

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Gynäkologie

Prof. Dr. med. Barbara Schmalfeldt

Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors Fra-2 in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7

Dissertation

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

vorgelegt von:

Stanislava Thiele
aus Sofia

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 07.11.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Dr. Karin Milde-Langosch

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Christine Stürken

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Das Mammakarzinom	3
1.1.1	Epidemiologische Daten über Brustkrebs	3
1.1.2	Pathologische Grundlagen	5
1.1.3	Risikofaktoren	8
1.1.4	Prognostische und prädiktive Faktoren	9
1.1.5	Therapie	12
1.2	Aspekte der Tumorprogression	15
1.2.1	Proliferation	16
1.2.2	Invasion	20
1.2.3	Migration	25
1.3	Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie	27
1.3.1	Fra-2	30
1.4	Ziel und Fragestellungen der Arbeit	32
2	Material und Methoden	34
2.1	Material	34
2.1.1	Zelllinie	34
2.1.2	Plasmide	34
2.1.3	Antikörper	35
2.1.4	Reagenzien	36
2.1.5	Fertigkits	37
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	37
2.1.7	Geräte und wiederverwendbare Artikel	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Zellbiologische Methoden	39
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	49
2.2.3	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Etablierung von stabil transfizierten Zellen mit Überexpression von Fra-2	59
3.2	Morphologische Veränderungen	61
3.3	Proliferation	62

3.4	Invasivität	64
3.5	Migration.....	65
3.6	Expression von Zielgenen von Fra-2	66
3.6.1	AP-1 Faktoren	67
3.6.2	Regulatoren des Zellzyklus	69
3.6.3	Regulatoren der Invasivität	70
4	Diskussion	72
4.1	Etablierung von stabil transfizierten Zellen mit Überexpression von Fra-2.....	73
4.2	Einfluss der Fra-2-Überexpression auf die Expression der anderen AP-1- Transkriptionsfaktoren (Fos- und Jun-Proteine).....	74
4.3	Einfluss der Fra-2-Überexpression auf die Morphologie von MCF-7-Zellen	76
4.4	Einfluss von Fra-2 auf die Proliferation und die Expression von Zellzyklus- Regulatoren	77
4.5	Einfluss von Fra-2 auf die Invasivität und die Mirgrationsfähigkeit der MCF-7- Zellen	80
4.6	Einfluss von Fra-2 auf die Expression an der Invasion beteiligter und anderer Zielgene	81
5	Zusammenfassung.....	85
6	Abkürzungsverzeichnis	88
7	Literaturverzeichnis	91
8	Danksagung.....	100
9	Lebenslauf	101
10	Eidesstattliche Erklärung	102

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologische Daten über Brustkrebs

Millionen von Menschen in der heutigen Welt erkranken während ihres Lebens an einer malignen Erkrankung. Die häufigsten Lokalisationen für Neoplasien sind die Lunge, die Brustdrüse und der Dickdarm.

Brustkrebs ist die zweithäufigste Tumorerkrankung mit geschätzt etwa 1,7 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr weltweit (Stewart u. Wild 2014). Die Inzidenz beim männlichen Geschlecht ist verschwindend gering, während für das weibliche Geschlecht Brustkrebs die häufigste Tumorerkrankung mit etwa 25% aller malignen Neoplasien ist. Die Inzidenz beträgt im Mittel 43,3 pro 100 000 Frauen pro Jahr weltweit, wobei diese Zahl in Industrieländern deutlich höher ist (etwa 70-90 pro 100 000 Frauen) als in Entwicklungsländern (Stewart und Wild 2014).

Schaut man die Zahlen für Deutschland an, zeigen Daten vom Robert Koch-Institut (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID), dass Brustkrebs mit 30,5% auch hierzulande die mit Abstand häufigste maligne Erkrankung der Frau ist (Abbildung 1) (RKI/GEKID 2017).

