

In menschlichen Bronchialepithelzellen fiel ebenso wie in Kolontumoren im Rahmen der malignen Transformation eine gehemmte c-Fos-Transkription auf [Zhang et al. 1997, Lee et al. 1998], während aus der Überexpression von c-Fos in der Adenokarzinomzelllinie CSML0 eine erhöhte Motilität und morphologische Veränderungen der Zellen resultierten [Tkach et al. 2003]. Bindungsstellen für c-Fos in den Promotor- oder Enhancerregionen von Zielgenen wie MMP1 (Kollagenase-1), MMP3 (Stromelysin) oder Cyclin D1 lassen auf seine Beteiligung an Invasion und Zellzyklusregulation schließen, jedoch kann seine Wirkung hierbei auch von anderen Mitgliedern der AP1-Familie übernommen werden [Tulchinsky 2000]. Ein Zusammenhang im Sinne einer positiven Korrelation von c-Fos und Cyclin E bzw. von c-Fos und MMP9 konnte an klinischem Mammakarzinommaterial beobachtet werden [Milde-Langosch et al. 2000, Milde-Langosch et al. 2004].

Fra1

Das Fos-related antigen 1 (Fra1) und das Fos-related antigen 2 (Fra2) weisen eine wesentlich höhere Stabilität auf als die anderen zwei Fos-Proteine FosB und c-Fos. Ihre Induktion nach Serumstimulation in Fibroblasten setzt, wie bereits oben erwähnt, im Vergleich zu Letzteren verzögert ein, ihre Expression bleibt aber dafür für viele Stunden erhöht, wofür vermutlich die Aktivierung der Fra1- und Fra2-Promotoren durch Jun/Fos-Dimere verantwortlich sein könnte [Kovary und Bravo 1992, Gruda et al 1994, Schreiber et al. 1997]. Auch sind Fra1 und Fra2 die vorherrschenden Fos-Proteine in asynchron wachsenden Zellen, was auf eine mögliche Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Expression AP1-abhängiger Genen in proliferierenden Zellen hinweisen könnte [Kovary und Bravo 1992, Tulchinsky 2000]. Obwohl bei beiden C- oder N-terminale transaktivierende Domänen fehlen und sie demgemäß auch keine transformierende Wirkung an 208F-Fibroblasten zeigen, wurde in Lungenkarzinomen wie auch in anderen malignen Tumoren eine Akkumulation von Fra1, z.B. über den ras-MAPK-Weg, während der malignen Progression festgestellt [Risse-Hackl et al. 1998, Tulchinsky 2000]. Aus diesen Beobachtungen heraus wurde Fra1 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung und Progression des entarteten Zustands verschiedener Zellsysteme zugeschrieben. In Versuchen an stabil transfizierten CSML0-Zellen mit Fra1-Überexpression zeigte sich neben einer Aktivierung der Expression dreier Faktoren des Urokinase-Systems (uPA, uPAR und PAI1) eine vermehrte Invasionsneigung, erhöhte Motilität sowie morphologische Veränderungen mit Verlängerung der Zellform durch Veränderungen am Actin-Zytoskelett [Kustikova et al.

1998, Tkach et al. 2003]. Ein Zusammenhang zwischen der Invasivität und einer erhöhten Menge an exprimiertem Fra1 konnte ebenso von Zajchowski et al. an hochinvasiven Mammarkarzinom-Zelllinien, und auch von Milde-Langosch et al. an MDA-MB231- bzw. MCF7-Zelllinien, hier unter anderem über erhöhtes PAI1, beobachtet werden [Zajchowski et al. 2001, Milde-Langosch et al. 2004]. Neben dem positiven Effekt von Fra1 auf Invasivität, Motilität und Wachstumsrate an transfizierten MCF7- bzw. mit siRNA behandelten MDA-MB231-Zellen in vitro wurde von Belguise et al. auch die Hochregulation von MMP1, MMP9 und VEGF, und etwas weniger ausgeprägt die von TIMP1 und Cyclin D1 durch Fra1-Überexpression beschrieben [Belguise et al. 2005]. Dies betont nicht nur die Teilhabe von Fra1 an Zellproliferation (über Cyclin D1) und Invasion (MMP1, MMP9, TIMP1), sondern auch seine Rolle bei der Neoangiogenese (VEGF) als Voraussetzung für Tumorwachstum und Tumordinvasion und bedingt dadurch die Assoziation von Fra1 mit einem eher malignen zellulären Phänotyp. Diese Erkenntnisse könnten teilweise eine Erklärung für die Effektivität einer DNA-Vakzine gegen Fra1 in der Verminderung von Tumorwachstum und Metastasierung bei Brustkrebs in Mäusen liefern [Luo et al. 2003]. Im Bezug auf den Zellzyklus ließ sich weiterhin eine signifikante positive Korrelation zwischen Fra1 und dem Proliferationsindikator Ki67, p16 sowie Cyclin E beobachten [Milde-Langosch et al. 2000]. Zwischen FosB und Fra1 und zwischen positivem ER-Status und Fra1 bestand eine starke inverse Korrelation in Tumorzelllinien und klinischem Tumorgewebe [Bamberger et al. 1999], während positiver Lymphknotenstatus mit Erhöhung der phosphorylierten Form von Fra1, dem p-Fra1, assoziiert war [Milde-Langosch et al. 2004]. Morphologisch führte vermehrtes Fra1 in verschiedenen Studien zur Konversion des runden, epitheloiden zu einem mehr länglichen, fibroblastoiden Erscheinungsbild der Zellen [Kustikova et al. 1998, Belguise et al. 2005]. Immunhistochemische Analysen von primärem Brustkrebs sowie von Lymphknotenmetastasen ergaben jedoch im Gegensatz zu oben Genanntem in mehr als 50 % der Proben schwache oder negative Werte für Fra1 sowie dessen Tendenz, negativ mit einer Entdifferenzierung zu korrelieren, was in diesem Fall eine dem JunB ähnliche tumorsupprimierende Wirkung vorschlägt [Langer et al. 2006].

Erhöhtes Fra1 wurde dagegen in Tumoren der Schilddrüse [Battista et al. 1998], der Ovarien [Tchernitsa et al. 2004], des Ösophagus [Hu et al. 2001] sowie in anderen maligne entarteten Geweben beschrieben, allerdings hatte es im Gegensatz dazu in Zervixkarzinomen einen supprimierenden Effekt auf Tumorigenität und maligne Charakteristik [Rösl et al. 1997, Soto et al. 1999, Soto et al. 2000].

Fra2

Fra2 wurde erstmals von Nishina et al. aufgrund seiner Homologie zu den anderen Fos-Proteinen als fos-related antigen 2 beschrieben [Nishina et al. 1990]. Neben den oben bereits erwähnten Gemeinsamkeiten mit Fra1 wurden beide Proteine reichlich in mehreren transformierten oder neoplastischen Zellen gefunden [Mechta et al. 1997, Murakami et al. 1997]. Auch korrelierten in einem Karzinogenese-Modell an Haut von Mäusen Fra1 und Fra2 mit einem malignen Phänotyp [Zoumpourlis et al. 2000]. In einer Studie an Tumoren der Speicheldrüsen wurde darüber hinaus Fra2 als eines der Gene beschrieben, deren Überexpression die pleomorphen Adenome im Vergleich zu normalem Speicheldrüsenewebe charakterisierten [Maruya et al. 2004]. Transformierende Eigenschaften zeigte Fra2 in Fibroblasten von Hühnerembryonen, aber nicht in Fibroblasten von Ratten [Nishina et al. 1990, Foletta et al. 1994].

In epitheloiden CSML0-Zellen war Fra2 im Gegensatz zu Fra1 und c-Fos nicht in der Lage, Gene des Urokinase-Systems zu aktivieren oder morphologische Veränderungen der Zellen herbeizuführen, oder, wie Fra1, die motile Aktivität zu steigern [Andersen et al. 2002, Tkach et al. 2003]. Dafür konnte aber die Motilität von fibroblastoiden L929-Zellen durch Transfektion mit Antisense-Fra1 bzw. Antisense-Fra2 gehemmt werden [Tkach et al. 2003]. In MDA-MB231-Zellen wurde die Motilität wiederum durch Fra2-Überexpression gehemmt, obwohl gleichzeitig die Invasivität im Matrigel-Invasionsassay durch Fra2 gesteigert werden konnte, wengleich auch weniger stark als durch Fra1 und auch nicht in MCF7-Zellen. Anders als Fra1 war Fra2 allerdings nicht in der Lage, morphologische Veränderungen an der Zelllinie MDA-MB231 hervorzurufen [Milde-Langosch et al. 2004].

Im Bezug auf verschiedene an der Invasion beteiligte Proteine fand sich in MCF7-Zellen eine starke Korrelation zwischen überexprimiertem Fra2 und PAI1, sowie in klinischem Tumorgewebe von p-Fra2 mit MMP1 und von Fra2 bzw. p-Fra2 mit MMP9 und PAI1. Ein Zusammenhang mit anderen AP1-Faktoren ergab sich an MCF7-Zellen mit überexprimiertem Fra2 und erhöhtem c-Jun sowie JunB [Milde-Langosch et al. 2004]. Bei der Untersuchung einiger Faktoren des Zellzyklus im Verhältnis zu Fra2 ließ sich in Mammakarzinomgewebeproben eine positive Korrelation für Cyclin E und Cyclin D1 beobachten, was einen stimulierenden oder sogar onkogenen Effekt von Fra2 vermuten ließ [Milde-Langosch et al. 2000]. So korrelierten auch erhöhte Fra2-Level mit einer frühen und vermehrten Rezidivneigung.

1.3 Der Zellzyklus und seine Regulatoren

Der Zellzyklus wird in vier Phasen eingeteilt: G1- (gap 1), S- (Synthese), G2- (gap 2) und M- (Mitose) Phase. Die G1-Phase ist dabei, zusammen mit der Ruhephase G0, die einzige Phase nicht-replikativer Natur. Damit die Zellen von der G1-Phase in den replikativen Teil des Zellzyklus eintreten und diesen dann auch vollends durchlaufen können, muss der sogenannte Restriktionspunkt (R) vor dem Übergang in die S-Phase überschritten werden. Dieser Übergang wird durch Signale verschiedenster Art fein kontrolliert und ist in neoplastischen Zellen häufig fehlreguliert.

Das Durchschreiten des Zellzyklus wird durch zwei Klassen von Zellzyklusproteinen reguliert: den in den 80er Jahren identifizierten Cyclinen und den CDKs (cyclin dependent kinases), die unter Zusammenlagerung Proteinkinasen bilden. Der Name „Cyclin“ wurde aufgrund der charakteristischen Periodizität im Auftreten des Cyclin B während des Zellzyklus gewählt. Aber nicht alle Cycline zeigen in ihrer Quantität derartige Schwankungen. Cyclin D1 wird in der G1-Phase zeitlich vor dem Restriktionspunkt synthetisiert und spielt eine wichtige Rolle bei dessen Regulation. Cyclin E kommt gehäuft in der späten G1- und frühen S-Phase vor und ist für den Übergang aus der G1- in die S-Phase essentiell. Erhöhte Konzentrationen dieser beiden Proteine können in unkontrollierter Proliferation resultieren. In der Tat werden Cyclin D1 und Cyclin E in einigen Tumoren überexprimiert, weshalb sie neben anderen in den Zellzyklus involvierten Faktoren als mögliche therapeutische Ziele nützlich sein könnten [Zafonte et al. 2000]. Die zweite Komponente des Enzymkomplexes sind die CDKs. Anders als das Auftreten der Cycline bleibt die Menge an CDKs im Laufe des Zellzyklus relativ konstant. Stattdessen ändert sich, je nachdem, ob das entsprechende Cyclin vorhanden ist bzw. die Kinase selbst phosphoryliert ist oder nicht, ihre Aktivität.

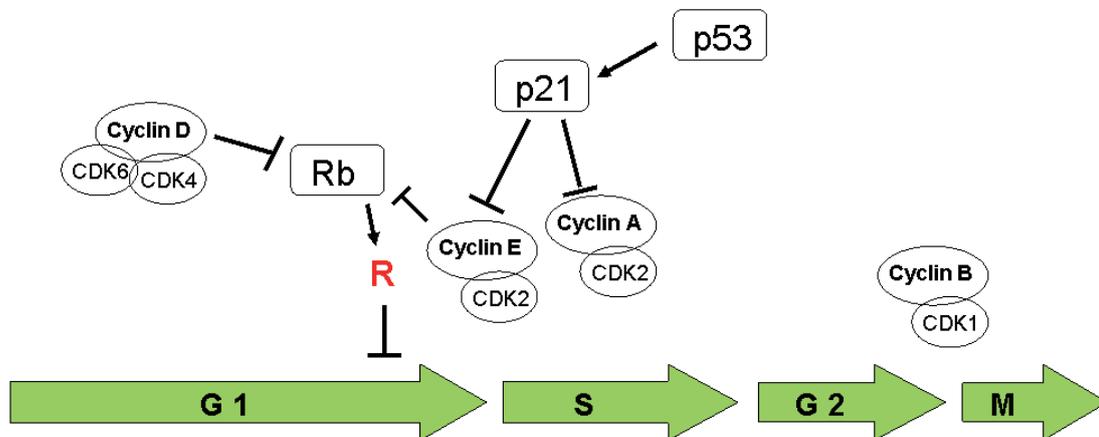


Abbildung 1.2

Vereinfachte Darstellung des Zellzyklus.

Der Cyclin D1/CDK4,6-Komplex ist nötig, um den Restriktionspunkt zu überwinden und damit die Zellen zur Replikation freizugeben. Als wesentliches Substrat dieses Komplexes dient hierzu das Retinoblastom-Tumorsuppressor-Protein (Rb), welches in seiner durch Cyclin D1/CDK4,6 phosphorylierten Form inaktiviert wird. Diese Inaktivierung führt dazu, dass die Zelle den sonst durch das Rb blockierten Restriktionspunkt überschreitet. Die Bedeutung des Rb wird hierbei durch die Beobachtung unterstrichen, dass Cyclin D1 in Zellen, denen das Rb fehlt, nicht für die Progression der G1-Phase vonnöten ist [Sherr und Roberts 1999]. Cyclin E/CDK2 wird etwas später im Zellzyklus bedeutsam, wenn die Zelle von der G1-Phase in die Synthese-Phase übergeht. Neben der Phosphorylierung von Rb dient dieser Komplex ferner dazu, eine Reihe anderer Proteine zu phosphorylieren, die eine weniger indirekte Rolle bei der DNA-Replikation spielen [Caldon et al. 2006]. Cyclin A/CDK2 unterhält die DNA-Verdopplung und tritt daher vermehrt in der Synthesephase auf. Der Komplex aus Cyclin B und CDK1, welches auch *cdc2* genannt wird, wird von der Zelle benötigt um in die Mitose einzutreten und diese bis zur Metaphase aufrecht zu erhalten. Am Ende der Metaphase wird Cyclin B degradiert und CDK1 inaktiviert, so dass die mitotischen Zellen weiter in die Ana-

phase eintreten und die Zellteilung vollenden können. Eine Aufrechterhaltung der Aktivität von Cyclin B/CDK1 führt zu einer Arretierung der Zellen in der Metaphase.

Wichtige Negativregulatoren der CDKs sind die „cyclin dependent kinase inhibitors“, die CKIs, die sich in die Klasse der Cip/Kip-Familie (p21/Cip1/waf1/Sdi1, p27/Kip1 und p57/Kip2) und der INK4-Familie (p16/INK4a, p15/INK4b, p18/INK4c und p19INK4d) unterteilen. Die Mitglieder der Cip/Kip-Familie können an die meisten der Cyclin/CDK-Komplexe binden und diese somit inaktivieren. p21 als am besten beschriebener Vertreter seiner Familie wird durch das Tumorsuppressor-Protein p53 als Antwort auf DNA-Schädigung stimuliert und vermag den Zellzyklus zur DNA-Reparatur zu arretieren [el-Deiry et al. 1994]. Die Proteine der INK4-Familie hingegen lagern sich ausschließlich an CDK4,6 an, weswegen es ihre Hauptaufgabe ist, Cyclin D1/CDK4,6 und darüber den Phosphorylierungsstatus von Rb zu regulieren [Pei und Xiong 2005]. p16/INK4a ist auch selbst ein Tumorsuppressor, der häufig in Melanomen in mutierter Form zu finden ist [Liu et al. 1995].

Das Durchlaufen des Zellzyklus wird einerseits durch den Einfluss spezifischer Signale wie z.B. Wachstumsfaktoren, Östrogene, Progesterone und Zytokine reguliert, andererseits spielen auch Feedback-Mechanismen eine Rolle und kontrollieren sogenannte „Checkpoints“ einen regelrechten Ablauf. Zu Letzteren zählt beispielsweise das p53, welches in menschlichen Tumorzellen oftmals mutiert ist und diesen somit der p53-abhängige G1-Checkpoint fehlt. Dies hat nicht nur zur Folge, dass die Mutation in den Zellen erhalten bleibt, sondern auch, dass sie gegenüber durch DNA-Schäden hervorgerufener Apoptose resistenter sind als normale Zellen, da p53 ebenso als Förderer der Apoptose gilt. Weil die meisten Chemotherapeutika auf dem Prinzip der Induktion von Apoptose aufgrund von DNA-Schädigung in den Zellen beruhen, sind p53-mutierte Zellen diesen Therapien gegenüber resistenter [Lowe et al. 1993].

1.4 Regulatoren der Invasivität

Tumorzellen können, im Gegensatz zu den meisten gesunden Zellen, auch in Suspension wachsen, da für sie die Verankerung z.B. auf einer Basalmembran nicht mehr notwendig ist. Dieser Verlust des verankerungsabhängigen Wachstums bedingt nicht nur den Übergang der benignen Form zur malignen Form eines Tumors, sondern ist auch Voraussetzung für die Metastasierung. Das Durchdringen der Basalmembran mittels Proteolyse, die Eigenschaft, auch ohne den Kontakt zu dieser überleben zu können, sowie die Fähigkeit, in anderem als

dem Ursprungsgewebe wachsen und Kolonien bilden zu können ist ein gemeinsames Kennzeichen von Tumorzellen [Liotta et al. 1991]. Die Metastasierung ist demnach ein schritthafter Prozess, an dessen Anfang die Trennung der Zellen vom Primärtumor steht, und dem die Penetration der Basalmembran mittels Degradierung der Extrazellulärmatrix folgt. Diese Fähigkeit zur Proteolyse wird beispielsweise durch die Matrix-Metalloproteinasen oder das Urokinase-System, welche die beiden am besten erforschten Enzymgruppen mit möglicher Bedeutung für eine antimetastatische Therapie darstellen [Crowley et al. 1993, Sato et al. 1994], aber auch durch Cathepsine [Castiglioni et al. 1994] bedingt.

1.4.1 Das uPA/uPAR/PAI-System

Viele Bestandteile der EZM, so z.B. Laminin, Fibronectin und Fibrin können unter Einwirkung der Protease Plasmin gespalten werden, was ihre Degradierung zur Folge hat. Dies geschieht nicht nur über den Weg der proteolytischen Aktivität des Plasmins, sondern auch indirekt über Plasmin-abhängige Aktivierung verschiedener MMPs (MMP3, MMP9, MMP12 und MMP13) [Carmeliet et al. 1997]. Die Serinproteasen tPA (tissue-type plasminogen activator) und uPA (urokinase-type plasminogen activator) sind in der Lage, inaktives Plasminogen in aktives Plasmin zu spalten [Danø et al. 1985]. Bei uPA wird diese proteolytische Aktivität durch Bindung an seinen zellulären Rezeptor uPAR (CD87) ermöglicht, wodurch intrazellulär diverse Signaltransduktionsmoleküle wie die Tyrosin- oder die Serin-Proteinkinase aktiviert werden [Blasi und Carmeliet 2002]. Daneben besitzt uPA die Möglichkeit Angiogenese, Mitogenese und Zellmigration zu stimulieren [Andreasen et al. 1997]. Limitiert wird die Wirkung des uPA/uPAR über den Einfluss verschiedener Inhibitoren, darunter Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI1 und PAI2 [Andreasen et al. 1990]. PAI1 gilt hierbei als Hauptinhibitor des uPA, wobei es unter Bildung eines stabilen Komplexes an Letzteres bindet. Daneben kann PAI1 auch über die Anlagerung an das EZM-Protein Vitronectin unabhängig von seinen proteolytischen Eigenschaften zelluläre Adhäsion und Migration modulieren [Loskutov et al. 1999]. Auch der uPAR vermag mit anderen Proteinen, darunter Mitglieder der Mannose-Rezeptor-Familie oder bestimmte Integrine, zu interagieren und damit ebenfalls auf Adhäsion und Migration Einfluss zu nehmen [Rosenberg 2001]. Über AP-1-Bindungsstellen in Promotoren des uPA/uPAR/PAI1-Systems ergibt sich ein Zusammenhang mit dieser

Transkriptionsfaktor-Familie, welche somit partiell an der Regulation von uPA/-uPAR/PAI1 beteiligt ist [Dang et al. 1999].

Seitdem in den 80er Jahren erstmals ein Zusammenhang zwischen erhöhter uPA-Aktivität im Brustkrebs-Primärtumor und schlechterer Prognose beobachtet werden konnte [Duffy et al. 1988], wurden viele weitere Studien mit Hinblick auf uPA/uPAR/PAI1 als möglichem prognostischem Marker durchgeführt. Die Aussagekraft des uPA im Mammakarzinom wurde dabei als unabhängig von anderen klassischen Prognosefaktoren wie Tumorgröße, Grading, axillärer Lymphknotenstatus und Steroidhormonrezeptorstatus, und dies vor allem in Lymphknoten-negativen Fällen, gesehen [Schmitt et al. 1997, Duffy et al. 1999].

Anfang der 90er Jahre konnten Jänicke et al. feststellen, dass auch hohe Konzentrationen an PAI1 paradoxerweise mit schlechter Prognose in Patienten mit Brustkrebs einhergingen [Jänicke et al. 1991]. Ebenso wie bei uPA konnten diese Beobachtungen vielmals bestätigt werden. So stellt auch PAI1 einen unabhängigen Prognosefaktor dar und lässt Aussagen über die Prognose in nodal negativen Patienten zu [Andreasen et al. 1997, Schmitt et al. 1997]. Der uPA- und PAI1-Status bietet daher eine gute Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen Low-risk- und High-risk-Patienten und könnte somit bei der Therapieplanung miteinbezogen werden.

1.4.2 Die Matrix-Metalloproteinasen

Hinter dem Begriff der Matrix-Metalloproteinasen, auch Metalloproteasen genannt und als MMP1 bis MMP28 nummeriert, verbirgt sich eine gegenwärtig 21 Mitglieder umfassende Gruppe sezernierter oder membranständiger (MT-MMPs) Endoproteinasen, die Spaltprozesse im helikalen Abschnitt von Proteinen katalysieren und damit in der Lage sind, Extrazellulärmatrix (EZM) zu degradieren [Nagase und Woessner 1999, Vihinen und Kähäri 2002]. Die extrazelluläre Matrix besteht u.a. aus den Komponenten Kollagen (hauptsächlich Typ I, II, III, V und XI), Laminin, Proteoglykan und Fibronectin, für welche jedes Mitglied der MMP-Familie ein spezifisches Wirkungsspektrum besitzt. Gleichzeitig gehören aber auch Nicht-Matrixsubstanzen wie das IGFBP, das TGF β , IL-1 β oder der TNF α zu den Substraten der MMPs.

Die meisten MMPs werden in inaktiver Form, der sogenannten Zymogenform, sezerniert und benötigen einen proteolytischen Einfluss um aktiviert zu werden. Ihre Aktivität wird aufgrund

ihres starken proteolytischen Potentials über ihre Genexpression, sowie posttranskriptionell über Wachstumsfaktoren und Hormone streng kontrolliert. Interessant im Bezug auf die Genexpression ist zu erwähnen, dass mit Ausnahme von MMP2 alle MMPs AP1-Bindungsstellen in ihren Promotoren enthalten [Westermarck und Kähäri 1999].

Das System der MMP-Aktivierung wird kaskadenförmig unter Einbeziehung freier und membranständiger Proteasen gleicher und anderer Enzymfamilien reguliert [Sato et al. 1994, Borkakoti 1998]. Ein weiterer Regulationsmechanismus der MMPs durch Limitierung der proteolytischen Wirkung ist ein System unspezifischer, z.B. α_1 -Proteinaseinhibitor oder α_2 -Makroglobulin, und spezifischer Inhibitoren, den „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ (TIMP).

Eine verstärkte Invasivität bei experimenteller Überexpression von MMPs in Zelllinien und ein vermindertes Tumorwachstum bei MMP-knock-out-Tieren sowie ein vermehrtes Tumorwachstum, eine stärkere maligne Transformation und eine ausgeprägte Invasivität bei TIMP-knock-out-Tieren und geringeres Tumorwachstum, geringere Invasivität und weniger maligne Transformation in TIMP-überexprimierenden Tieren veranschaulichen die oben beschriebenen Wirkungsweisen [Khokha und Denhardt 1989, Wilson et al. 1997].

MMPs werden typischerweise in normalen adulten Zellen nicht exprimiert, wohl aber in Tumorzellen und in dem diese umgebenden Stroma, und zwar folgend auf Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Veränderungen der Zell-Zell- oder Zell-EZM-Interaktionen. Im Rahmen dessen konnte in vielen Tumorgeweben eine Überexprimierung von MMPs festgestellt werden [Knox et al. 1996, Davidson et al. 1998, Lochter und Bissell 1999] sowie an verschiedenen experimentellen Modellen, z.B. an Melanomen, Kolorektal- und Mamma-Karzinomen die Wirksamkeit der Gabe synthetischer MMP-Inhibitoren auf Minderung der Metastasierung gezeigt werden [Chirivi et al. 1994].

In Mamma-Adenokarzinomen und ebenso in Tumoren der Haut transgener Mäuse konnte im Gegensatz zu der jeweiligen prämaligen Vorstufe des Carcinoma in situ eine erhöhte MMP9-Aktivität beobachtet werden [Kupferman et al. 2000]. In einer Studie an klinischem Tumormaterial zeigten duktale Mammakarzinome erhöhte MMP2-Transkriptionsaktivität in dem den Tumor umgebenden Stroma, und zwar dies umso mehr, je invasiver der Phänotyp war. In den invasiven duktalem und lobulären Karzinomen waren MMP1 und MMP2 ebenfalls an der Invasionsfront erhöht, auch hier umso mehr, je invasiveres Verhalten sich zeigte. Gleichzeitig waren die Transkriptionsraten von TIMP1 und TIMP2 korrelierend mit dem histologischen Grading erhöht [Brummer et al. 1999]. An 43 weiteren Gewebeproben von Brust-

tumoren wurde im Vergleich zu gesundem Gewebe eine erhöhte Expression von MMP2 und MMP9, sowie eine erhöhte globale MMP-Expression gefunden [Garbett et al. 1999].

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle der AP1-Faktoren Fra1 und Fra2 in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB231. Im Hinblick auf Morphologie, Invasivität, Proliferation und die Regulation einiger Zielgene wurden hierzu mit Hilfe von RNA-Interferenz verschiedene Experimente durchgeführt, die auf folgende Fragen möglichst umfassend Antwort geben sollen:

- Welche Auswirkungen hat die Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 auf die Morphologie der MDA-MB231-Zellen?
- Welche Auswirkungen hat die Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 auf die Expression von Zielgenen? Wie korreliert hierbei die verminderte Fra1- bzw. Fra2-Expression mit der Expression von AP1-Faktoren (JunB, c-Jun, JunD, FosB, c-Fos, Fra1, Fra2), von Regulatoren des Zellzyklus (Rb, Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D, Cyclin E, CDK2, CDK4) und von Proteinen der Invasivität (PAI1, MMP1)?
- Welche Auswirkungen hat die Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 auf die Gesamtproteinmenge und auf die Proliferation der Zellen?
- Welche Auswirkungen hat die Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 auf die Invasivität der Zellen?
- Welche Auswirkungen hat die Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 auf die Motilität der Zellen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Die verwendete Zelllinie MDA-MB231 (ATCC HTB 26) wurde 1974 von Cailleau et al. isoliert und beschrieben. Die Zellen stammen aus einem humanen Adenokarzinom der Mamma und weisen weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren auf. Bezogen wurde die Zelllinie von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA).

2.1.2 Verwendete siRNA

Die Sequenz der doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotide wurde so gewählt, dass der Antisense-Strang eine sequenz-spezifische Homologie zu der für Lamin, Fra1 oder Fra2 codierenden messenger-RNA aufwies. Im Falle der Negativkontrolle (NK) war keine Sequenzhomologie zu jeglicher mRNA bekannt.

| siRNA | Sequenz | Hersteller |
|--|-----------------------------------|------------------------|
| NK (Functional, Non-targeting Control) | 5'-AGG UAG UGU AAU CGC CUU GUU-3' | MWG Biotech, Ebersberg |
| Lamin A/C | 5'-CUG GAC UUC CAG AAG AAC ATT-3' | MWG Biotech, Ebersberg |
| Fra1 | 5'-AAC ACC AUG AGU GGC AGU CAG-3' | Dharmacon, Bonn |
| Fra2 (x16706.1_2) | 5'-GGA GAA GCU GGA GUU CAU GTT-3' | MWG Biotech, Ebersberg |

2.1.3 Verwendete Antikörper

| Antikörper | Hersteller |
|------------------------------|---|
| Actin (I-19), sc-1616 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Anti-goat IgG-HRP, sc-2020 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Anti-mouse IgG-HRP, sc-2005 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Anti-rabbit IgG-HRP, sc-2004 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Cdk2 (M2)-G, sc-163-G | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Cdk4 (H-22), sc-601 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| c-Fos (4), sc-52 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Cyclin A (H-432), sc-751 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Cyclin B (Clone 18) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Cycin D1 (R-124), sc-6281 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Cyclin E (Clone 13A3) | Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK |
| Fos B (102), sc-48 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Fra-1 (R 20), sc-605 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Fra-2 (Q 20), sc-604 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Jun B (210), sc-73 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Jun D (329), sc-74 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Lamins A/C (Clone 636) | Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK |
| MMP 1 (AB-6) | Oncogene, Boston, MA, USA |
| PAI-1 (Ab-1) | Calbiochem, Merck Biosciences, Schwalbach/Ts. |
| p-c-Jun (KM-1), sc-822 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Rb (554136) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Rb2/p130 (C-20), sc-317 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

2.1.4 Verwendete Reagenzien

| Reagenz | Hersteller |
|--|---|
| Aceton | Sigma Aldrich, Seelze |
| Acrylamid/bis-Acrylamid | Qbiogene, Heidelberg |
| BCA Protein Assay Kit | Pierce, Rockford, IL, USA |
| Blotting-Grade Blocker Non-Fat Dry Milk | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Bromphenolblau | Sigma, St. Louis, MO, USA |
| Diff-Quick-Färbeset | Dade Behring, Marburg |
| D-MEM | Gibco, Paisley, UK |
| D-PBS | Gibco, Paisley, UK |
| Eosin G | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Eukitt | O. Kindler, Freiburg |
| Foetal Bovine Serum | Gibco, Paisley, UK |
| Glycerin | Merck, Darmstadt |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Hämalaunlösung | Merck, Darmstadt |
| HCl | Sigma-Aldrich, Seelze |
| High-Range Rainbow Molecular Weight Marker | Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK |
| L-Glutamin | Gibco, Paisley, UK |
| 2-Mercaptoethanol | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| MTT Labeling Reagent | Roche, Mannheim |
| NaCl | Baker, Deventer, Holland |
| Nutrient Mixture F-12 HAM | Sigma, St. Louis, MO, USA |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco, Paisley, UK |
| Re-Blot Mild Solution | Chemicon, Temecula, CA, USA |
| RNAiFect Transfection Reagent | Qiagen, Hilden |

| | |
|---|------------------------------|
| Saccharose | Merck, Darmstadt |
| SDS | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 5x siRNA Buffer | Dharmacon, Bonn |
| siRNA Suspension Buffer | Quiagen, Hilden |
| Solubilization Solution | Roche, Mannheim |
| Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate | Pierce, Rockford, IL, USA |
| TEMED | Serva, Heidelberg |
| Thimerosal | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tricine | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tris | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Trypsin-EDTA | Gibco, Paisley, UK |
| Tween 20 | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn |
| Xylol | SDS, Peypin, Frankreich |

2.1.5 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

| Lösung | Bestandteile |
|-----------------|---|
| Probenpuffer I | 50 mM Tris (pH 6,8) 10 % Saccharose 1 % SDS |
| Probenpuffer II | 50 mM Tris (pH 6,8) 10 % Saccharose 10 % β -Mercaptoethanol 3 % SDS 0,01 % Bromphenolblau |
| 3x Gelpuffer | 3 M Tris (pH 8,45) 0,3 % SDS |
| Kathodenpuffer | 0,1 M Tris (pH 8,25) 0,1 M Tricine 0,1 % SDS |
| Anodenpuffer | 0,2 M Tris (pH 8,9) 0,005 % Thimerosal |

| | |
|-----------------------------------|---|
| Transferpuffer | 100 mM Tris 193 mM Glycin 0,005 % Thimerosal |
| Dry-Milk-Blockierungspuffer 5 % | 5 % Blotting-Grade Blocker Non-Fat Dry Milk in TBST |
| Dry-Milk-Blockierungspuffer 1,5 % | 1,5 % Blotting-Grade Blocker Non-Fat Dry Milk in TBST |
| TBST-Puffer | 20 mM Tris (pH 7,6) 137 mM NaCl 0,05 % Tween 20 |

2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

| Gerät/Material | Hersteller |
|--|--|
| Biocoat Control Inserts | Becton Dickinson, Bedford, MA, USA |
| Biocoat Matrigel Invasion Chamber | Becton Dickinson, Bedford, MA, USA |
| Biophotometer | Eppendorf, Hamburg |
| Blottingkammer Hoefer TE 42 Transphor II Tanks | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Culture Slides | BD Biosciences, Bedford, MA, USA |
| Densitometer GS700 | BioRad, München |
| Elektrophoresekammer | Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA |
| Elektrophorese-Stromversorgungsgerät | Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA |
| Elisa-Reader SF Plus | SLT-Labinstruments, Crailsheim |
| Gel Blotting Papier | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Gelgießapparatur Hoefer SE 600 Vertical Slab | Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA |
| Hyperfilm ECL Röntgenfilme | Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK |
| Immobilon Transfer Membran | Millipore, Bedford, MA, USA |
| Inkubator | Kendro, Hanau |

| | |
|--|---|
| Magnetrührer | Janke & Kunkel, Staufen |
| Mikroskope | Hund, Wetzlar Leitz, Wetzlar Zeiss, Göttingen |
| Objektträger | Süsse, Fuldabrück-Bergshsn. |
| Parafilm | American National Can, Greenwich, CT, USA |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht Biozym, Hess. Oldendorf |
| Röhrchen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Röntgenentwickler Roentoroll 25 | Tenetal, Norderstedt |
| Röntgenfilm-Entwicklungsgerät Optimax X-Ray Film Processor | Protec, Oberstenfeld |
| Röntgen-Fixierlösung Superfix 25 | Tenetal, Norderstedt |
| Schüttler | B. Braun Biotech International, Melsungen |
| Thermocycler | Appligene Oncor, Heidelberg |
| Vortex | Janke & Kunkel, Staufen |
| Waage | Mettler, Giessen |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| 6-Well-plates | Sarstedt, Newton, NC, USA |
| Wattestäbchen | Beese, Barsbüttel |
| Zentrifugen | Heraeus Sepatech, Osterode Kendro, Hanau |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendete Zelllinie MDA-MB231 wurde bei 37°C und 5% CO₂ in nachfolgend beschriebenen Nährmedium kultiviert:

- 220 ml Nutrient Mixture F-12 HAM
- 220 ml D-MEM
- 50 ml Foetal Bovine Serum
- 5ml Penicillin/Streptomycin
- 5ml L-Glutamin

Die Zellen wurden zweimal pro Woche bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % gesplittet. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml D-PBS gewaschen, mit Hilfe von 1 ml Trypsin-EDTA (Inkubationszeit 1 min 30 sec bei 37°C, 5 % CO₂) von der Zellkulturflasche gelöst und anschließend in zwei neue Flaschen überführt.

2.2.2 siRNA-Transfektion

2.2.2.1 Ausplattieren der Zellen

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen, mittels Trypsin-EDTA aus der Zellkulturflasche gelöst und in frischem Medium aufgenommen. In einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurden die Zellen ausgezählt und die Zellsuspension anschließend mit Nährmedium so verdünnt, dass sich eine Konzentration von 150000 Zellen pro 2 ml ergab. Jeweils 2 ml dieser Zellsuspension wurden nun in ein Well eines 6-well-plate gegeben und bei 37°C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert.

2.2.2.2 Transfektion

Die Transfektion der Zellen mit small-interfering-RNA (siRNA) hat zum Ziel, die mRNA, die für ein bestimmtes Protein, in diesem Fall für Fra1 bzw. Fra2, codiert, spezifisch zu degradieren. Im weiteren Sinne handelt es sich bei der Transfektion mit siRNA also um eine Form des post-transkriptionalen gene silencing.

Die siRNA, welche aus doppelsträngiger RNA von jeweils 21 Nukleotiden Länge besteht, wird mit Hilfe von RNAiFect Transfection Reagent durch Lipid-vermittelte Transfektion in

die Zellen eingebracht. Dort wird sie in einen Proteinkomplex, den so genannten RISC (RNA-induced silencing complex) eingebunden. Dieser wird anschließend durch die Spaltung von ATP aktiviert, was zur Entwindung des siRNA-Doppelstranges führt, wodurch es der siRNA ermöglicht wird, sich an die entsprechenden Stellen in der mRNA anzulagern und diese zu degradieren.

In dem hier beschriebenen experimentellen Aufbau wurden die MDA-MB231-Zellen in 4 verschiedenen Ansätzen entweder mit der siRNA der Negativkontrolle (NK), der Positivkontrolle (Lamin A/C), der siRNA für Fra1 oder für Fra2 transfiziert.

Die Transfektion der Zellen mit der NK diente dabei dem Ausschluss unspezifischer silencing-Effekte, die z.B. durch die Aktivierung des RISC hervorgerufen werden können. Als Positivkontrolle wurde siRNA eingesetzt, welche gegen Lamin, ein Protein des Zytoskeletts, gerichtet ist. Diese vielfach verwendete siRNA bietet eine verlässliche Reduzierung der Genexpression in vielen humanen Zelllinien, wobei das Überleben der Zellen für die Dauer der Transfektion nicht beeinflusst wird, da das Lamin in diesem Zeitraum nicht essentiell ist.

Die verwendeten siRNA-Oligonukleotide der NK, sowie die für Lamin A/C und für Fra2 wurden vor dem erstmaligen Gebrauch jeweils in 1 ml 5fach mit RNase-freiem Wasser verdünntem 5x siRNA Buffer gelöst. Die siRNA für Fra1 wurde in 750 µl siRNA Suspension Buffer gelöst.

Am Tag der Transfektion wiesen die Zellen eine Konfluenz von ca. 60-70 % auf. Das Medium vom Vortag wurde abgesaugt und 1,9 ml frisches Medium pro Well vorgelegt. Anschließend wurden die Reaktionsgemische nach folgendem Schema (s. Tabelle 2.1) angesetzt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und jeweils 100 µl tropfenweise auf die Zellen gegeben.

| | NK | Lamin A/C | Fra1 | Fra2 |
|---------------------------------------|---------|-----------|-------|---------|
| Gelöste siRNA (entspricht 5 µg siRNA) | 16,8 µl | 3,5 µl | 19 µl | 13,5 µl |
| Nährmedium | 83,2 µl | 96,5 µl | 81 µl | 86,5 µl |
| RNAiFect Transfection Reagent | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl |

Tabelle 2.1

Reaktionsansätze der siRNA. Die Mengen gelten jeweils für ein Well eines 6-well-plates.

2.2.2.3 Ernten der Zellen

Nach einer mit Hilfe von Vorversuchen optimierten Inkubationszeit von 72 Stunden wurde das Medium aus den Wells abgesaugt, die Zellen mit D-PBS gewaschen und anschließend mit 400 µl Trypsin-EDTA vom Boden eines jeden Wells gelöst. Daraufhin wurden die Zellen in 1000 µl frisches Medium aufgenommen, in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt und die jeweilige Anzahl an Zellen für den sich anschließenden Invasionsassay, den MTT-Zellproliferationstest oder für das Herstellen von Objektträgern entnommen.

Die Proteine der übrigen Zellen wurden zur Überprüfung der Transfektion im Western Blot analysiert. Dazu wurden die sich noch im Medium befindlichen Zellen zentrifugiert (4 min bei 1000 rpm), der Überstand abgesaugt, das Zell-Pellet mit D-PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde wiederum der Überstand vollständig abgesaugt und die Zellen in Probenpuffer I (Lysepuffer) resuspendiert. Die entstandenen Zelllysate wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Zelllysate wurden unter Verwendung des BCA Protein Assay Kits errechnet. Daraus ließen sich einerseits Aussagen über den Gesamtgehalt an Protein in der jeweiligen transfizierten Zellart machen, wobei die Werte der NK jeweils als 100 % gesetzt und die Werte der Fra1- und Fra2-transfizierten Zellen dazu in Verhältnis ge-

sehen wurden. Andererseits konnten die einzelnen Proben nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Western Blot weiter analysiert werden.

2.2.4 Western Blot-Analyse

2.2.4.1 Vorbereitung der Proben

Das für jede Probe bestimmte und jeweils 10 µg Protein entsprechende Volumen der Zellysate sowie je ein Ansatz für den High-Range Rainbow-Molekulargewichtsmarker und die Positivkontrolle, wurden jeweils in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit Probenpuffer I auf 20 µl aufgefüllt und mit Probenpuffer II im Verhältnis 1:1 verdünnt, so dass sich ein Endvolumen von 40 µl ergab.