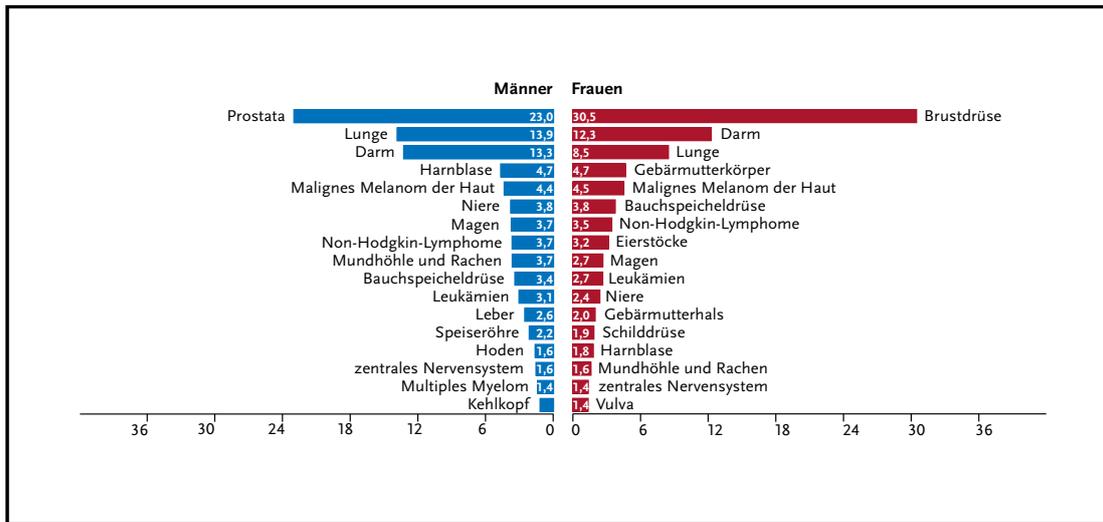


Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen bei Mann und Frau in Deutschland 2014 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Quelle: RKI 2017 Krebs in Deutschland)

Nach Zahlen über die Mortalität der WHO/IARC (World Health Organisation/ International Agency for Research on Cancer), verstarben im Jahre 2012 geschätzt etwa eine halbe Million Frauen an den Folgen der Erkrankung weltweit, dies waren etwa 15% aller an Krebs verstorbenen Frauen. In Abbildung 2 sind die genauen Zahlen für Brustkrebs mit den Zahlen für die häufigsten anderen Tumorlokalisationen verglichen.

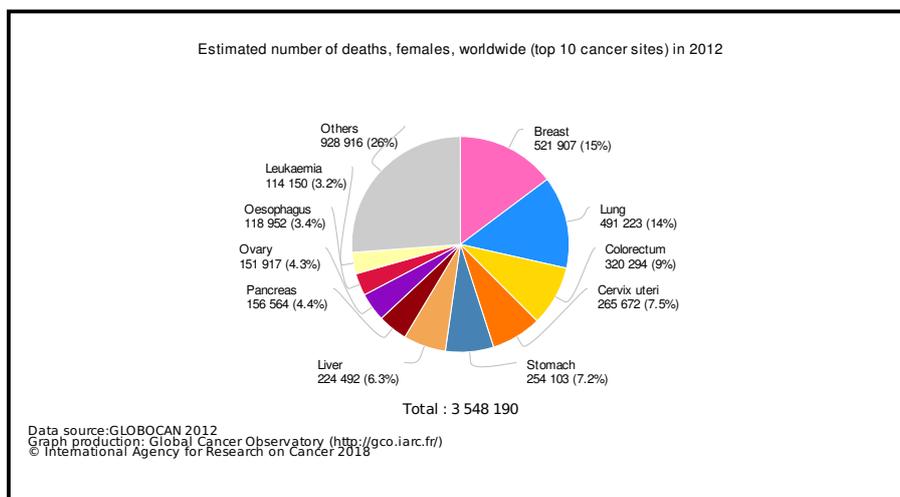


Abb. 2: Geschätzte weltweite Sterbefälle für die häufigsten zehn Tumor-Lokalisationen beim weiblichen Geschlecht für 2012 (Quelle: WHO/IARC Cancer today <http://gco.iarc.fr/today>)

Die weltweiten Mortalitätsraten sind seit den späten 1980er und frühen 1990er Jahren in den Industrieländern gesunken, was auf eine Kombination aus verbesserter Erkennung, früherer Diagnose (Screening für Risikogruppen) und wirksamere Behandlungsregimes zurückzuführen ist (Schnitt et al. 2014).