Nun wurden die Proben bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert und anschließend zur Denaturierung der Proteine im Thermocycler 5 min lang bei 99°C inkubiert. Nachdem die Proteine nun auf Raumtemperatur abgekühlt worden waren, wurden sie nochmals zentrifugiert.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient dazu, Proteine in einem Polyacrylamidgel abhängig von ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dabei wird die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld einerseits durch den Vernetzungsgrad des Gels, andererseits durch das unterschiedliche Molekulargewicht der einzelnen Proteine bedingt. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden 6 %ige bzw. 10 %ige Trenngele verwendet, die sich aus den folgenden Bestandteilen zusammensetzen:

| | Trenngel 6% (100–140 kDa) | Trenngel 10% (40–80 kDa) | Sammelgel |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------|
| Glycerin 87 % | 4 g | 4g | - |
| Aqua dest. | 11,5 ml | 8,5 ml | 7,9 ml |
| Gelpuffer 3x | 10 ml | 10 ml | 3,1 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid 40 % | 4,5 ml | 7,5 ml | 1,5 ml |
| APS 10 % | 150 µl | 150 µl | 150 µl |
| TEMED | 15 µl | 15 µl | 15 µl |

Tabelle 2.2

Verwendete Gele und deren Zusammensetzung.

Die Substanzen APS und TEMED wurden jeweils zum Schluss hinzugefügt, da sie die Polymerisationsreaktion herbeiführten.

Die Gele wurden mit Hilfe der Gelgießapparatur zwischen 2 Glasplatten gegossen und ca. 30 min auspolymerisiert. Anschließend wurde das ebenfalls in der obigen Tabelle aufgeführte Sammelgel mit Hilfe eines Spacers mit 20 Taschen zur Aufnahme der Proben gegossen und gleichfalls ca. 30 min auspolymerisiert.

Nachdem die Gele mit frischem Kathodenpuffer überschichtet und die Taschen mit den Proben befüllt worden waren, wurde die gesamte Gelapparatur in die mit Anodenpuffer gefüllte Kammer gestellt und die Elektrophorese bei 55 V für 18 Stunden gestartet.

2.2.4.3 Blotting

Um die Proteine mittels Primär- und Sekundär-Antikörpern detektieren zu können, mussten sie nach der elektrophoretischen Auftrennung zunächst aus dem Gel unter Stromeinfluss auf ein geeignetes Trägermaterial überführt werden. Dazu wurde eine Immobilon Transfer Membran gewählt, da sie neben ihrer guten Bindungsfähigkeit für Proteine ebenfalls eine einfache Handhabbarkeit aufweist.

Diese Membran wurde zur Hydrophilisierung zunächst in Methanol, dann in Aqua dest. und zum Schluss in Transferpuffer geschwenkt, bevor sie auf das Gel gebracht wurde. Nun wurden jeweils von oben und unten 3 Lagen Gel Blotting Papier, welches ebenfalls zuvor in Transferpuffer geschwenkt worden war, aufgelegt. Auf beide Außenseiten wurde ein Schwamm gelegt, der unter der Vermeidung der Bildung von Luftblasen gänzlich in Transferpuffer getränkt wurde. Dieses Paket wurde in einer speziellen Halterung in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer überführt, und für eine Dauer von 4 Stunden wurde ein Strom von 400 mA angelegt.

2.2.4.4 Blockierung

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran in Methanol geschwenkt, 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und nach erneutem Schwenken in Methanol und Aqua dest. über Nacht bei 4°C in 5 %igem Dry-Milk-Blockierungspuffer inkubiert, was der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen diente.

2.2.4.5 Detektion

Alle Proteinproben wurden auf die in der Tabelle aufgeführten Antikörper hin untersucht. Sowohl die Primär-Antikörper als auch die Sekundär-Antikörper wurden in 1,5 %igem Dry-Milk-Blockierungspuffer gelöst. Dazu wurde die über Nacht mit Dry-Milk-Blockierungspuffer überschichtete Membran zunächst für eine Stunde auf dem Schüttler mit dem Primär-Antikörper inkubiert, anschließend 3x jeweils 10 min mit TBST gewaschen, danach für eine weitere Stunde mit dem Horseradish-Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert, 4x für je 10 min mit TBST gewaschen und zuletzt für 5 min mit der frisch angesetzten Chemilumineszenz-Lösung (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate) überschichtet.

| Primär-Antikörper | Verdünnung | Sekundär-Antikörper | Verdünnung |
|-------------------|------------|---------------------|------------|
| Actin | 1:10 000 | Anti-goat | 1:8000 |
| Lamin | 1:500 | Anti-mouse | 1:8000 |
| Fra1 | 1:400 | Anti-rabbit | 1:8000 |
| Fra2 | 1:800 | Anti-rabbit | 1:8000 |
| FosB | 1:200 | Anti-rabbit | 1:5000 |
| c-fos | 1:200 | Anti-rabbit | 1:8000 |
| jun B | 1:100 | Anti-rabbit | 1:8000 |
| p-c-jun | 1:200 | Anti-mouse | 1:8000 |
| jun D | 1:2000 | Anti-rabbit | 1:8000 |
| Rb | 1:800 | Anti-mouse | 1:4000 |
| Rb2 | 1:1000 | Anti-rabbit | 1:10000 |
| PAI-1 | 1:100 | Anti-mouse | 1:2000 |
| MMP1 | 1:1000 | Anti-mouse | 1:2000 |
| Cyclin A | 1:5000 | Anti-rabbit | 1:5000 |
| Cyclin B | 1:2000 | Anti-mouse | 1:2000 |
| Cyclin D1 | 1:400 | Anti-mouse | 1:4000 |
| Cyclin E | 1:400 | Anti-mouse | 1:2000 |
| cdk 2 | 1:5000 | Anti-goat | 1:5000 |
| cdk 4 | 1:5000 | Anti-rabbit | 1:5000 |

Tabelle 2.3

Verwendete Antikörper mit Verdünnungsangabe.

Die so behandelten Membranen wurden in einer Klarsichthülle in eine Röntgenkassette überführt. In der Dunkelkammer wurden nun hochempfindliche Hyperfilm ECL-Röntgenfilme auf die Membranen gelegt. Das in der Chemilumineszenz-Lösung enthaltene Luminol sandte Lichtquanten aus, welche zu einer Schwärzung dieser Röntgenfilme führten. Die Belichtungszeiten wurden unterschiedlich gewählt und richteten sich nach der Signalstärke.

2.2.4.6 Densitometrische Auswertung

Der unterschiedliche Schwärzungsgrad der belichteten Röntgenfilme wurde am Densitometer GS700 mit der dazugehörigen Software (Quantity One Basic) vermessen. Für jedes Protein, auf das hin detektiert wurde, wurden dabei jeweils die mit der NK-siRNA, mit Fra1-siRNA und mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen aus mindestens drei verschiedenen Transfektionsversuchen untersucht. Der Schwärzungsgrad der mit NK-siRNA transfizierten Zellen wurde dabei für jede einzelne Transfektion auf 100 % festgelegt und derjenige der mit Fra1- bzw. Fra2-siRNA transfizierten Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Zusätzlich wurden diese Prozentzahlen mit einem für jede Transfektion einzeln erhobenen Korrekturfaktor korrigiert, welcher sich aus der Detektion mit dem Actin-Antikörper ergab.

2.2.4.7 Reblot-Verfahren

Durch das Reblot-Verfahren wird es ermöglicht, eine Membran, die bereits mit Antikörper überschichtet und auf ein bestimmtes Protein hin untersucht worden war, erneut mit einem anderen Antikörper zu inkubieren und somit auf ein anderes Protein hin zu detektieren. Dafür wurde die bei -20°C gelagerte Membran zunächst bei RT aufgetaut, 5 min in Aqua dest. gespült und anschließend 25 min in mit Aqua dest. verdünnter Re-Blot Mild Solution (1:10 Verdünnung) inkubiert. In einer neuen Schale wurde die Membran nachfolgend 2x je 5 min mit 5 %igem Dry-Milk-Blockierungspuffer gespült. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper und die weitere Detektion wie unter 2.2.5.5 beschrieben.

2.2.5 Invasionsassay

2.2.5.1 Start des Invasionsassays

Mit dem Invasionsassay ist es möglich, sowohl die Invasivität als auch die Motilität von Zellen *in vitro* zu beurteilen. Dafür wurden in ein zu der Invasionskammer (Biocoat Matrigel

Invasion Chamber) gehöriges 24 Well-plate zwei verschiedene Arten von Inserts eingesetzt: zum einen die Inserts der Matrigel Invasion Chamber, im Folgenden als Matrigel-Inserts bezeichnet, zum anderen die Control-Inserts.

Die Control-Inserts besitzen als Boden eine PET-Membran mit Poren von 8 μm Größe, während die Matrigel-Inserts zusätzlich zu dieser mit einer so genannten Matrigel Basement Membran beschichtet sind. Diese wird aus gelösten Basalmembranbestandteilen aus Sarkomen von Mäusen hergestellt, enthält Laminin, Kollagen Typ IV, Heparansulfat-Proteoglykane, Entactin sowie verschiedene Wachstumsfaktoren und ist damit einer natürlichen Basalmembran nachempfunden. Sie kann aufgrund dieser Tatsache nur von invasiven Zellen überwunden werden. Die Anzahl der Zellen, die durch die Membran diffundieren ist damit ein Maß für ihre Invasivität, während die Anzahl der Zellen, die durch den Boden der Control-Inserts wandern, ein Maß für ihre Motilität darstellt.

Dieses Experiment diente dazu, die mit der NK-siRNA, die mit Fra1-siRNA und die mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen zu vergleichen.

Für den Versuchsansatz wurden die bei -20°C gelagerten Matrigel-Inserts zunächst rehydriert. Dafür wurden in 12 der Wells des 24-Well-plates je 500 μl 37°C warmes Basalmedium, bestehend aus gleichen Teilen D-MEM und Nutrient Mixture F-12 HAM, gegeben, die Matrigel-Inserts hineingestellt und ihrerseits mit 500 μl Basalmedium befüllt. Nun wurde die Invasionskammer für 2 Stunden im Inkubator (37°C , 5 % CO_2) gelagert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen, die sich 72 Stunden nach Transfektion befanden, wie unter 2.2.2.3 beschrieben geerntet, ausgezählt und so in Nährmedium aufgenommen, dass sich jeweils 50000 Zellen in 500 μl Nährmedium befanden, was der verwendeten Menge pro Insert entsprach.

Im Anschluss an die Rehydrierung der Matrigel-Inserts wurde das Basalmedium sowohl aus den Matrigel-Inserts als auch aus den Wells abgesaugt. Nun wurden in jedes der 24 Wells 750 μl Nährmedium gegeben und sowohl die Matrigel-Inserts als auch die Control-Inserts, welche keiner Rehydrierung bedurften, in die Wells eingesetzt. Als nächstes wurden je 500 μl der Zellsuspension in ein Insert gegeben, wobei für jede der drei Zellarten (NK-siRNA-transfizierte, Fra1-siRNA-transfizierte und Fra2-siRNA-transfizierte Zellen) je 4 Matrigel-Inserts und 4 Control-Inserts verwendet wurden. Abschließend wurde die Invasionskammer für 24 Stunden im Inkubator aufbewahrt.

2.2.5.2 Färben der Matrigel- und Control-Membranen

Für das Färben der Matrigel- und Control-Membranen wurde nach 24 Stunden das Medium aus den Inserts entfernt sowie unter Zuhilfenahme eines Wattestäbchens die überschüssigen Zellen, welche nicht durch die PET-Membran bzw. die PET- und die Matrigel-Membran gewandert waren, sich also noch oberhalb des Bodens der Inserts befanden, entfernt. Anschließend wurden die Inserts mit Hilfe des Diff-Quick-Färbesets zunächst fixiert, danach in Eosin und Thiazin gefärbt und zuletzt in drei Reihen Aqua dest. gespült. Die Inkubationszeit in jeder einzelnen Lösung betrug jeweils 2½ min.

Nach einer halben Stunde Trocknung an der Luft wurden die Membranen mit einem Skalpell von den Inserts abgetrennt und auf Objektträgern unter der Verwendung von Eukitt und Deckgläschen fixiert.

2.2.5.3 Auswertung des Invasionsassays

Zur Beurteilung der Invasivität und Motilität der mit Fra1-siRNA bzw. mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit NK-siRNA transfizierten Zellen wurde die Menge der durch die Matrigel-Membran oder Control-Membran invadierten Zellen mit Hilfe eines Zähllokulars am Mikroskop bestimmt. Es wurden dabei je sieben Gesichtsfelder pro Membran ausgezählt, was in etwa der Größe der gesamten Membran (0,3 cm²) entsprach. Von diesen jeweils sieben Gesichtsfeldern wurde dann der Mittelwert gebildet. Da pro Invasionsassay und pro transfizierter Zellart je vier Matrigel-Membranen sowie vier Control-Membranen vorhanden waren, wurde aus diesen jeweils vier Mittelwerten wiederum der Mittelwert errechnet und über die folgenden Formeln zunächst die prozentuale Invasion und darüber der Invasionsindex errechnet. Mit Test-Zellen sind in diesem Fall die mit Fra1- oder Fra2-siRNA transfizierten Zellen gemeint.

$$\% \text{ Invasion} = \frac{\text{Mittelwert der durch die Matrigel-Membran gewanderten Zellen}}{\text{Mittelwert der durch die Control-Membran gewanderten Zellen}} \times 100$$

$$\text{Invasionsindex} = \frac{\% \text{ Invasion der Test-Zellen}}{\% \text{ Invasion der NK-Zellen}}$$

Für die Auswertung der durch die Matrigel-Membran invadierten Zellen als Maß der Invasivität und der durch die Control-Membran gewanderten Zellen als Maß der Motilität wurden die Werte der mit Fra1- bzw. Fra2-siRNA transfizierten Zellen im Verhältnis zu den mit NK-siRNA transfizierten Zellen gesehen, deren ausgezählter Mittelwert als 100 % gesetzt wurde. Eine statistische Analyse der Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms SPSS als T-Test durchgeführt, wobei nur Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant gewertet wurden.

2.2.6 Zellproliferations-Test (MTT-Test)

Der MTT-Test ermöglicht, Aussagen über das Maß der Proliferation von Zellen zu treffen. Das Prinzip beruht dabei auf der Umsetzung gelben Tetrazolium-Salzes in violettfarbene Formazan-Kristalle durch lebende Zellen. Dazu wurden pro Ansatz jeweils 8000 Zellen 72 Stunden nach Beginn der Transfektion in 100 μl Nährmedium in die Wells eines 96-Well-plates ausplattiert. 24 Stunden später wurden je 10 μl des MTT Labeling Reagent, welches das Tetrazolium-Salz enthält, hinzugefügt. Nur lebende Zellen sind nun in der Lage, dieses in Formazan-Kristalle umzusetzen. Nach weiteren vier Stunden wurden 100 μl der Solubilization Solution zugegeben, um die umgesetzten Formazan-Kristalle wasserlöslich zu machen. Die quantitative Auswertung erfolgte am nächsten Morgen durch den Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 592 nm.

Die Menge an lebenden Zellen korreliert dabei direkt mit der Menge an Formazan-Kristallen und somit mit der Absorption. Zur Auswertung wurde das Maß der Proliferation der mit der NK-siRNA transfizierten Zellen als 100 % festgelegt, die Werte der mit Fra1-siRNA bzw.

Fra2-siRNA transfizierten Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt und deren Signifikanz mit Hilfe des T-Tests bestimmt.

2.2.7 Objektträger

Um die transfizierten Zellen auch morphologisch beurteilen zu können, ließ man sie auf speziellen, für die Kultivierung von Zellen geeigneten Glas-Objektträgern anwachsen. Diese Culture Slides waren mit einem Aufsatz von jeweils vier Kammern versehen, so dass vier unterschiedliche Zellansätze pro Objektträger kultiviert werden konnten. 72 Stunden nach der Transfektion wurden 7100 Zellen in 1 ml Nährmedium pro Kammer ausplattiert, davon jeweils eine Kammer mit untransfizierten MDA-MB231-Zellen, eine mit den mit NK-siRNA transfizierten Zellen, sowie je eine mit den mit Fra1-siRNA bzw. mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt, pro Kammer mit 1 ml D-PBS gewaschen und nachfolgend auch dieses abgesaugt.

Nun konnten die Zellen auf dem Culture Slide fixiert werden, wofür sie zunächst 10 min in einem Methanol/Aceton-Gemisch (Verhältnis 2:1) belassen wurden. Im Anschluss wurden sie für 10 min in 76 %iges Ethanol gegeben. Daraufhin konnte man die Kammer-Aufsätze von den eigentlichen Objektträgern lösen. Nach einer Trocknungszeit von 20 min an der Luft wurden sie bei -80°C gelagert.

Zur Visualisierung der Zellen wurden die Objektträger abschließend einer Hämalaun-Eosin-Färbung unterzogen. Zu diesem Zwecke wurden die Objektträger aufgetaut, 3 min in Hämalaun inkubiert, weitere 3 min unter fließendem Leitungswasser gewässert und 2-3x in Eosin eingetaucht. Dem schloss sich ein erneutes Wässern an, bevor sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80 %, 96 %, 100 % Ethanol) und danach in Xylol getaucht wurden. Nach abschließendem Trocknen konnte der Objektträger mit Eukitt und Deckgläschen abgedeckt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Erfolgskontrolle des Western-Blot

Der Western-Blot diente als Bestätigung der erfolgreichen siRNA-Transfektion mit den Fra1- bzw. Fra2-Oligonukleotiden einerseits, andererseits wurde er als Methode zur Untersuchung der veränderten Expression der von Fra1 oder Fra2 gegebenenfalls regulierten Zielgene eingesetzt.

Damit eine genaue vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung, die gleichmäßige Beladung der Taschen des Western-Blot-Gels und damit die Qualität des Western-Blots gewährleistet war, wurde bei der späteren Inkubation mit Antikörpern jeweils eine Membran auf Actin als ein in allen eukaryoten Zellen vorkommendes, 46 kDa schweres Strukturprotein des Zytoskeletts detektiert. Die Verwertbarkeit des Western-Blots war durch jeweils vergleichbar starke, eindeutig identifizierbare Actin-Banden der mit unspezifischer siRNA transfizierten Negativkontrolle sowie der mit Fra1- bzw. mit Fra2-siRNA transfizierten Zellprotein-Proben gegeben.

3.2 Erfolgskontrolle der siRNA-Transfektion

3.2.1 Negativ- und Positivkontrolle

Die erfolgreiche Down-Regulation von Fra1 und Fra2 wurde im Western-Blot unter Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen überprüft. Über den Einsatz der Negativkontrolle als einer siRNA ohne bekannte Sequenzhomologie mit menschlichen Genen konnten unspezifische silencing-Effekte mit Auswirkungen auf die Fra1- und Fra2-Expression ausgeschlossen werden. Andererseits konnte durch Transfektion mit der gegen Lamin gerichteten Positivkontrolle die Wirksamkeit der eigentlichen RNA-Interferenz als Methode bestätigt werden.

3.2.2 Fra1

Die Proteine der transfizierten Zellen wurden nach deren Ernte und der anschließenden Proteinkonzentrationsbestimmung im Western-Blot analysiert. Die in der Transfektion mit Fra1-siRNA inkubierten Zellen zeigten dabei erwartungsgemäß durch Degradierung der Fra1-mRNA eine stark verminderte Expression von Fra1. In Abbildung 3.1 ist die schwächere Schwärzung in den mit Fra1-siRNA transfizierten Zellen im Bereich von 37-43 kDa gegenüber der Schwärzung der Negativkontrolle, welche die unbeeinflusste Fra1-Expression darstellt, deutlich erkennbar.

**NK- Fra1- Fra2-
siRNA siRNA siRNA**

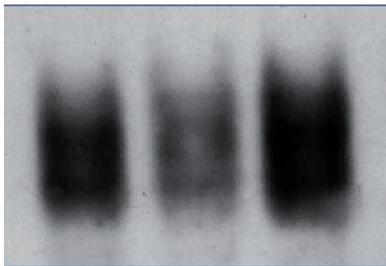


Abbildung 3.1

Bestätigung der Down-Regulation von Fra1 in den mit Fra1-siRNA transfizierten MDA-MB231-Zellen. Membran inkubiert mit gegen Fra1 gerichteten Antikörpern.

Die Fra1-Expression sank in dem fünffach durchgeführten Experiment auf Werte von 22-52 % (durchschnittlich 34 %) gegenüber der Negativkontrolle, welche nach densitometrischer Auswertung als 100 % gesetzt wurde. Auffällig ist neben der Down-Regulation von Fra1 in den mit Fra1-siRNA behandelten Zellen eine gleichzeitig beobachtbare Tendenz zur Up-Regulation von Fra1 in den mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen, deren Werte sich auf 69-170 % (durchschnittlich 126 %) der Negativkontrolle beliefen.

3.2.3 Fra2

Durch Degradierung der Fra2-mRNA mittels RNA-Interferenz konnte die Fra2-Expression in fünf Versuchen auf 13-44 % (durchschnittlich 31 %) im Vergleich zur Negativkontrolle ge-

senkt werden. Die spezifische Bande von Fra2 befindet sich, je nach Phosphorylierungsstadium, im Bereich von 40-46 kDa und ist wie auf Abbildung 3.2 sichtbar in diesem Bereich bei den mit Fra2-siRNA behandelten Zellen verringert.

**NK- Fra1- Fra2-
siRNA siRNA siRNA**

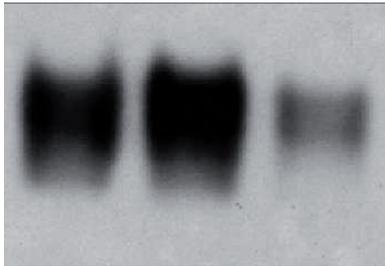


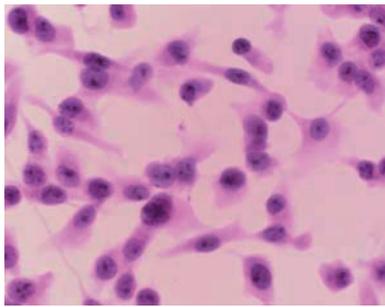
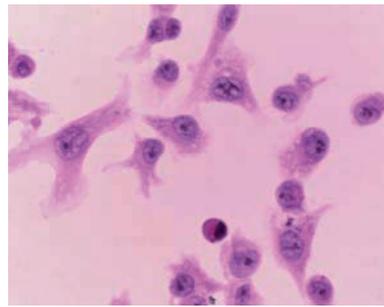
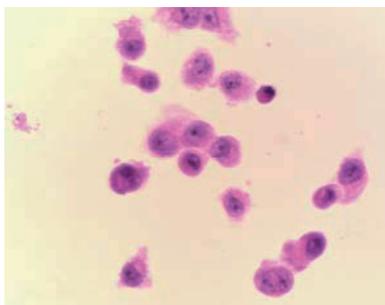
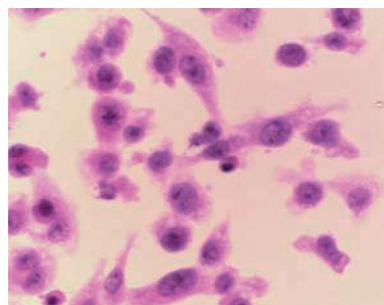
Abbildung 3.2

Bestätigung der Down-Regulation von Fra2 in den mit Fra2-siRNA transfizierten MDA-MB231-Zellen. Membran inkubiert mit gegen Fra2 gerichteten Antikörpern.

Analog zu der Up-Regulation von Fra1 in den mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen (siehe Abbildung 3.1) ist in Abbildung 3.2 die verstärkte Expression von Fra2 in den Fra1-herunterregulierten Zellen zu erkennen. Verglichen mit der Negativkontrolle zeigten sich hierbei Werte von 79-159 % (durchschnittlich 118 %).

3.3 Morphologie

Die humanen Adenokarzinomzellen MDA-MB231 besitzen im nativen Zustand eine mesenchymale Morphologie. Um die Auswirkungen der durch RNA-Interferenz verminderten Expression an Fra1 oder Fra2 auf die Zellgestalt sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit Hämalun-Eosin angefärbt. Hierbei wurden die transfizierten Zellen einerseits im Vergleich zu untransfizierten Zellen, andererseits zu den mit der Negativkontrolle transfizierten Zellen beurteilt.

**untransfiziert****NK-siRNA transfiziert****Fra1-siRNA transfiziert****Fra2-siRNA transfiziert****Abbildung 3.3**

Vergleich der mit Hämalaun-Eosin angefärbten untransfizierten Zellen mit den mit NK-, mit Fra1- und mit Fra2-siRNA transfizierten MDA-MB231-Zellen.

Es zeigten sich, wie Abbildung 3.3 entnehmbar, Unterschiede in der Morphologie bei den jeweiligen transfizierten Zellen. So waren die mit NK transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen dahingehend verändert, dass sie weniger Zellfortsätze ausbildeten und sowohl ein aufgelockerteres Zytoplasma als auch einen aufgelockerteren Nukleus aufwiesen als Letztere. Dies ist zurückzuführen auf unspezifische zytotoxische Effekte der für die Transfektion verwandten Reagenzien (siRNA-Oligonukleotid, RNAiFect Transfection Reagent). Um die mit Fra1- bzw. Fra2-siRNA transfizierten Zellen beurteilen zu können, ist es sinnvoll, sie mit den NK-Zellen zu vergleichen, da diese ebenso dem Einfluss der Transfektionsreagenzien ausgesetzt waren.

3.3.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1

Auffällig bei den mit Fra1-siRNA transfizierten Zellen war die fast vollständig fehlende Ausbildung der Zellfortsätze. Gleichzeitig zeigten sie größtenteils einen nur sehr schmal ausgebildeten Zytoplasmasaum, welcher aber ähnlich der NK einen schaumigen Charakter aufwies. Die Zellkerne ähnelten denen der untransfizierten Zellen.

3.3.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2

Die mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen zeigten wie die NK ein aufgelockertes Zytoplasma, wenngleich es etwas „ausgefranst“ erschien als das der Zellen der NK. Der Nukleus war ähnlich aufgelockert. Im Gegensatz zu den mit Fra1-siRNA transfizierten Zellen waren die Zellen mit verminderter Fra2-Expression zur Ausbildung von Zellfortsätzen in der Lage und glichen somit stark den Zellen der NK.

3.4 Zielgene

Unter der Fragestellung, wie sich die Expression bestimmter Zielgene nach Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 verändert, wurden die Zelllysate nach Transfektion im Western-Blot aufgetrennt und mit dem jeweils entsprechenden Antikörper inkubiert. Dabei wurde die Expression jedes zu untersuchenden Proteins aus drei verschiedenen Transfektionsversuchen analysiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden in die Gruppe der Mitglieder der AP1-Familie, die Gruppe der Regulatoren des Zellzyklus und die Gruppe der Regulatoren der Invasivität zusammengefasst. Alle angegebenen Prozentwerte sind Durchschnittswerte aus den einzelnen Transfektionsversuchen und beziehen sich auf die Negativkontrolle, deren Werte ebenfalls für jeden Versuch einzeln erfasst, gemittelt und als 100 % gesetzt wurden. Die Signifikanz der einzelnen Werte der Zielgene wurde durch den T-Test ermittelt.

3.4.1 Mitglieder der AP1-Familie

Es wurden alle Mitglieder sowohl der Jun-Gruppe als auch der Fos-Gruppe untersucht. In Abbildung 3.4 sind die unterschiedlichen Expressionsmuster der jeweiligen Proteine nach Transfektion mit Fra1- bzw. Fra2-siRNA graphisch dargestellt. Aufgrund der großen Streubreite der einzelnen Werte untereinander konnten diese nicht als signifikant gewertet werden.

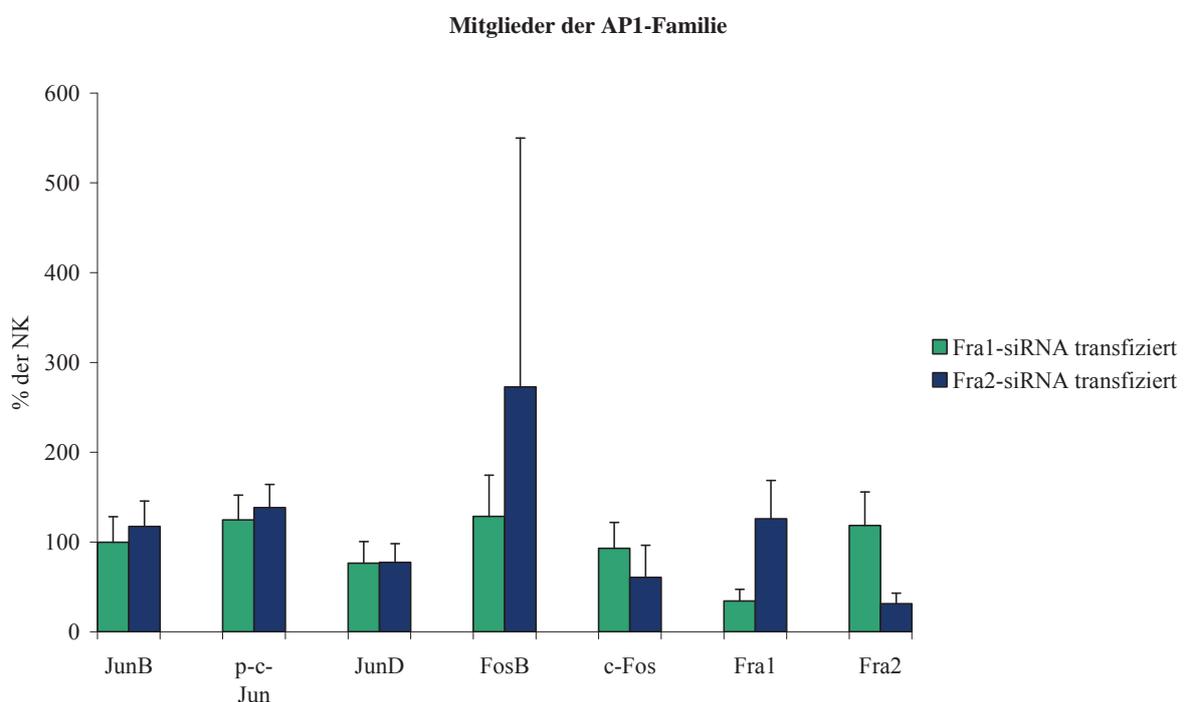


Abbildung 3.4

Expressionsmuster der AP1-Faktoren nach Transfektion der MDA-MB231-Zellen mit Fra1-siRNA (grün) bzw. Fra2-siRNA (blau). Die Werte der NK sind jeweils als 100 % definiert. Die Standardabweichungen sind als schmale schwarze Balken gekennzeichnet.

3.4.1.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1

Die Menge an exprimiertem Fra1 sank nach Transfektion mit der spezifischen, gegen Fra1-mRNA gerichteten siRNA auf durchschnittlich 34 % ab. Gleichzeitig fiel auf, dass sich im Zuge der Down-Regulation von Fra1 eine Tendenz zu einer leichten Überexpression von Fra2

auf durchschnittlich 118 % einstellte. Variable Expressionen zeigten sich für FosB (77-164 %, durchschnittlich 129 %) sowie p-c-Jun (98-153 %, durchschnittlich 125 %), welches die an Serin 63 phosphorylierte Form des c-Jun darstellt. Als ebenfalls in ihrer Expression nicht reproduzierbar verändert erwiesen sich JunB (67-119 %, durchschnittlich 100 %), c-Fos (70-125 %, durchschnittlich 93 %) und JunD (52-100 %, durchschnittlich 76 %).

3.4.1.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2

Nach siRNA-vermittelter Down-Regulation der Expression von Fra2 fiel die Menge an Fra2 im Durchschnitt auf 31 % gegenüber der NK ab. Auch hier ließ sich, ähnlich dem Verhalten von Fra2 bei Verminderung der Fra1-Expression (s.o.), im Rahmen der reduzierten Fra2-Expression eine Tendenz zur Up-Regulation von Fra1 auf 126 % beobachten. Reproduzierbar erhöht waren außerdem die Werte für p-c-Jun (110-160 %, durchschnittlich 138 %), während sich für c-Fos (27-98 %, durchschnittlich 61 %) verminderte Werte fanden. JunB (86-141 %, durchschnittlich 117 %), JunD (62-101 %, durchschnittlich 77 %) und FosB (95-592 %, durchschnittlich 273 %) zeigten keine reproduzierbaren Veränderungen. Bemerkenswert ist, dass, abgesehen von der inversen Korrelation zwischen Fra1 und Fra2, sich nach Down-Regulation von Fra2 ein ähnliches AP1-Expressionmuster wie nach Down-Regulation von Fra1 beobachten ließ.

3.4.2 Regulatoren des Zellzyklus

Von den an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Faktoren wurden nach Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 einige im Western-Blot untersucht. Hierzu gehörten einerseits die Cycline A, B, D1 und E, die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 und CDK4 sowie das Retinoblastom-Tumorsuppressor-Protein Rb und das ihm nah verwandte Rb2 (p130). Die teilweise sehr großen Standardabweichungen der Ergebnisse bei allen untersuchten Zellzyklusregulatoren aus der vergleichsweise geringen Anzahl von drei Western-Blot-Analysen mit den Proteinen drei verschiedener Transfektionen führen dazu, dass die Werte als nicht statistisch signifikant gelten können.

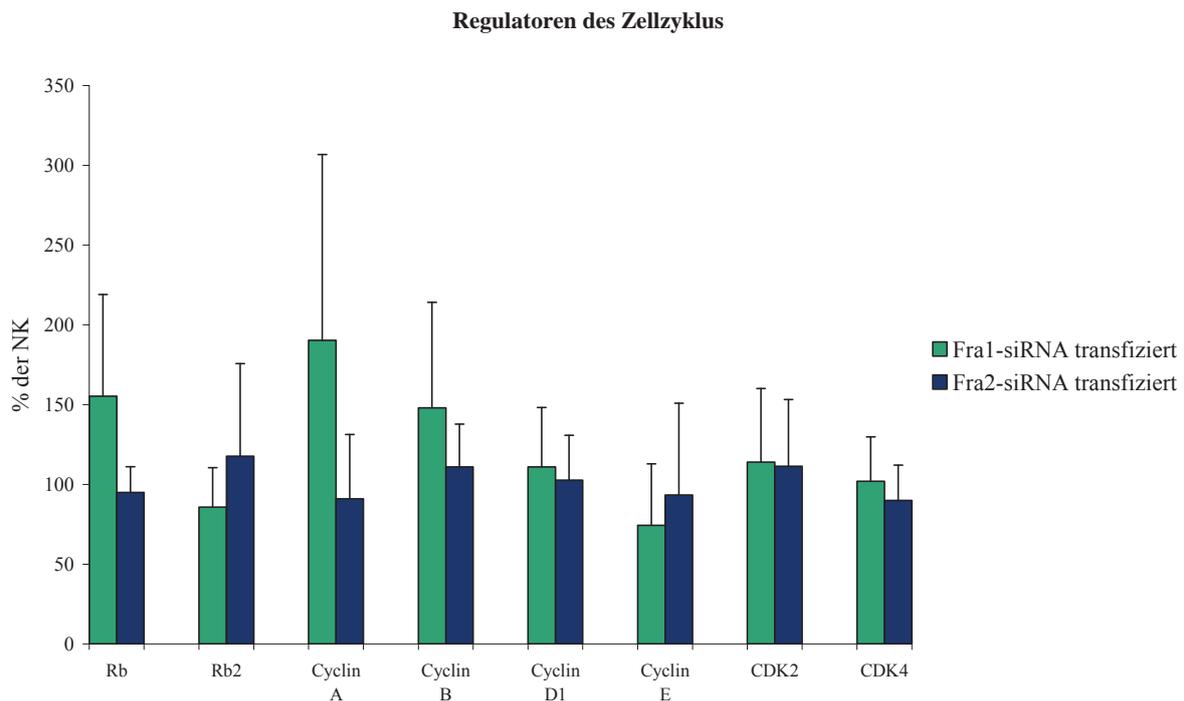


Abbildung 3.5

Expressionmuster einiger an der Regulation des Zellzyklus beteiligter Proteine nach Transfektion der MDA-MB231-Zellen mit Fra1-siRNA (grün) oder Fra2-siRNA (blau). Die Werte der NK wurden als 100 % definiert. Die Standardabweichungen sind als schwarze Balken dargestellt.

3.4.2.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1

Die durch die Degradierung der Fra1-mRNA hervorgerufene verminderte Expression des AP1-Faktors Fra1 hatte keine charakteristische Verschiebung des Expressionsmusters der hier untersuchten Zellzyklusregulatoren zur Folge. Die Expression von Rb, des in seiner aktiven, unphosphorylierten Form den Restriktionspunkt aufrechterhaltenden Genprodukts des Retinoblastom-Gens belief sich auf 83-203 % (durchschnittlich 155 %), die des aus der gleichen Familie stammenden Rb2 auf 57-101 % (durchschnittlich 86 %).

Die den Zellzyklus unterhaltenden, hier untersuchten Cycline zeigten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen, da die Werte für Cyclin A (80-312 %, durchschnittlich 190 %), Cyclin B (88-219 %, durchschnittlich 148 %), Cyclin D1 (76-150 %, durchschnittlich 111 %) und Cyclin E (40-116 %, durchschnittlich 74 %) keine reproduzierbaren Tendenzen erkennen lie-

ßen. Ähnlich verhielt es sich mit den mit Cyclin A, D1 und E Komplex-bildenden Kinasen CDK2 (84-167 %, durchschnittlich 114 %) und CDK4 (84-134 %, durchschnittlich 102 %).

3.4.2.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2

Die Verminderung von Fra2 ergab ähnlich variable Veränderungen bezüglich der Expression der hier untersuchten Zellzyklusregulatoren wie die Beobachtungen nach Fra1-Silencing. So zeigte sich nach Fra2-Down-Regulation die Expression von Rb auf 82-113 % (durchschnittlich 95 %) verändert, während Rb2 Werte von 72-183 % (durchschnittlich 118 %) verzeichnen ließ.

Die Expression der Cycline zeigte insgesamt ebenfalls nur geringe Veränderungen. Cyclin A wies Werte von 62-137 % (durchschnittlich 91 %), Cyclin B von 87-140 % (durchschnittlich 111 %), Cyclin D1 von 84-135 % (durchschnittlich 103 %) und Cyclin E von 45-157 % (durchschnittlich 93 %) auf.

Die Cyclin-abhängigen Kinasen variierten in ihrer Expression ebenso nur unbemerkenswert. Die Werte für CDK2 beliefen sich auf 73-156 % (durchschnittlich 111 %), die für CDK4 auf 65-107 % (durchschnittlich 90 %).

3.4.3 Regulatoren der Invasivität

Zu den im Western-Blot untersuchten Regulatoren der Invasivität gehörten einerseits der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI1) als Hemmstoff des uPA, andererseits das MMP1, auch als Kollagenase-1 bezeichnet, aus der Familie der Matrix-Metalloproteinasen. Für keinen der sich nach Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 einstellenden Werte dieser beiden Faktoren ergab sich dabei eine statistische Signifikanz.

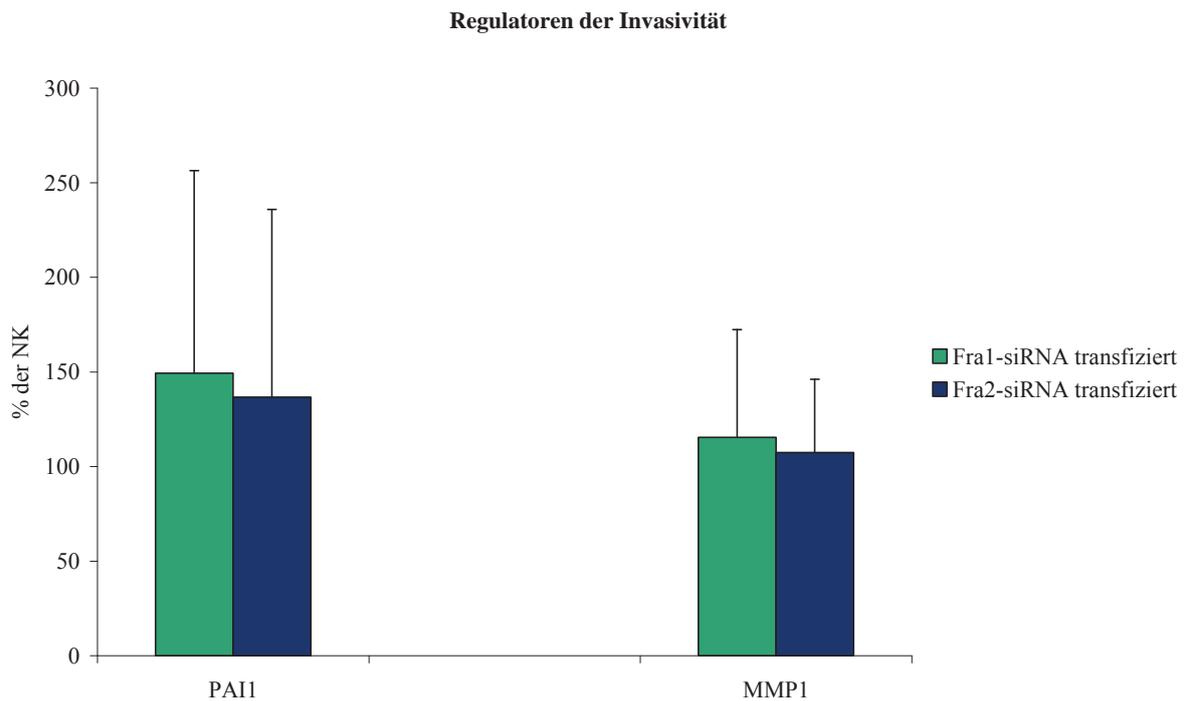


Abbildung 3.6

Expressionsmuster der an der Invasivität beteiligten Faktoren PAI1 und MMP1 nach Transfektion der MDA-MB231-Zellen mit Fra1-siRNA (grün) oder Fra2-siRNA (blau). Die NK entspricht definitionsgemäß 100 %. Die Standardabweichungen sind als schwarze Balken dargestellt.