1.1.2 Pathologische Grundlagen

Hinter dem Begriff Brustkrebs verbirgt sich keine einzelne Erkrankung, sondern eine heterogene Gruppe von verschiedenen Tumoren mit Unterschieden in Histologie, Lokalisation, Ausbreitung und Prognose. Die WHO beschreibt in ihrer „Classification of Tumours of the Breast“ mehr als 20 verschiedene Subtypen (Lakhani et al. 2012). Die meisten malignen Tumoren der Brust entstehen aus Epithelzellen, es handelt sich also um Karzinome (Schnitt et al. 2014). Haben die malignen Zellen noch nicht die Basalmembran des Epithels durchbrochen, spricht man von einem in situ Karzinom. Ist diese Barriere bereits durch die Tumorzellen überwunden, handelt es sich um ein invasives Karzinom.

Die häufigste Lokalisation ist im äußeren oberen Quadranten der weiblichen Brust, die zweithäufigste im Mamillenbereich. Eine Multifokalität des Karzinoms kommt in 25% der Fälle vor und eine Bilateralität in 3% (Riede und Werner 2017).

Um die Ausgangsstrukturen für diese malignen Veränderungen zu verdeutlichen ist in Abbildung 3 und 4 der Aufbau der weiblichen Brust dargestellt. Die Abbildung 3 zeigt die makroskopische Anatomie der Mamma. Sie besteht aus ca. 15–25 Einzeldrüsen (Lobi glandulae mammariae), die jeweils über einen Ausführungsgang (Ductus lactiferi) in Sinus lactiferi an der Brustwarze (Papilla mammaria) münden. Jeder Lobus besitzt viele sekretorische Läppchen (Lobuli), aus denen baumartig verzweigte Gänge (Ductuli) hervorgehen. Diese vereinigen sich dann in den Ductus lactiferi.