3.4.3.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1

Die Werte für PAI1 lagen nach Transfektion mit Fra1-siRNA bei 41-255 % (durchschnittlich 149 %) im Vergleich zur Negativkontrolle. Für MMP1 ergaben sich Werte von 72-180 % (durchschnittlich 115 %).

3.4.3.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2

Die reduzierte Expression von Fra2 wirkte sich im Bezug auf die untersuchten Faktoren der Invasivität ähnlich aus wie deren Expression in den mit Fra1-siRNA transfizierten Zellen.

PAI1 ließ Werte von 50-245 % (durchschnittlich 137 %) und MMP1 von 82-152 % (durchschnittlich 107 %) verzeichnen.

3.5 Gesamtproteinmengen

Um zu überprüfen, welche Auswirkung die Down-Regulation von Fra1 einerseits und die von Fra2 andererseits auf den Gesamtgehalt an Protein der MDA-MB231-Zellen 72 Stunden nach Transfektion hatte, wurden die Proteinmengen aus fünf verschiedenen Transfektionsversuchen über die photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung errechnet, gemittelt, und die sich daraus ergebenden Werte in nachfolgender Grafik dargestellt. Der Wert der Negativkontrolle, welcher den Proteingehalt der mit NK-siRNA-transfizierten Zellen ebenfalls 72 Stunden nach Transfektion angibt, wurde als 100 % gesetzt und die Werte der mit Fra1- oder Fra2-siRNA transfizierten Zellen dazu in Verhältnis gesetzt. Die Standardabweichungen sind als schwarze Balken dargestellt.

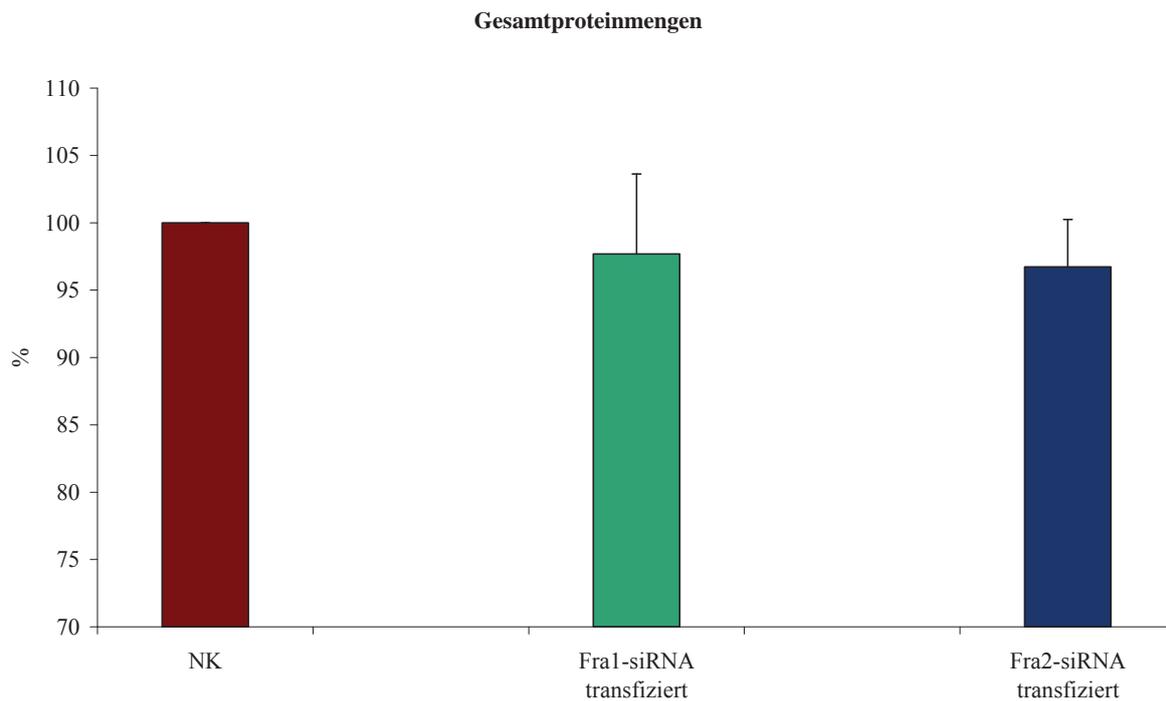


Abbildung 3.7

Gehalt an Protein der mit Fra1-siRNA (grün) oder Fra2-siRNA (blau) transfizierten MDA-MB231-Zellen. Die NK (rot) wurde als 100 % definiert. Die Standardabweichungen sind durch die schmalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Man beachte, dass die x-Achse die y-Achse in dieser Grafik zwecks besserer Darstellung bei 70 % schneidet.

Zu beobachten war bei beiden herunterregulierten AP1-Faktoren ein jeweils gering vermindertes Gesamtproteingehalt der Zellen. Bei der Transfektion mit Fra1-siRNA belief sich dieser Wert auf 98 % gegenüber der NK, bei den mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen ergab sich eine Verminderung der Proteinmenge auf 97 %. Beide Werte erwiesen sich im T-Test als nicht signifikant und ihre Aussagekraft ist auch durch die geringen Unterschiede zur Negativkontrolle als eingeschränkt zu sehen.

3.6 Proliferation

Weiterhin stellte sich die Frage, inwieweit die AP1-Faktoren Fra1 und Fra2 Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der MDA-MB231-Zellen nehmen. Unter Verwendung des MTT-Tests,

welcher durch die Umsetzung eines Tetrazolium-Salzes in Formazan-Kristalle durch lebende Zellen Aussagen über deren Anzahl machen lässt, lassen sich Rückschlüsse auf die Zellproliferation ziehen.

Da die Zellen 72 Stunden nach Transfektion in das 96-Well-Plate ausgesät wurden, dort 24 Stunden bis hin zur Zugabe des Tetrazolium-Salzes anwuchsen und anschließend noch weitere 4 Stunden bis zur Zugabe der Solubilization-Lösung inkubierten, ergibt sich, dass die im Elisa-Reader gemessene Absorption in etwa der Zellmenge 100 Stunden nach Transfektion entspricht.

Pro Versuch wurden für die NK, für die mit Fra1- und für die mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen jeweils drei Absorptionswerte der in den Zellen umgesetzten Formazan-Kristalle im Elisa-Reader gemessen und diese gemittelt. Die Werte der NK wurden als 100 % festgelegt und die Werte der Fra1- bzw. Fra2-siRNA-transfizierten Zellen dazu in Verhältnis gesetzt. In dieser Weise wurde mit den Zellen dreier verschiedener Transfektionsversuche verfahren und die sich ergebenden Werte letztlich unter Angabe der Standardabweichung in der folgenden Abbildung zusammengefasst. Als statistisch signifikant gelten nur im T-Test ermittelte p-Werte $\leq 0,05$.

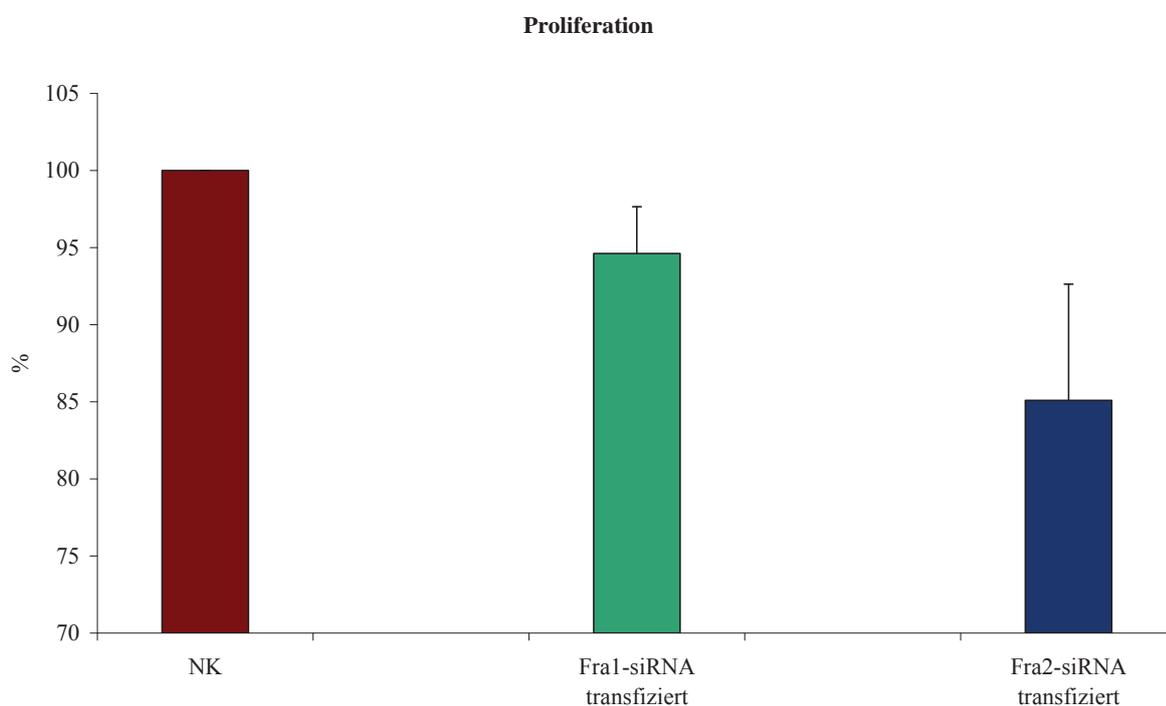


Abbildung 3.8

Menge der mit Fra1-siRNA (grün) oder Fra2-siRNA (blau) transfizierten MDA-MB231-Zellen ca. 100 Stunden nach Transfektion als Maß für die Proliferation. Die NK (rot) wurde als 100 % definiert. Die Standardabweichungen sind als schmale Balken dargestellt. Man beachte, dass die x-Achse die y-Achse in dieser Grafik zwecks besserer Darstellung bei 70 % schneidet.

Wie Abbildung 3.8 zu entnehmen ergab sich eine reduzierte Proliferation für die mit Fra1-siRNA transfizierten Zellen auf 95 % der NK ($p=0,001$). Die Zellzahl der mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen betrug 85 % der NK ($p<0,001$) und war damit noch stärker vermindert. Da die p-Werte beider transfizierter Zellsorten unter 0,05 liegen gelten diese Ergebnisse als signifikant.

3.7 Invasivität

Unter der Fragestellung, welche Rolle die AP1-Faktoren Fra1 und Fra2 bei Invasionsprozessen spielen, wurde das Verhalten der transfizierten MDA-MB231-Zellen im Invasionsassay untersucht. Hierbei beschrieb das Durchwandern der Basalmembran-ähnlichen Matrigel-Membran das invasive Potential der Zellen. Damit kann die Anzahl der durch die Membran diffundierten Zellen als Maß für die Invasivität gesehen werden.

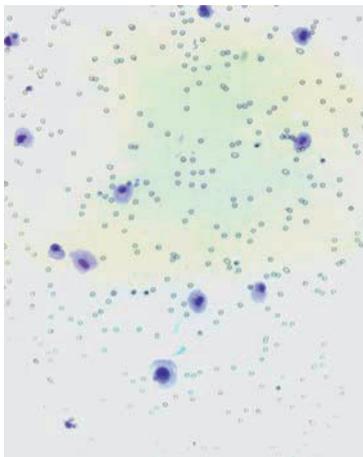


Abbildung 3.9

Veranschaulichung der transfizierten, durch die Matrigel-Membran gewanderten, angefärbten MDA-MB231-Zellen. Im Hintergrund sind die 8 μm großen Poren der PET-Membran zu erkennen, durch die es den Zellen ermöglicht wird, nach Durchdringen der Matrigel-Membran auf die Unterseite der Inserts zu gelangen.

Um das unterschiedliche Invasionsverhalten der mit NK-, mit Fra1- oder mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen verlässlich beurteilen zu können, wurden pro Invasionsassay für jede transfizierte Zellart vier mit der Matrigel-Membran beschichtete Inserts verwendet und die durch diese Membran hindurch gewanderten Zellen ausgezählt. Die Anzahl der mit der NK-siRNA transfizierten Zellen, welche die Matrigel-Membran durchschritten hatten, wurde als 100 % definiert und galt somit als Bezugsgröße für die mit Fra1- oder Fra2-siRNA transfizierten Zellen. Insgesamt wurden drei Invasionsassays durchgeführt, ausgewertet und deren Signifikanz mit Hilfe des T-Tests ermittelt. Die Ergebnisse dieser drei Invasionsassays sind in Abbildung 3.10 zusammengefasst dargestellt.

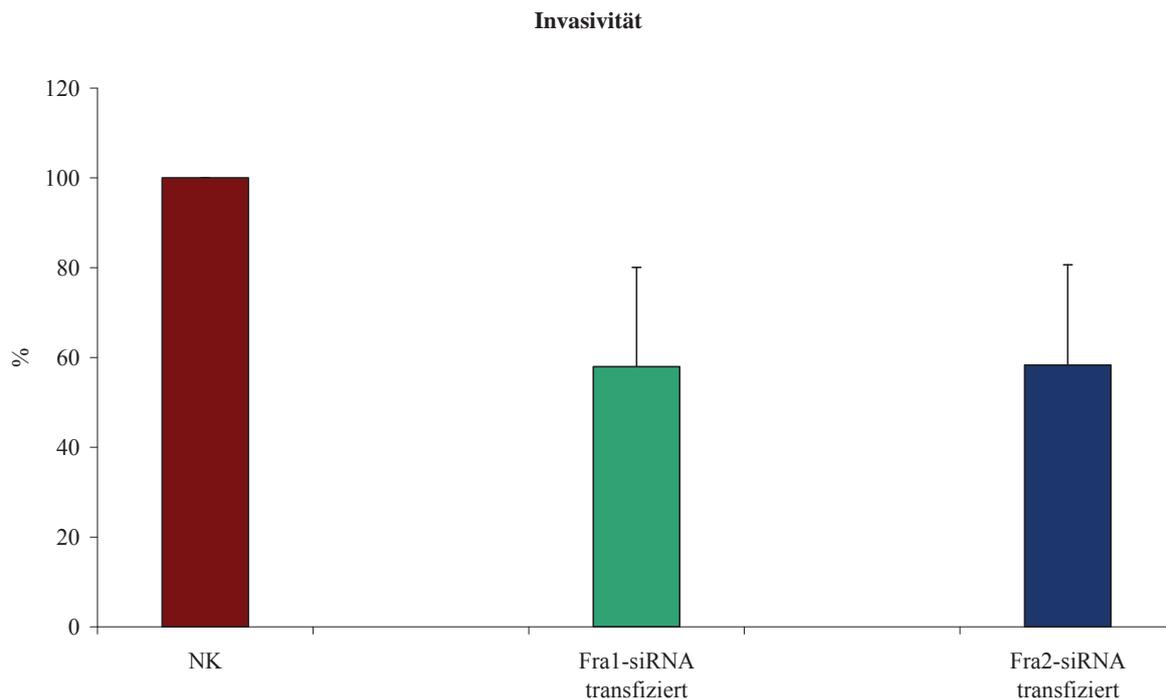


Abbildung 3.10

Als Maß für die Invasivität anzusehender prozentualer Anteil der mit NK- (rot), mit Fra1- (grün) oder mit Fra2-siRNA (blau) transfizierten MDA-MB231-Zellen, welche die Matrigel-Membran durchwandert haben. Der Wert der NK wurde mit 100 % als Referenzwert festgelegt. Die Standardabweichungen sind als schmale schwarze Balken dargestellt.

3.7.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1

Eine Reduktion der Expression von Fra1 in den MDA-MB231-Zellen führte zu einer Verminderung ihrer invasiven Eigenschaften. Im Vergleich zur NK lag der prozentuale Anteil der Zellen, die in der Lage waren, durch die Matrigel-Membran auf die Unterseite der Inserts zu gelangen, bei 58 %. Im T-Test ergab sich dafür ein Wert von $p < 0,001$, was die Signifikanz dieses Sachverhalts beweist.

3.7.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2

Nach Down-Regulation von Fra2 zeigte sich, wie auch nach Down-Regulation von Fra1, eine verminderte Invasivität der Zellen. Auch hier war es nur 58 % der Zellen möglich, die Matrigel-Membran zu überschreiten. Dieses Verhalten ist ebenfalls als signifikant zu werten ($p < 0,001$). Die mit Fra1- bzw. Fra2-siRNA behandelten Zellen zeigen also ähnliche Eigenschaften im Bezug auf ihr invasives Verhalten.

3.8 Motilität

Die Motilität beschreibt das Potential der Zellen, sich zu bewegen und damit gewisse Distanzen zu überbrücken. Um zu untersuchen, wie sich dieses Verhalten nach Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 verändert, wurde im Invasionsassay nicht nur die Invasivität mit Hilfe der Matrigel-Membran untersucht, sondern auch die Motilität anhand des Durchwanderungsverhaltens der Zellen von der Oberseite durch 8 μm große Poren hindurch auf die Unterseite der PET-Membran (Control-Membran). Die Anzahl der Zellen der NK, welche diesen Weg zurückgelegt hatten, wurde als 100 % definiert und die Anzahl der Zellen der mit Fra1- oder Fra2-siRNA transfizierten Zellen dazu in Verhältnis gesetzt. Abbildung 3.11 stellt dieses Verhältnis graphisch dar.

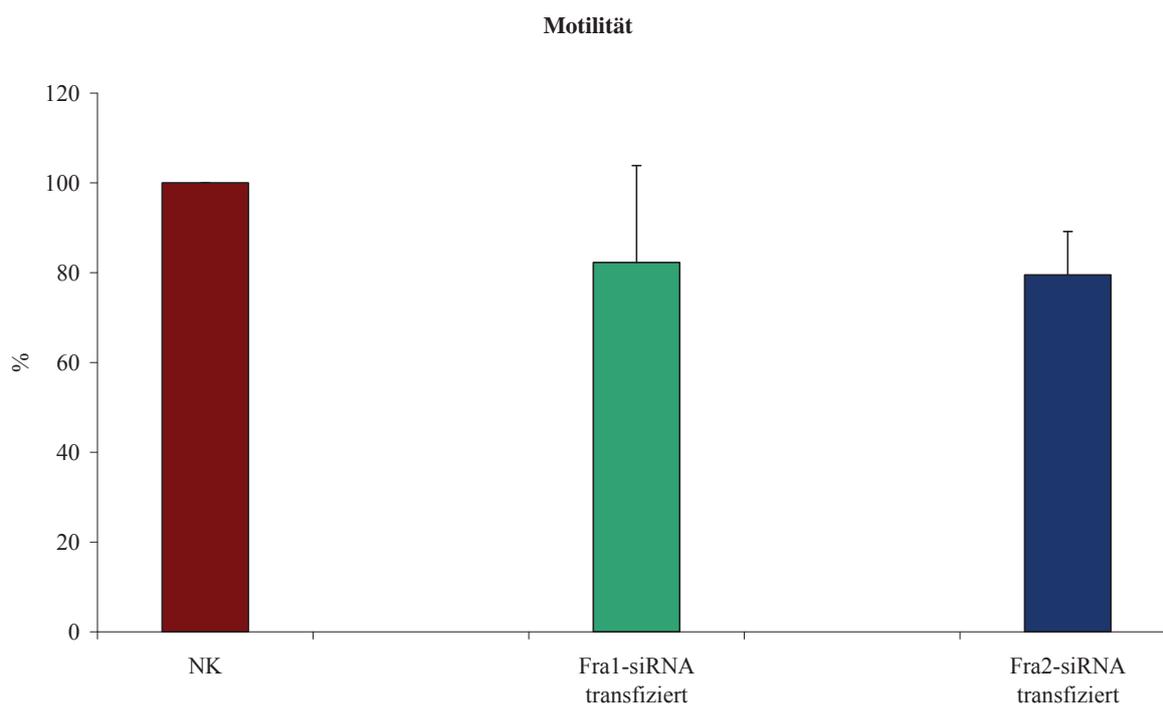


Abbildung 3.11

Als Maß für die Motilität anzusehender prozentualer Anteil der mit NK- (rot), mit Fra1- (grün) oder mit Fra2-siRNA (blau) transfizierten MDA-MB231-Zellen, welche die PET-Membran durchwandert haben. Der Wert der NK wurde mit 100 % als Referenzwert festgelegt. Die Standardabweichungen sind als schmale schwarze Balken dargestellt.

3.8.1 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra1

Die verringerte Expression von Fra1 hatte zur Folge, dass weniger Zellen durch die Poren der PET-Membran auf die Unterseite der Control-Inserts gelangten. Das motile Potential, ausgedrückt in Prozent, sank in den mit Fra1-siRNA transfizierten Zellen auf 82 % der NK ($p=0,016$). Dies beschreibt eine signifikante Minderung der Motilität.

3.8.2 Der Einfluss der Down-Regulation von Fra2

Die Down-Regulation von Fra2 zog ebenfalls eine Reduzierung des motilen Verhaltens der Zellen nach sich. Die Motilität der mit Fra2-siRNA behandelten Zellen sank auf 79 % gegenüber der NK ($p < 0,001$). Der im T-Test ermittelte p-Wert besagt auch hier, dass diese Verringerung der motilen Eigenschaften von statistischer Signifikanz ist.

3.9 Invasionsindex

Der Invasionsindex ergibt sich aus dem Quotienten der prozentualen Invasion der mit Fra1- oder mit Fra2-siRNA transfizierten Zellen und der prozentualen Invasion der NK-Zellen. Diese prozentuale Invasion wiederum wird errechnet aus dem Quotient des Mittelwerts der durch die Matrigel-Membran gewanderten Zellen und des Mittelwerts der durch die Control-Membran gewanderten Zellen.

Für Abbildung 3.12 wurden die Invasionsindices aus drei verschiedenen Invasionsassays zusammengefasst dargestellt. Dazu wurden für jeden einzelnen Invasionsassay die Anzahl der ausgezählten Zellen pro transfizierter Zellart gemittelt und der Invasionsindex berechnet.

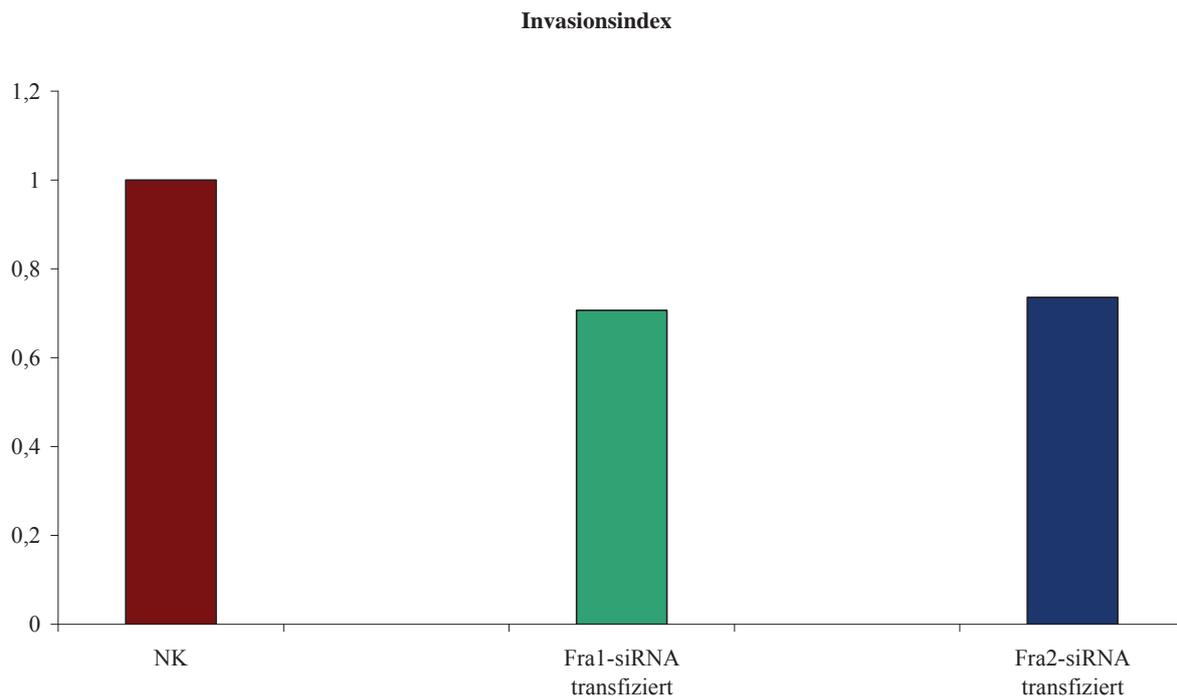


Abbildung 3.12

Vergleich der Invasionsindices der mit NK- (rot), Fra1- (grün) oder Fra2-siRNA (blau) transfizierten MDA-MB231-Zellen.

Für die NK ergab sich ein Invasionsindex von 1; der Index der mit Fra1-siRNA transfizierten Zellen lag bei 0,707 und derjenige der mit Fra2-siRNA behandelten Zellen bei 0,736.

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf die Morphologie der MDA-MB231-Zellen

Die Morphologie von Tumorzellen bzw. die morphologischen Veränderungen von Zellen im Prozess der malignen Transformation sind von großer Bedeutung bezüglich ihres invasiven Potentials. Letzteres hängt bei Tumorzellen einerseits von der Migrationsfähigkeit, welche beispielsweise durch Verlängerung der Zellen und die Ausbildung von Pseudopodien bedingt wird, andererseits aber auch von der Degradation bestimmter Bestandteile der extrazellulären Matrix durch sezernierte Proteasen ab [Friedl und Wolf 2003].

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigten die MDA-MB231-Zellen nach Verminderung der Expression von Fra1 mittels siRNA-Silencing eine wesentlich reduzierte Ausprägung ihrer im untransfizierten Zustand vorhandenen Zellfortsätze, während Fra2 keinen Einfluss auf die Zellausläufer zu haben schien. Dies deckt sich mit früheren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, in denen mittels transienter Transfektion mit Expressionsvektoren unter anderem für Fra1 und Fra2 eine Überexpression dieser AP1-Faktoren in MDA-MB231-Zellen erzielt wurde. Hier zeigte sich, dass Zellen mit überexprimiertem Fra1 eine verlängerte Zellform mit langen Zellextensionen ausbildeten, während die Fra2-überexprimierenden Zellen dem Phänotyp der untransfizierten Zellen ähnelten [Milde-Langosch et al. 2004]. Auch Belguise et al. konnten 2005 durch siRNA-Experimente den Wechsel der fibroblastoiden MDA-MB231-Zellen hin zu einer mehr runden und epitheloid-ähnlichen Zellmorphologie nach Down-Regulation von Fra1 nachweisen.

In epithelialen Adenokarzinomzellen der Maus, den CSML0-Zellen, führte eine exogene Expression von Fra1 zu vermehrten mesenchymalen Charakteristika und Konversion zu einem fibroblastoiden Phänotyp mit Zellverlängerung [Kustikova et al 1998]. Für diese morphologische Veränderung wurde in einer weiterführenden Studie die N-terminale Domäne des Fra1-Proteins als verantwortlich befunden. Ebenso wie Fra1 nahm hierbei auch c-Fos Einfluss auf den Phänotyp, wohingegen Fra2 keine zellmorphologischen Veränderungen hervorrief. Da c-Fos ein wesentlich stärkeres transaktivierendes Potential besitzt als Fra1 oder Fra2, ließ dies

darauf schließen, dass die Fähigkeit zur morphologischen Transformation nicht direkt mit dem transaktivierenden Potential der AP1-Faktoren zusammenhängt [Andersen et al. 2002]. Tkach et al. fanden, dass Fra1 die Anordnung des Actin-Zytoskeletts in den CSML0-Zellen veränderte. Und ebenso wie in Letzteren hatte eine Fra1-Überexpression auch in der aus Mäusen isolierten L929-Fibroblasten-Zelllinie ähnliche Effekte bezüglich der Morphologie [Tkach et al. 2003].

In anderen Zellsystemen, so z.B. in Rat-1A-Fibroblasten, rief eine ektope Fra1-Überexpression keinerlei morphologische Veränderungen hervor, die Zellen wiesen aber dennoch onkogenes Potential auf [Bergers et al. 1995]. Am Beispiel von Ratten-Thyreozyten konnten Vallone et al. einen klaren Effekt einer Fra1-Inhibition auf die Morphologie der transformierten Zellen zeigen, während eine vermehrte Fra1-Expression in normalen Zellen zu keiner Veränderung des Phänotyps führte. Daraus ergab sich ihre Annahme, dass die Überexpression von Fra1 zwar für die Etablierung des transformierten Phänotyps notwendig sei, dafür alleine aber nicht ausreiche [Vallone et al. 1997].

4.2 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf Mitglieder der AP1-Familie als Zielgene in MDA-MB231-Zellen

Um zu verstehen, inwiefern die Expressionsmuster der verschiedenen AP1-Faktoren durch Fra1 und Fra2 beeinflusst werden, wurde der Effekt der Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 auf die Genexpression der übrigen AP1-Faktoren untersucht. Dazu wurden die Proteine der transfizierten Zellen im Western-Blot aufgetrennt, mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert und ihre Quantität anschließend densitometrisch bestimmt. Sowohl nach verminderter Expression von Fra1 als auch von Fra2 ergaben sich nach Auswertung von drei Experimenten keine als statistisch signifikant zu bewertenden Veränderungen in der AP1-Zusammensetzung. Augenfällig war jedoch eine inverse Korrelation zwischen Fra1 und Fra2 sowie eine reproduzierbare Tendenz zur Erhöhung der Expression von p-c-Jun und zur Verminderung der c-Fos-Expression nach Transfektion mit Fra2-siRNA.

Die Expression von Fra1 erfolgt neben anderen Mechanismen über die Aktivierung einer AP1-Bindungsstelle im ersten Intron des für Fra1 codierenden Gens, d.h. seine Transkription wird durch AP1-Aktivität positiv reguliert [Bergers et al. 1995].

Einen Zusammenhang von Fra1 und anderen AP1-Faktoren beschrieben Bamberger et al. in ihrer Studie über die Expressionsmuster der AP1-Transkriptionsfaktoren in klinischen Gewebeproben aus 53 Brustkrebstumoren. Sie beobachteten eine negative Korrelation zwischen Fra1 und FosB, jedoch keine weitere Korrelation zwischen Fra1 oder ebenso zwischen Fra2 und den übrigen Mitgliedern der AP1-Familie [Bamberger et al. 1999]. Langer et al. fanden ihrerseits an klinischem Mamma-Tumormaterial signifikante positive Korrelationen von Fra1 mit c-Jun, c-Fos, JunD und Fra2, während sich Fra2 außer mit Fra1 mit keinem anderen der AP1-Faktoren signifikant korrelieren ließ. Dies könnte also, verglichen mit den hier vorgestellten Ergebnissen, auf eine unterschiedliche Verhaltensweise dieser zwei Fos-Faktoren in klinischem Tumormaterial und in MDA-MB231-Zellen hinweisen. Daneben zeigte sich bei Langer et al. eine erhöhte Überlebensrate in den Patienten mit stark Fra1-exprimierenden Tumoren, so dass für Fra1 hier eine dem JunB ähnliche tumorsupprimierende Wirkung vorgeschlagen wurde [Langer et al. 2006].

Analog zu der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Down-Regulation von Fra1 und Fra2 wurde im Jahre 2004 von unserer Arbeitsgruppe die entsprechenden Veränderungen der Fos- und Jun-Proteine nach transienter Transfektion mit AP1-Faktoren untersucht. Hierbei ergaben sich sowohl in MCF7-Zellen als auch in MDA-MB231-Zellen nach Überexpression von Fra1 oder Fra2 jeweils erhöhte Werte für c-Jun, sowie erhöhte Werte für JunB nach Fra2-Überexpression in MCF7-Zellen [Milde-Langosch et al. 2004]. Im Vergleich mit den hier vorgestellten Resultaten lassen sich diese Erkenntnisse nicht in Deckung bringen.

Eine Korrelation zwischen c-Jun und Fra1 in MCF7-Zellen wurde auch von Smith et al. beschrieben. Dort erhöhte die Transfektion mit c-Jun die vorher nicht detektierbare Expression von Fra1, was, da Fra1 eine inhibitorische Wirkung auf die c-Jun-Aktivität besitzt, als möglicherweise kompensatorisch auftretender Effekt gedeutet wurde [Yoshioka et al. 1995, Smith et al. 1999].

In ras-transformierten Fibroblasten zeigten Fra1-beinhalten AP1-Komplexe repressive Auswirkungen auf die Geninduktion von c-Fos [Kessler et al. 1999]. Eine reduzierte generelle AP1-Aktivität konnte nach Fra1-Überexpression in humanen epidermalen Keratinozyten sowie in der neoplastischen Zelllinie COLO-16 beobachtet werden [Serewko et al. 2002].

Insgesamt betrachtet erweisen sich die Veränderungen in den Expressionsmustern der AP1-Faktoren innerhalb unterschiedlicher Zellsysteme als komplexe Prozesse, deren weitere Erforschung sicherlich zu einem besseren Verständnis dieser Regulationsmechanismen beitragen würde.

4.3 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf Proliferation, Gesamtproteinmenge und auf Regulatoren des Zellzyklus als AP1-Zielgene in MDA-MB231-Zellen

Die Kontrolle der Proliferation durch AP1-Transkriptionsfaktoren scheint hauptsächlich durch deren Fähigkeit, die Expression und Funktion von Faktoren des Zellzyklus zu regulieren, bestimmt zu sein. Proliferation und Expression dieser Faktoren sind also unmittelbar miteinander verknüpft und daher auch in diesem Kapitel zusammengefasst.

Der Gesamtproteingehalt der Zellen nach Down-Regulation von Fra1 bzw. von Fra2 zeigte in den hier durchgeführten Versuchen nur äußerst dezente, nicht signifikante, jedoch reproduzierbar verringerte Werte auf 98 % (transfiziert mit Fra1-siRNA) bzw. 97 % (transfiziert mit Fra2-siRNA). Diese diskreten Veränderungen könnten einerseits auf eine durch die Transfektion bedingte generell verminderte Proteinproduktion in den Zellen hinweisen, andererseits aber auch auf die ebenfalls reduzierte Proliferationsfähigkeit der Zellen zurückzuführen sein.

Die Proliferation wurde ihrerseits von Fra1 und Fra2 beeinflusst, und zwar in der Weise, dass sie durch die Down-Regulation von Fra1 leicht (95 %) und durch die Down-Regulation von Fra2 stärker (85 %) gehemmt wurde. Beide Werte erwiesen sich als signifikant.

Diese Tendenz zu einer reduzierten Proliferation in Zellen mit vermindertem Fra1 wird durch deutlichere Ergebnisse von Belguise et al. unterstützt. Die verminderte Expression von Fra1 war dort in der Lage, die Proliferation von MDA-MB231-Zellen in 10 %igem Serum um das 4,5fache und in 1 %igem Serum fast vollständig zu hemmen. Gleichzeitig wirkte eine Fra1-Überexpression in MCF7-Zellen in 1 %igem Serum proliferationsfördernd, wenngleich auch in 10 %igem Serum keine signifikanten Veränderungen zu beobachten waren [Belguise et al. 2005]. In Ovarialkarzinom-Zellen bewirkte die Transfektion mit Fra1-siRNA eine Reduktion der Proliferationsrate um 50 % [Hapke et al. 2003], während in Colonkarzinom-Zellen keine Auswirkungen von Fra1 auf die Zellproliferation festzustellen waren [Vial et al. 2003].

Für den Einfluss von Fra2 auf die Proliferation von Zellen liegen weitaus weniger Daten vor. Die positive Korrelation von Fra2 und Proliferationsrate, die in den hier vorgestellten Ergebnissen in MDA-MB231-Zellen zu beobachten war, konnte durch stabile Transfektion an MCF7-Zellen nicht bestätigt werden [Milde-Langosch et al. 2008].

Die in dieser Arbeit untersuchten Zellzyklus-Proteine (Rb, Rb2, Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4) der transfizierten Zellen lassen aufgrund der großen Streubreite der Werte keine signifikanten oder reproduzierbaren Aussagen über die Auswirkungen der Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 auf die AP1-Zielgene des Zellzyklus zu.

In der oben bereits erwähnten Studie von Belguise et al. fand sich dagegen für Cyclin D1 eine reduzierte Expression in mit Fra1-siRNA transfizierten Zellen, sowie erhöhte Werte in MCF7-Zellen mit Fra1-Überexpression [Belguise et al. 2005]. Der Zusammenhang zwischen Fra1, dem Zellzyklusstimulator und Fra1-Zielgen Cyclin D1 und einer abnormen Proliferation wurde auch durch Versuche an transgenen Mäusen verdeutlicht. Diese entwickelten durch eine gesteigerte Zellproliferation nach Cyclin D1-Überexpression Adenokarzinome der Mamma, was die onkogene Rolle des Cyclin D1 betont [Wang et al. 1994].

Eine ausführliche Studie über den Zusammenhang zwischen Jun- und Fos-Faktoren und einigen Zellzyklus-Regulatoren (Rb, p16, p21, p27, Cyclin D1, Cyclin E und Ki67) in Brustkrebs-Tumorgewebe bzw. in vier verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien ergab positive Korrelationen von Fra1 mit p16, Cyclin E und dem Proliferationsmarker Ki67, sowie von Fra2 mit Cyclin E und Cyclin D1. Cyclin E fand sich darüber hinaus auch mit JunD und c-Fos assoziiert [Milde-Langosch et al. 2000]. Die Korrelationen mit Cyclin E überraschten besonders, da dies im Gegensatz zu Cyclin D1 kein TRE in seinem Gen aufweist. Die Expression des Cyclin D1 in Brustkrebszellen könnte dieser Studie zufolge zumindest teilweise durch AP1-Heterodimere mit Fra2 als ihrer Fos-Komponente reguliert werden. Die Expression von Cyclin E hingegen wurde als Zellzyklus-abhängig, durch eine E2F-Bindungsstelle in seinem Promotor vermittelt und als nicht durch extrazelluläre Stimuli induzierbar beschrieben [Botz et al. 1996, Geng et al. 1996]. Die oben beschriebenen Ergebnisse unterstützen den stimulierenden oder gar onkogenen Effekt von Fra1 und Fra2 in Brustkrebszellen. Dies konnte allerdings durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche bezüglich der Expression von AP1-Zielgenen des Zellzyklus nicht bestätigt werden. Weitere experimentelle Studien wären hier für eine eindeutige Klärung vonnöten.

Bei Milde-Langosch et al. fand sich darüber hinaus eine starke Rb-Expression mit c-Jun und FosB assoziiert, jedoch mit keinem weiteren der sieben untersuchten AP1-Faktoren [Milde-Langosch et al. 2000]. Die Regulation des Rb kann durch AP1 mittels der AP1-Bindungsstelle im Promotor seines Gens vermittelt werden [Linardopoulos et al. 1993].

In Endometrium-Karzinomen wurden Korrelationen zwischen Fra1 und p21 sowie zwischen Fra2 und Cyclin B1 gefunden [Bamberger et al. 2001]. Diese im Vergleich zu Mammakarzinomen verschiedenen Ergebnisse weisen offensichtlich auf unterschiedliche regulatorische

Mechanismen in verschiedene Zellarten, oder gar in verschiedenen histologischen Subtypen der Tumoren hin, lassen aber dennoch auf eine, wenn auch indirekte, Beteiligung von Fra1 und Fra2 an der Zellzyklusregulation und damit an der Zellproliferation schließen.

4.4 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf Regulatoren der Invasivität als AP1-Zielgene in MDA-MB231-Zellen

Als ein entscheidender Faktor für das Invasionsverhalten von Zellen gilt deren Möglichkeit, Komponenten der Basalmembran und der extrazellulären Matrix zu degradieren. Zu den in diesen Prozess involvierten Proteasen zählen unter anderem die Matrix-Metalloproteinasen und die Mitglieder des uPA/uPAR/PAI-Systems, welche demnach eine wichtige Rolle bei Tumorinvasion und Metastasierung spielen.

Inwiefern Fra1 und Fra2 unter den hier angewandten Versuchsbedingungen Einfluss auf die Expression von MMP1, auch als Kollagenase-1 bezeichnet, und PAI1 in MDA-MB231-Zellen nehmen, konnte durch die durchgeführten Experimente nicht abschließend geklärt werden, da die Veränderungen der MMP1- bzw. PAI1-Expression nach Down-Regulation von Fra1 oder Fra2 nicht reproduzierbar waren.

Einige Ergebnisse bezüglich der Zusammenhänge zwischen Fos-Faktoren und MMP1 bzw. PAI1 konnten jedoch in anderen Studien bereits gefunden werden. So war Fra1 in der epitheloiden Adenokarzinomzelllinie CSML0 in der Lage, die Transkription von uPA, uPAR und PAI1 zu aktivieren [Kustikova et al. 1998]. Andersen et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen und darüber hinaus feststellen, dass sich eine Transfektion mit c-Fos in gleicher Weise wie eine verstärkte Fra1-Expression auf die Mitglieder des uPA/uPAR/PAI1-Systems auswirkte, Fra2 im Gegensatz dazu jedoch uPA und uPAR nur schwach zu induzieren vermochte und nicht in der Lage war, die PAI1-Expression zu beeinflussen [Andersen et al. 2002]. Vielfältige klinische und experimentelle Daten weisen darauf hin, dass eine Erhöhung des uPA, des uPAR und des PAI1 mit Tumorprogression assoziiert sind und, besonders in Brustkrebs, mit einer ungünstigen Prognose einhergehen [Jänicke et al. 1991, Schmitt et al. 1997].

Eine positive Korrelation zwischen der MMP1- und der Fra1-Expression fand sich in den beiden Brustkrebszelllinien MCF7 bzw. MDA-MB231, deren Fra1-Expression mittels transienter bzw. siRNA-Transfektion moduliert wurde [Belguise et al. 2005]. Die regulatorische Wirkung der Jun- und Fos-Proteine auf die meisten MMPs, darunter auch MMP1, lässt sich über

eine AP1-Bindungsstelle in deren Promotorregion erklären. Neben anderen MMPs wurde die Expression von MMP1 in einer Vielzahl verschiedener Tumoren dokumentiert und stand dabei in inverser Korrelation mit dem Überleben [Brinckerhoff et al. 2000].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der erwähnten Studie von Belguise et al. stehen die Resultate einer Studie unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahre 2004. Hierbei fanden sich in der doppelmarkierten Fluoreszenz-Immunzytochemie nach transienter Transfektion mit Expressionsvektoren für Fra1 und Fra2 in MDA-MB231-Zellen, abgesehen von einer Hochregulation der PAI1-Expression in ungefähr der Hälfte der mit Fra1 transfizierten Zellen, keine Veränderungen bezüglich des Expressionsverhaltens von MMP1 und PAI1 [Milde-Langosch et al. 2004], was den anhand von Western-Blot-Analysen gewonnenen Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche entspricht. In der gleichen Studie von Milde-Langosch et al. konnte auch die Transfektion mit Fra1 oder Fra2 in MCF7-Zellen keine Veränderungen der MMP1-Expression bewirken. Jedoch waren hier beide Expressionsvektoren in der Lage, die PAI1-Expression stark zu erhöhen. Weiterhin stellte sich in der Analyse von 75 Proben aus Mammakarzinomgeweben im Hinblick auf die Koexpressionen von Fos-Proteinen und Faktoren der Invasivität eine positive Korrelation zwischen Fra2 und PAI1 sowie zwischen phosphoryliertem Fra2 und MMP1 dar, während zwischen Fra1 und PAI1 oder MMP1 keine Zusammenhänge zu beobachten waren [Milde-Langosch et al. 2004]. In einer weiterführenden Studie konnte die in klinischem Tumorgewebe aufgezeigte Korrelation zwischen Fra2 und PAI1 an mit Fra2 stabil transfizierten MCF7-Zellen nicht reproduziert werden [Milde-Langosch et al. 2008].

Insgesamt zeigt sich also, besonders bei Betrachtung der Mammakarzinom-Zellen, ein sehr heterogenes Bild bezüglich des Zusammenhangs zwischen den Fos-Proteinen Fra1 und Fra2 und dem proteolytisch wirkenden MMP1 und PAI1 als dem Inhibitor des uPA, was an diskrepananten Proteinausstattungen der verschiedenen Zellsorten einerseits, an abweichenden Versuchsbedingungen andererseits, oder aber an einem noch ungenügenden Verständnis der regulatorischen Mechanismen innerhalb der Zellen liegen könnte.

4.5 Der Einfluss von Fra1 und Fra2 auf Invasivität und Motilität der MDA-MB231-Zellen

Da das Invasions- und das Migrationsverhalten von Zellen ein wichtiges Kriterium im Bezug auf ihre Malignität darstellt, wurden diese beiden Parameter auf ihren Zusammenhang mit den AP1-Mitgliedern Fra1 und Fra2 hin in der hochinvasiven, Östrogen- und Progesteronrezeptor-negativen Zelllinie MDA-MB231 untersucht. Dazu wurden mehrere Invasionsassays durchgeführt, mit deren Hilfe man einerseits das invasive Potential der Zellen anhand ihres Durchwanderungsvermögens der Basalmembran-ähnlichen Matrigel-Membran bestimmen kann, sich andererseits aber auch Aussagen über ihre Motilität machen lassen.

Als Ergebnis war eine signifikante Reduktion der Invasivität sowohl nach Down-Regulation von Fra1 als auch nach Down-Regulation von Fra2, jeweils auf 58 % gegenüber der Negativkontrolle, zu beobachten. Die Motilität wurde ebenfalls, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß als die Invasivität, durch Verminderung beider Faktoren signifikant gehemmt. Die Transfektion mit Fra1-siRNA bewirkte hier eine Reduktion der motilen Zellen auf 82 % im Vergleich zur Negativkontrolle, während die verminderte Fra2-Expression einen etwas stärkeren Einfluss auf die Zellen auszuüben wusste und deren Motilität auf 79 % senkte. Es lässt sich daraus also ein positiver Effekt von Fra1 und auch Fra2 auf Invasivität und Motilität erleben.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der murinen Adenokarzinom-Zelllinie CSML0 beobachtet. Nach Induktion der Fra1-Expression mittels stabiler Transfektion ließ sich hier eine Steigerung der Anzahl der Zellen, welche die Matrigel-Membran passiert hatten, auf das Vierfache beobachten. Gleichzeitig war auch die Motilität der Zellen gesteigert [Kustikova et al. 1998]. Tkach et al. konnten 2003 diese durch Fra1 hervorgerufene gesteigerte Motilität in der gleichen Zelllinie bestätigen und daneben demonstrieren, dass c-Fos, wenn auch weniger stark ausgeprägt, den gleichen Effekt wie Fra1 bezüglich der Motilität ausübte, während Fra2 hierzu nicht in der Lage war [Tkach et al. 2003]. Um die für das veränderte Motilitätsverhalten verantwortliche Region des Fra1-Proteins zu identifizieren, wurden jeweils ein Fra1-Konstrukt mit fehlender N-terminaler und eines mit fehlender C-terminaler Domäne generiert. Dabei stellte sich heraus, dass die N-terminale Region die funktionell für die motilitätssteigernde Wirkung Entscheidende war. In der gleichen Studie konnte jedoch auch gezeigt werden, dass nicht nur Fra1, sondern auch Fra2 unter bestimmten Umständen am Migrationsver-

halten von Zellen beteiligt sein kann. So wurden in der Fra1- und Fra2-positiven Mäusefibroblasten-Zelllinie L929 die beiden Fos-Faktoren mittels transienter Transfektion mit Antisense-Fra1- bzw. Antisense-Fra2-Plasmiden inhibiert, was jeweils zu verminderter Zellmotilität führte [Tkach et al. 2003].

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von Fra1 an Motilität und Invasion findet sich in Kolonkarzinom-Zellen, welche nach Fra1-silencing einen Verlust an motilem und invasivem Verhalten aufwiesen [Vial et al. 2003]. Die Autoren schlugen hierbei vor, der positive Effekt von Fra1 auf die Zellmotilität liege in der Inaktivierung von β 1-Integrin und einer damit einhergehenden niedrigen RhoA-Aktivität begründet. Auch in Ovarialkarzinom-Zellen wurde eine veränderte Fra1-Expression mit einem abweichenden Mobilitäts- und Adhäsionsverhalten in Verbindung gebracht [Hapke et al. 2003].

In Untersuchungen, die sich speziell auf humane Brustkrebs-Zelllinien beziehen, konnten weitere Belege für den positiven Einfluss von Fra1 auf invasions- und migrationsbezogene Malignitätskriterien gefunden werden. So wurden in einer Studie die genetischen Expressionsprofile hochinvasiver und wenig invasiver Brustkrebs-Zelllinien mit Hilfe von cDNA Arrays verglichen. Dabei stellte sich Fra1 als eines von mehreren Genen heraus, deren Expression in den hochinvasiven Zellen signifikant erhöht war [Zajchowski et al. 2001]. Der Zusammenhang zwischen Motilität und Invasivität von MCF7- bzw. MDA-MB231-Zellen und der Expression von Fos-Faktoren wurde in einer Studie unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahre 2004 beschrieben. In den MCF7-Zellen zeigte sich nach transienter Transfektion mit Fra1, nicht jedoch nach Transfektion mit Fra2, eine signifikant erhöhte Invasivität. Die Motilität ließ sich hier weder durch Fra1 noch durch Fra2 beeinflussen. In MDA-MB231-Zellen waren sowohl Fra1 als auch Fra2, Letzteres allerdings etwas weniger stark, in der Lage, die Invasivität positiv zu beeinflussen, während sich eine Überexpression der Fos-Proteine negativ auf die Motilität auswirkte [Milde-Langosch et al. 2004]. Dieser Sachverhalt weist darauf hin, dass hier der Effekt von Fra1 und Fra2 auf die Invasivität der MDA-MB231-Zellen unabhängig von ihrem migrativen Potential ist.

Verglichen mit den Ergebnissen der hier vorgestellten Arbeit, in der sich die Motilität der MDA-MB231-Zellen nach Down-Regulation von Fra1 oder Fra2 reduzierte, zeigt sich also in der Arbeit von Milde-Langosch et al. ein anderes Bild bezüglich des Einflusses dieser beiden Transkriptionsfaktoren auf das Migrationsverhalten der Zellen.

Im Falle der nach Fra1- bzw. Fra2-Silencing gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte in der Gegenüberstellung von Motilität und Invasivität die verminderte Anzahl der

invasiven MDA-MB231-Zellen nach Down-Regulation von Fra1 oder Fra2 zumindest teilweise als Konsequenz ihrer reduzierten Motilität zu sehen sein.

Ähnliche Experimente zur Erforschung der Auswirkung von Fra1 auf Motilität und Invasivität wurden auch von Belguise et al. durchgeführt. Hierbei wurde mittels stabiler Transfektion Fra1 in MCF7-Zellen überexprimiert bzw. die Fra1-Expression in MDA-MB231-Zellen durch RNA-Interferenz reduziert. In den MCF7-Fra1-Zellen stellte sich die Invasionsfähigkeit als signifikant gesteigert heraus, und auch die Motilität war mehr als um das Doppelte im Vergleich zu den untransfizierten Zellen erhöht. Die MDA-MB231-Zellen wiesen nach Fra1-Silencing eine etwa dreifach erniedrigte Invasivität und eine um etwa das Zweifache verminderte Motilität auf [Belguise et al. 2005]. Die Ergebnisse zeigten also hier, ebenso wie in den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, dass Fra1 positiv mit der Invasivität und ebenso mit der Motilität korreliert.

Fra1 scheint nicht nur in vitro mit einem aggressiveren Verhalten in Brustkrebs-Zellen vergesellschaftet zu sein [Zajchowski et al. 2001, Belguise et al. 2005], sondern korreliert in Brustkrebsgewebe auch negativ mit dem Östrogenrezeptorstatus und einem differenzierten Phänotyp [Bamberger et al. 1999] sowie, in seiner phosphorylierten Form, positiv mit dem Nodalsstatus [Milde-Langosch et al. 2004]. Diese wichtige Rolle, die Fra1 demnach bei der Progression von Brustkrebs spielt, könnte auch teilweise eine Erklärung für den protektiven Effekt der gegen Fra1 gerichteten DNA-Vakzine im Mäusemodell liefern [Luo et al. 2003].

Gleichzeitig erscheint in diesem Zusammenhang wichtig zu erwähnen, dass die Expression von Fra1 in vitro und in vivo teilweise erheblich voneinander differieren kann. So zeigte sich beispielsweise eine starke Expression von Fra1 in der hochinvasiven Zelllinie MDA-MB231, während sie in klinischem Tumorgewebe nur schwach ausgeprägt oder sogar negativ war [Bamberger et al. 1999].

Daneben gibt es auch Studien, in denen die positiven Auswirkungen von Fra1 auf Tumorinvasion und -progression nicht zu beobachten waren. Einerseits handelt es sich hierbei um Analysen in Zervixkarzinom-Zellen, in denen die Up-Regulation von Fra1 einen Tumorsupprimierenden Effekt zur Folge hatte [Rösl et al. 1997] bzw. die Konversion zu Tumorigenität mit einer erniedrigten Fra1-Expression einherging [Soto et al. 1999]. Auf der anderen Seite konnten Langer et al. in ihrer immunhistochemischen Studie zu den Korrelationen der AP1-Protein-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern in Brustkrebsgewebe darlegen, dass eine erhöhte Fra1-Expression in vivo signifikant mit erhöhtem Gesamtüberleben korrelierte [Langer et al. 2006].

Die Rolle, die Fra2 bei der Tumorprogression spielt, ist weniger gut bekannt. In Experimenten an stabil transfizierten MCF7-Zellen konnte mit Hilfe des Invasionsassays eine positive Korrelation mit Invasivität, nicht aber reproduzierbar mit der Motilität beobachtet werden [Milde-Langosch et al. 2008]. In Brustkrebstumoren wurde seine Assoziation mit einer erhöhten Rezidivrate beschrieben [Milde-Langosch et al. 2004], während Langer et al. keine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern wie Tumorgröße, histologischem Grading, Staging, Entwicklung von Fernmetastasen, dem Alter und dem Gesamtüberleben finden konnten [Langer et al. 2006]. Allerdings weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die vorangehenden Arbeiten darauf hin, dass Fra2, ähnlich wie auch Fra1, an der Regulation von Invasion und Metastasierung und damit an der Ausbildung eines aggressiveren Phänotyps in Brustkrebs beteiligt sein könnte.

Obwohl Fra1 und auch Fra2 im Gegensatz zu FosB und c-Fos keine Transaktivierungs-Domänen besitzen und auch nicht in der Lage sind, artefizielle Promotoren mit AP1-Bindungsstellen zu transaktivieren [Tulchinsky 2000], werden sie doch oft im Zusammenhang mit Tumorprogression beschrieben. Die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen für diesen Sachverhalt. Um die Beteiligung dieser beiden Fos-Proteine am Malignitätsprozess und die darin involvierten Regulationsmechanismen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weiterführend zu erhellen werden zusätzliche Studien unumgänglich sein.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Fos-Faktoren Fra1 und Fra2 auf die Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231 untersucht, wofür die Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren mittels Transfektion mit sequenzspezifischer siRNA herunterreguliert wurde. Alle untersuchten Parameter wurden dabei jeweils im Vergleich mit den Werten der mit ungezielter siRNA transfizierten Zellen (Negativkontrolle) bewertet, was eine Verzerrung der Ergebnisse durch unspezifische Effekte der Transfektion minimieren sollte.

Bezüglich der Morphologie zeigte sich, dass die Zellen mit vermindertem Fra1 durch eine fast vollständig fehlende Ausbildung der sie normalerweise charakterisierenden Zellausläufer gekennzeichnet waren, während die reduzierte Expression von Fra2 keinerlei Auswirkungen auf die Gestalt der Zellen hatte.

Der regulatorische Einfluss von Fra1 und Fra2 auf die mittels Western-Blot analysierte Expression aller Jun- und Fos-Proteine (JunB, c-Jun, JunD, FosB, c-Fos, Fra1, Fra2) sowie auf die Expression von AP1-Zielgenen des Zellzyklus (Rb, Rb2, Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4) und der Invasivität (PAI1, MMP1) konnte nicht anhand signifikanter Veränderungen in der Quantität der einzelnen Ziel-Proteine bestätigt werden. Allerdings ließ sich eine Tendenz zu einer inversen Korrelation zwischen Fra1 und Fra2, sowie reproduzierbar eine negative Korrelation von Fra2 mit der phosphorylierten Form des c-Jun (p-c-Jun) und eine positive Assoziation von Fra2 mit c-Fos beobachten.

Der Gesamtproteingehalt der Zellen nach Down-Regulation von Fra1 bzw. Fra2 wurde durch photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung ermittelt und zeigte jeweils eine geringfügige, aber nicht signifikante Reduktion gegenüber dem der Zellen der Negativkontrolle. Als geringfügig, aber dennoch signifikant vermindert stellte sich die im MTT-Test ermittelte Anzahl der lebenden Zellen als Maß für die Zellproliferation heraus. Die Transfektion mit Fra2-siRNA bewirkte hierbei eine etwas stärkere Hemmung der Proliferation als die Down-Regulation von Fra1.

Um die Auswirkungen der verminderten Expression von Fra1 und Fra2 auf das Invasivitäts- und Motilitätsverhalten der Zellen zu untersuchen wurden diese beiden Parameter im Invasionsassay untersucht. Es zeigte sich, dass beide Transkriptionsfaktoren etwa gleich stark und statistisch signifikant positiv mit Invasivität und, in etwas geringerem Ausmaß, auch mit der

Motilität der MDA-MB231-Zellen korrelierten. Da sich aber für beide Fos-Faktoren abweichende Auswirkungen auf die Zellmorphologie und teilweise auch auf die Expression von AP1-Zielgenen zeigten, regulieren Fra1 und Fra2 die invasiven und migrativen Eigenschaften der Zellen dabei möglicherweise über unterschiedliche Mechanismen.

6 Literaturverzeichnis

Agrawal A, Gutteridge E, Gee JM, Nicholson RI, Robertson JF (2005)

Overview of tyrosine kinase inhibitors in clinical breast cancer.

Endocr Relat Cancer 12 Suppl 1:S135-44

Agarwal SK, Novotny EA, Crabtree JS, Weitzman JB, Yaniv M, Burns AL, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ (2003)

Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter.

Proc Natl Acad Sci USA 100(19):10770-5

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(31):4843-8

Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN (1990)

Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins.

Mol Cell Endocrinol 68(1):1-19

Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ (1997)

The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review.

Int J Cancer 72(1):1-22

Angel P, Karin M (1991)

The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation.

Biochim Biophys Acta 1072(2-3):129-57

Antoine C, Liebens F, Carly B, Pastijn A, Rozenberg S (2004)

Influence of HRT on prognostic factors for breast cancer: a systematic review after the Women's Health Initiative trial.

Hum Reprod 19(3):741-56

Bässler R (1997)

Mamma. In: Remmele, W (Hrsg) Pathologie Band 4, 2. Auflage

Springer

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(9):2056-68

Bamberger AM, Methner C, Lisboa BW, Städtler C, Schulte HM, Löning T, Milde-Langosch K (1999)

Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype.

Int J Cancer 84(5):533-8

Bamberger AM, Milde-Langosch K, Schulte HM, Löning T (2000)

Progesterone receptor isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors.

Horm Res 54(1):32-7

Bamberger AM, Milde-Langosch K, Rössing E, Goemann C, Löning T (2001)

Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators.

J Cancer Res Clin Oncol 127(9):545-50

Battista S, de Nigris F, Fedele M, Chiappetta G, Scala S, Vallone D, Pierantoni GM, Mega T, Santoro M, Viglietto G, Verde P, Fusco A (1998)

Increase in AP-1 activity is a general event in thyroid cell transformation in vitro and in vivo.

Oncogene 17(3):377-85

Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG, Gusterson BA, Bender HG (1997)

Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity.

J Mol Med 75(6):429-39

Belguise K, Kersual N, Galtier F, Chalbos D (2005)

FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells.

Oncogene 24(8): 1434-44

Bergers G, Graninger P, Braselmann S, Wrighton C, Busslinger M (1995)

Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron.

Mol Cell Biol 15(7):3748-58

Bergh J, Norberg T, Sjögren S, Lindgren A, Holmberg L (1995)

Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy.

Nat Med 1(10):1029-34

Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F (1995)

E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers.

EMBO J 14(24):6107-15

Blasi F, Carmeliet P (2002)

uPAR: a versatile signalling orchestrator.

Nat Rev Mol Cell Biol 3(12):932-43

Böcker W, Denk H, Heitz PhU (2001)

Pathologie. 2. Auflage

Urban & Fischer, München Jena

Borkakoti N (1998)

Matrix metalloproteinases: variations on a theme.

Prog Biophys Mol Biol 70(1):73-94

Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Dürr P (1996)

Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter.

Mol Cell Biol 16(7):3401-9

Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M (1989)

Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha.

Nature 337(6208):661-3

Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U (2000)

Intestinal collagenases as markers of tumor progression.

Clin Cancer Res 6(12):4823-30

Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Löning T, Herbst H (1999)

Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study.

Vichows Arch 435(6):566-73

Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA (2006)

Cell cycle control in breast cancer cells.

J Cell Biochem 97(2):261-74

Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D (1997)

Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation.
Nat Genet 17(4):439-44

Castiglioni T, Merino MJ, Elsner B, Lah TT, Sloane BF, Emmert-Buck MR (1994)

Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B and L in human breast cancer.
Hum Pathol 25(9):857-62

Chirivi RG, Garofalo A, Crimmin MJ, Bowden LJ, Stoppacciaro A, Brown PD, Giavazzi R (1994)

Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor.
Int J Cancer 58(3):460-4

Conneely OM, Lydon JP (2000)

Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms.
Steroids 65(10-11):571-7

Coradini D, Daidone MG (2004)

Biomolecular prognostic factors in breast cancer.
Curr Opin Obstet Gynecol 16(1):49-55

Crowley CW, Cohen RL, Lucas BK, Liu G, Shuman MA, Levinson AD (1993)

Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor.
Proc Natl Acad Sci USA 90(11):5021-5

Curran T, MacConnell WP, van Straaten F, Verma IM (1983)

Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells.
Mol Cell Biol 3(5):914-21

Dang J, Boyd D, Wang H, Allgayer H, Doe WF, Wang Y (1999)

A region between -141 and -61 bp containing a proximal AP-1 is essential for constitutive expression of urokinase-type plasminogen activator receptor.

Eur J Biochem 264(1):92-9

Danø K, Andreasen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985)

Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer.

Adv Cancer Res 44:139-266

Darne C, Martinez A, Lallemand D, Morel L, Jean C, Saru JP, Schmid HP, Manin M (2000)

Down-regulation of AP1 activities after polarization of vas deferens epithelial cells correlates with androgen-induced gene expression.

J Steroid Biochem Mol Biol 72(3-4):103-13

Davidson B, Goldberg I, Liokumovich P, Kopolovic J, Gotlieb WH, Lerner-Geva L, Reder I, Ben-Baruch G, Reich R (1998)

Expression of metalloproteinases and their inhibitors in adenocarcinoma of the uterine cervix.

Int J Gynecol Pathol 17(4):295-301

Diedrich K (2000)

Gynäkologie und Geburtshilfe.

Springer, Berlin Heidelberg

Duffy MJ (2005)

Predictive markers in breast and other cancers: a review.

Clin Chem 51(3):494-503

Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ (1988)

Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report.

Cancer 62(3):531-3

Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N (1999)

Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer.

J Surg Oncol 71(2):130-5

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998)

Tamoxifen for early breast cancer: an overview of randomised trials.

Lancet 351(9114):1451-67

Eferl R, Sibilica M, Hilberg F, Fuchsbichler A, Kufferath I, Guertl B, Zenz R, Wagner EF, Zatloukal K (1999)

Functions of c-Jun in liver and heart development.

J Cell Biol 145(5):1049-61

el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculesco VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al (1994)

WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis.

Cancer Res 54(5):1169-74

Finzer P, Soto U, Delius H, Patzelt A, Coy JF, Poustka A, zur Hausen H, Rösl F (2000)

Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV 18 positive cells: the role of the chromatin structure and AP-1 composition.

Oncogene 19(29):3235-44

Flötotto T, Djahansouzi S, Gläser M, Hanstein B, Niederacher D, Brumm C, Beckmann MW (2001)

Hormones and hormone antagonists: mechanisms of action in carcinogenesis of endometrial and breast cancer.

Horm Metab Res 33(8):451-7

Foletta VC, Sonobe MH, Suzuki T, Endo T, Iba H, Cohen DR (1994)

Cloning and characterisation of the mouse fra-2 gene.

Oncogene 9(11):3305-11

Friedl P, Wolf K (2003)

Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.

Nat Rev Cancer 3(5):362-74

Garbett EA, Reed MW, Brown NJ (1999)

Proteolysis in human breast and colorectal cancer.

Br J Cancer 81(2):287-93

GEKID (2006)

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und das RKI
Krebs in Deutschland. 5. Ausgabe

Saarbrücken

Geng Y, Eaton EN, Picón M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA
(1996)

Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein.

Oncogene 12(6):1173-80

Gerber B, Mylonas I (2003)

Reduction of the risk of breast cancer.

Zentralbl Gynäkol 125(1):6-16

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S,
Brandt E, Flad HD (1991)

Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-
associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67.

Am J Pathol 138(4):867-873

Gilliland FD (1997)

Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility?

Environ Health Perspect 105 Suppl 4:897-900

Göttlicher M, Heck S, Herrlich P (1998)

Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action.

J Mol Med 76(7):480-9

Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF (1993)

Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice.

J Cell Biol 122(3):685-701

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF (1994)

c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling.

Science 266(5184):443-8

Gruda MC, Kovary K, Metz R, Bravo R (1994)

Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity.

Oncogene 9(9):2537-47

Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P (1988)

c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities.

Cell 55(5):917-24

Hapke S, Kessler H, Lubber B, Bengel A, Hutzler P, Höfler 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(7):1073-83

Hayashi SI, Eguchi H, Tanimoto K, Yoshida T, Omoto Y, Inoue A, Yoshida N, Yamaguchi Y (2003)

The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application.

Endocr Relat Cancer 10(2):193-202

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004)

AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings.

J Cell Sci 117(Pt 25):5965-73

Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF (1993)

C-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis.

Nature 365(6442):179-81

Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G (2001)

Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC.

Clin Cancer Res 7(11):3519-25

Hurd TW, Culbert AA, Webster KJ, Tavaré JM (2002)

Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation.

Biochem J 368(Pt2):573-80

Jänicke F, Schmitt M, Graeff H (1991)

Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer.

Semin Thromb Hemost 17(3):303-12

Jochum W, Passequé E, Wagner EF (2001)

AP-1 in mouse development and tumorigenesis.

Oncogene 20(19):2401-12

Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V (1992)

Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene.

Cell 71(4):577-86

Karin M (1995)

The regulation of the AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.

J Biol Chem 270(28):16483-6

Karin M, Liu Z, Zandi E (1997)

AP-1 function and regulation.

Curr Opin Cell Biol 9(2):240-6

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P (1990)

Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B.

EMBO J 9(5):1603-14

Katzenellenbogen BS (1996)

Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways.

Biol Reprod 54(2):287-93

Kessler R, Zacharova-Albinger A, Laursen NB, Kalousek M, Klemenz R (1999)

Attenuated expression of the serum responsive T1 gene in ras transformed fibroblasts due to the inhibition of c-fos gene activity.

Oncogene 18(9):1733-44

Khokha R, Denhardt DT (1989)

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion.

Invasion Metastasis 9(6):391-405

Knox JD, Wolf C, McDaniel K, Clark V, Lorient M, Bowden GT, Nagle RB (1996)

Matrilysin expression in human prostate carcinoma.

Mol Carcinog 15(1):57-63

Kovary K, Bravo R (1992)

Existence of different Fos/Jun complexes during the G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins.

Mol Cell Biol 12(11):5015-23

Kovary K, Rizzo CA, Ryseck RP, Noguchi T, Raynoschek C, Pelosin JM, Bravo R (1991)

Constitutive expression of FosB and its short form, FosB/SF induces malignant cell transformation in rat-1A cells.

New Biol 3(9):870-9

Krosi J, Sauvageau G (2000)

AP-1 complex is effector of Hox-induced cellular proliferation and transformation.

Oncogene 19(45):5134-41

Kupferman ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ (2000)

Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression.

Am J Pathol 157(6):1777-83

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 epitheloid adenocarcinoma cells.

Mol Cell Biol 18(12):7095-105

Langer S, Singer CF, Hudelist G, Dampier B, Kaserer K, Vinatzer U, Pehamberger H, Zielinski C, Kubista E, Schreiber M (2006)

Jun and Fos family protein expression in human breast cancer: correlation of protein expression and clinicopathological parameters.

Eur J Gynaecol Oncol 27(4):345-52

Lee HY, Chaudhary J, Walsh GL, Hong WK, Kurie JM (1998)

Suppression of c-Fos gene transcription with malignant transformation of human bronchial epithelial cells.

Oncogene 16(23):3039-46

Lee W, Mitchell P, Tijan R (1987)

Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements.

Cell 49(6):741-52

Linardopoulos S, Papadakis E, Delakas D, Theodosiou V, Cranidis A, Spandidos DA (1993)

Human lung and bladder carcinoma tumors as compared to their adjacent normal tissue have elevated AP-1 activity associated with the retinoblastoma gene promoter.

Anticancer Res 13(1):257-62

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG (1991)

Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.

Cell 64(2):327-36

Lisboa BW, Vogtländer S, Gilster T, Riethdorf L, Milde-Langosch K, Löning T (1997)

Molecular and immunohistochemical analysis of p53 mutations in scrapings and tissue from preinvasive and invasive breast cancer.

Vichows Arch 431(6):375-81

Liu L, Lassam NJ, Slingerland JM, Bailey D, Cole D, Jenkins R, Hogg D (1995)

Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma.

Oncogene 11(2):405-12

Lochter A, Bissell MJ (1999)

An odyssey from breast to bone: multi-step control of mammary metastases and osteolysis by matrix metalloproteinases.

APMIS 107(1):128-36

Loskutoff DJ, Curriden SA, Hu G, Deng G (1999)

Regulation of cell adhesion by PAI-1.

APMIS 107(1):54-61

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993)

p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents.

Cell 74(6):957-67

Lucibello FC, Lowag C, Neuberg M, Müller R (1989)

Trans-repression of the mouse c-fos promoter: a novel mechanism of Fos-mediated trans-regulation.

Cell 59(6):999-1007

Luo Y, Zhou H, Mizutani M, Mizutani N, Reisfeld RA, Xiang R (2003)

Transcription factor Fos-related antigen 1 is an effective target for a breast cancer vaccine.

Proc Natl Acad Sci USA 100(15):8850-5

Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK (1987)

Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene.

Proc Natl Acad Sci USA 84(9):2848-52

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995)

The nuclear receptor superfamily: the second decade.

Cell 83(6):835-9

Maruya S, Kim HW, Weber RS, Lee JJ, Kies M, Luma MA, Batsakis JG, El-Naggar AK (2004)

Gene expression screening of salivary gland neoplasms: molecular markers of potential histogenetic and clinical significance.

J Mol Diagn 6(3):180-90

Mechta F, Lallemand D, Pfarr CM, Yaniv M (1997)

Transformation by ras modifies AP1 composition and activity.

Oncogene 14(7):837-47

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Methner C, Rieck G, Löning T (2000)

Expression of cell cycle-regulatory proteins rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members.

Int J Cancer 87(4):468-72

Milde-Langosch K, Kappes H, Riethdorf S, Löning T, Bamberger AM (2003)

FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas.

Breast Cancer Res Treat 77(3):265-75

Milde-Langosch K, Röder H, Andritzky H, Aslan B, Hemminger G, Brinkmann A, Bamberger CM, Löning T, Bamberger AM (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(4):139-52

Milde-Langosch K, Janke S, Wagner I, Schröder C, Streichert T, Bamberger AM, Jänicke F, Löning T (2008)

Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility.

Breast Cancer Res Treat 107(3):337-47

Muegge K, Williams TM, Kant J, Karin M, Chiu R, Schmidt A, Siebenlist U, Young HA, Durum SK (1989)

Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1.

Science 246(4927):249-51

Murakami M, Sonobe MH, 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(20):2435-44

Nagase H, Woessner JF Jr. (1999)

Matrix metalloproteinases.

J Biol Chem 274(31):21491-4

Nelson MH, Dolder CR (2006)

Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors.

Ann Pharmacother 40(2):261-9

Ng DC, Shafae S, Lee D, Bikle DD (2000)

Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter.

J Biol Chem 275(31):24080-8

Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato M, Iba H (1990)

Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family.

Proc Natl Acad Sci USA 87(9):3619-23

Ocaña A, Rodriguez CA, Cruz JJ (2005)

Integrating trastuzumab in the treatment of breast cancer. Current status and future trends.

Clin Transl Oncol 7(3):99-100

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000)

The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.

EMBO J 19(13):3159-67

Olefsky JM (2001)

Nuclear receptor minireview series.

J Biol Chem 276(40):36863-4

Passegué E, Wagner EF (2000)

JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression.

EMBO J 19(12):2969-79

Passegué E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Möhle-Steinlein U, Wagner EF (2001)

Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage.

Cell 104(1):21-32

Passegué E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner EF (2002)

JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation.

Nat Genet 30(2):158-66

Pei XH, Xiong Y (2005)

Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues.

Oncogene 24(17):2787-95

Pfahl M (1993)

Nuclear receptor/AP-1 interaction.

Endocr Rev 14(5):651-8

Pospelova TV, Medvedev AV, Kukushkin AN, Svetlikova SB, van der Eb AJ, Dorsman JC,

Pospelov VA (1999)

E1A + cHa-ras transformed rat embryo fibroblast cells are characterized by high and constitutive DNA binding activities of AP-1 dimers with significantly altered composition.

Gene Expr 8(1):19-32

Ransone LJ, Verma IM (1990)

Nuclear proto-oncogenes fos and jun.

Annu Rev Cell Biol 6:539-57

Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA (2007)

The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States.

N Engl J Med 356(16):1670-4

Reid A, Vidal L, Shaw H, de Bono J (2007)

Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu).

Eur J Cancer 43(3):481-9

Risse-Hackl G, Adamkiewicz J, Wimmel A, Schuermann 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(23):3057-68

Rocheffort H (1995)

Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer.

Ciba Found Symp 191:254-65; discussion 265-8

Rösl F, Das BC, Lengert M, Geletneky K, zur Hausen H (1997)

Antioxidant-induced changes of the AP-1 transcription complex are paralleled by a selective suppression of human papillomavirus transcription.

J Virol 71(1):362-70

Rosenberg S (2001)

New developments in the urokinase-type plasminogen activator system.

Expert Opin Ther Targets 5(6):711-22

Rosenberger SF, Finch JS, Gupta A, Bowden GT (1999)

Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of JunD and FosB is required for okadaic acid-induced activator protein 1 activation.

J Biol Chem 274(2):1124-30

Ryseck RP, Bravo R (1991)

c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins.

Oncogene 6(4):533-42

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994)

A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells.

Nature 370(6484):61-5

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G, Wallwiener D (2002)

Gynäkologische Onkologie. 7. Auflage

Schattauer

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Hofler H, Jänicke F, Graeff H (1997)

Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy.

Thromb Haemost 78(1):285-96

Schreiber M, Poirier C, Franchi A, Kurzbauer R, Guenet JL, Carle GF, Wagner EF (1997)

Structure and chromosomal assignment of the mouse fra-1 gene, and its exclusion as a candidate gene of oc (osteosclerosis).

Oncogene 15(10):1171-8

Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Möhle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P, Wagner EF (1999)

Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent.

Genes Dev 13(5):607-19

Schuermann M, Jooss K, Müller R (1991)

FosB is a transforming gene encoding a transcriptional activator.

Oncogene 6(4):567-76

Serewko MM, Popa C, Dahler AL, Smith L, Strutton GM, Coman W, Dicker AJ, Saunders NA (2002)

Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development.
Cancer Res 62(13):3759-65

Shaulian E, Karin M (2001)

AP-1 in cell proliferation and survival.
Oncogene 20(19):2390-400

Sherman MR, Corvol PL, O'Malley BW (1970)

Progesterone-binding components of chick oviduct. I. Preliminary characterization of cytoplasmic components.
J Biol Chem 245(22):6085-96

Sherr CJ, Roberts JM (1999)

CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.
Genes Dev 13(12):1501-12

Smith LM, Wise SC, Hendricks DT, Sabichi AL, Bos T, Reddy P, Brown PH, Birrer MJ (1999)

cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype.
Oncogene 18(44):6063-70

Soto U, Das BC, Lengert M, Finzer P, zur Hausen H, Rösl F (1999)

Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex.
Oncogene 18(21):3187-98

Soto U, Denk C, Finzer P, Hutter KJ, zur Hausen H, Rösl F (2000)

Genetic complementation to non-tumorigenicity in cervical-carcinoma cells correlates with alterations in AP-1 composition.

Int J Cancer 86(6):811-7

Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, Angel P (2000)

c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin.

Cell 103(5):745-55

Tavassoli FA, Devilee P (Eds) (2003)

World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.

IARC Press, Lyon

Tchernitsa OI, Sers C, Zuber J, Hinzmann B; Grips M, Schramme A, Lund P, Schwendel A, Rosenthal A, Schäfer R (2004)

Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells.

Oncogene 23(26):4536-55

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(32):5045-54

Torregrosa D, Bolufer P, Lluch A, López JA, Barragán E, Ruiz A, Guillem V, Munárriz B, García Conde J (1997)

Prognostic significance of c-erbB-2/neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status.

Clin Chim Acta 262(1-2):99-119

Tsutsui S, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Kinoshita J, Hachitanda Y (2002)
Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor in recurrent breast cancer.
Clin Cancer Res 8(11):3454-60

Tulchinsky E (2000)
Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation.
Histol Histopathol 15(3):921-8

Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M (2005)
Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer.
J Clin Oncol 23(28):7212-20

Vallone D, Battista S, Pierantoni GM, Fedele M, Casalino L, Santoro M, Viglietto G, Fusco A, Verde P (1997)
Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product.
EMBO J 16(17):5310-21

van Dam H, Castellazzi M (2001)
Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis.
Oncogene 20(19):2453-64

Vial E, Sahai E, Marshall CJ (2003)
ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility.
Cancer Cell 4(1):67-79

Vihinen P, Kähäri VM (2002)
Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets.
Int J Cancer 99(2):157-66

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000)

Surfing the p53 network.

Nature 408(6810):307-10

Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV (1994)

Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice.

Nature 369(6482):669-71

Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Rüther U, Wagner EF (1992)

Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos.

Nature 360(6406):741-5

Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K, Yaniv M (2000)

JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis.

Mol Cell 6(5):1109-19

Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldmann ME, McDonnell DP (1994)

The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells.

Mol Cell Biol 14(12):8356-64

Westermarck J, Kähäri VM (1999)

Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion.

FASEB J 13(8):781-92

Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM (1997)

Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin.

Proc Natl Acad Sci USA 94(4):1402-7

Wisdom R, Verma IM (1993)

Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation.

Mol Cell Biol 13(5):2635-43

Yang MY, Liu TC, Chang JG, Lin PM, Lin SF (2003)

JunB gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia.

Blood 101(8):3205-11

Yoshioka K, Deng T, Cavigelli M, Karin M (1995)

Antitumor promotion by phenolic antioxidants: inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression.

Proc Natl Acad Sci USA 92(11):4972-6

Zafonte BT, Hult J, Amanatullah DF, Albanese C, Wang C, Rosen E, Reutens A, Sparano JA, Lisanti MP, Pestell RG (2000)

Cell-cycle dysregulation in breast cancer: breast cancer therapies targeting the cell cycle.

Front Biosci 5:D938-61

Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, Beauheim C, Harvey S, Ethier SP, Johnson PH (2001)

Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells.

Cancer Res 61(13):5168-78

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1997)

Gene expression profiles in normal and cancer cells.

Science 276(5316):1268-72

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(35):4011-21

7 Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

| | |
|-----------------|--------------------------------------|
| AP | activating protein |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aqua dest. | aqua destillata |
| AS | Aminosäure |
| ATF | activating transcription factor |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | bicinchoninic acid |
| BRCA | breast cancer antigen |
| bZip | basic leucine zipper |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| cdc | cell division cycle |
| CDK | cyclin dependent kinase |
| cDNA | complementary DNA |
| CKI | cyclin dependent kinase inhibitor |
| CLIS | Carcinoma lobulare in situ |
| cm ² | Quadratzenimeter |
| CML | chronisch myeloische Leukämie |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| DCIS | duktales Carcinoma in situ |
| D-MEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| D-PBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |

| | |
|---------|---|
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | epidermal growth factor |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| ER | Östrogenrezeptor |
| et al. | et alter |
| EZM | Extrazellulärmatrix |
| FBJ-MSV | Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma virus |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| Fra | Fos-related antigen |
| g | Gramm |
| GR | Glukokortikoidrezeptor |
| HCl | Chlorwasserstoffsäure |
| HRP | horseradish peroxidase |
| Ig | Immunglobulin |
| IGF | insulin-like growth factor |
| IGFBP | insulin-like growth factor binding protein |
| IL | Interleukin |
| JDP | Jun dimerization partner |
| JNK | Jun N-terminale Kinase |
| kDa | Kilodalton |
| LHRH | lutinizing hormone-releasing hormone |
| M | molar |
| mA | Milliampère |
| Maf | musculoaponeurotic fibrosarcoma |
| MAPK | mitogen-activated protein-kinase |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| mRNA | messenger-ribonucleic acid |

| | |
|-------|---|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NK | Negativkontrolle |
| nm | Nanometer |
| NOS | not otherwise specified |
| PAI | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor |
| PET | Polyethylenperephthalat |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PR | Progesteronrezeptor |
| Rb | Retinoblastom |
| RISC | RNA-induced silencing complex |
| RNA | ribonucleic acid |
| RNAse | Ribonuklease |
| rpm | rounds per minute |
| s. | siehe |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| sec | Sekunde |
| siRNA | small interfering ribonucleic acid |
| s.o. | siehe oben |
| TBST | Tris-buffered saline with Tween |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF | transforming growth factor |
| TIMP | tissue inhibitor of matrix metalloproteinases |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| tPA | tissue-type plasminogen activator |
| TPA | 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat |
| TRE | TPA-responsive element |
| Tris | Tris-Hydroxymethylaminomethan |

| | |
|------|---|
| uPA | urokinase-type plasminogen activator |
| uPAR | urokinase-type plasminogen activator receptor |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| z.B. | zum Beispiel |

7.2 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Th. Löning für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch. Auf sehr freundliche Art und Weise stand sie mir jederzeit mit offenem Ohr und gutem Rat zur Seite. Ihrer unermüdlichen Hilfe und Ermutigung ist es mit zu verdanken, dass ich diese Arbeit erfolgreich durchführen konnte.

Weiterhin bedanken möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor und die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeiten. Besonderer Dank gilt hierbei Bianca Kelp, Gabriele Rieck, Christine Schröder, Stanislava Janke, Christin Johnsen, Marine Oberndörfer, Christine Tirok und Xitama Álvarez Díaz.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Ines Wagner

Geboren am 11.07.1980 in Frankfurt am Main

Schulische Laufbahn:

1986-1990 Grundschule Dortelweil

1990-1999 Georg-Büchner-Gymnasium Bad Vilbel

6/1999 Abitur

Berufliche Tätigkeiten:

8/1999-8/2000 Freiwilliges Soziales Jahr in Austin, Texas, USA

Studium:

WS 2000 Immatrikulation für Medizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel

8/2002 Physikum

WS 2002 Immatrikulation für Medizin an der Universität Hamburg

8/2005-8/2006 Erasmus-Studienjahr an der Université Victor Segalen Bordeaux 2, Frankreich

8/2007 Beginn des Praktischen Jahres

7.4 Erklärung

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

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