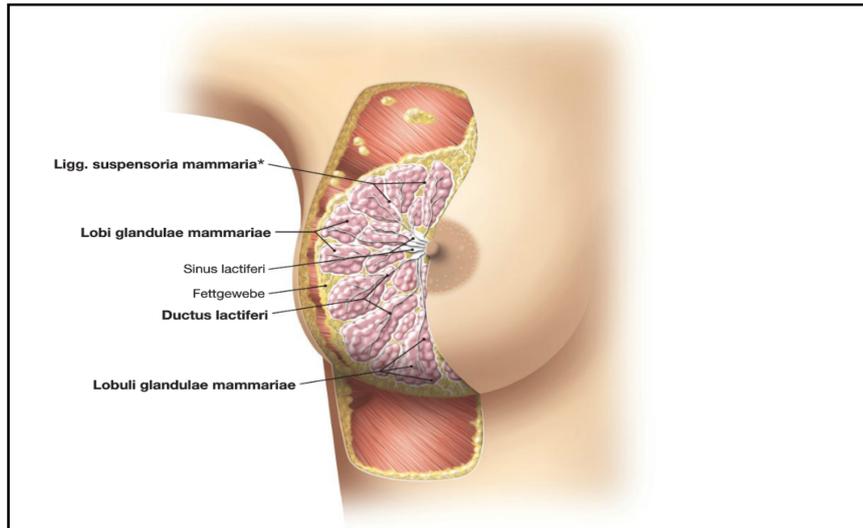


Abb.3: Anatomie der Mamma, Ansicht von ventral. Die Brust besteht aus der Brustdrüse (Glandula mammaria) und einem bindegewebigen Stroma, das Fettgewebe enthält. Sie umfasst bis zu 20 Einzeldrüsen (Lobi), die jeweils mit einem eigenen Ausführungsgang auf der Brustwarze (Papilla mammaria) münden. An den Enden der verzweigten Ausführungsgänge sitzen Endstücke, die in Gruppen (Lobuli) angeordnet sind. (Quelle: Paulsen u. Waschke 2017 Sobotta, Atlas der Anatomie Band 1 (Aufl. 24),153. <https://institut.elsevierelibrary.de/pdfreader/sobotta-atlas-der-anatomie-band-1-aufl-24/153>)

Die Abbildung 4 zeigt den mikroskopischen Aufbau eines Drüsen-Endstücks, die so genannte duktulolobuläre Einheit. Diese duktulolobuläre Einheit gilt als Ausgangspunkt für die meisten Mammakarzinome (Rüschhoff 2014).

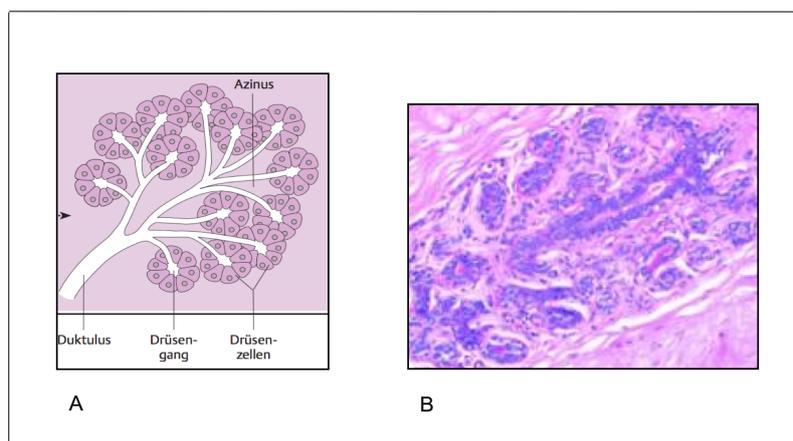


Abb. 4: Histologie der Mamma, duktulolobuläre Einheit. A) schematische Darstellung B) histologisches Bild. (Quelle: Fischer u. Baum 2014 Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, Abb. 3.1.b/c https://www-1thieme-2connect-1de-1003a60ri0cbc.emedien3.sub.uni-hamburg.de/media/10.1055-b-003-104342/10-1055-b-003-104342_003_001c.tif_epub1.jpg)

In der aktuellen WHO-Klassifikation für Tumoren der Brust (Lakhani et al. 2012) gibt es einige Neuerungen in der Klassifizierung und Namensgebung bestimmter epithelialer Läsionen. Als Vorläuferläsionen der invasiven Karzinome werden DCIS (duktales Karzinom in situ) und die lobulären Läsionen LCIS (lobuläres Karzinom in situ) und ALH (atypische lobuläre Hyperplasie) genannt.

Bei den invasiven Karzinomen wird der häufigste Subtyp (60-75%) als invasives Karzinom NST (no special type) bezeichnet. Die hierunter klassifizierten Tumore stellen keine einheitliche histologische Entität dar und weisen keine spezifischen morphologischen Merkmale auf. Die im deutschen Sprachraum gebräuchliche Bezeichnung für diese Gruppe „duktales invasives Karzinom“ wird der Heterogenität dieser Gruppe von Tumoren, die nicht immer duktales Ursprungs sind, nicht ganz gerecht, ist aber weiterhin akzeptiert. Das häufigste Karzinom mit „spezifischen Merkmalen“ ist das invasive lobuläre Karzinom (10-15%). Weitere seltenere Subtypen sind das tubuläre, das cribriforme und muzinöse Karzinom, das Karzinom mit medullärer und apokriner Differenzierung, das mikropapilläre Karzinom und metaplastische Karzinome (Lakhani et al. 2012). Klinisch hat sich die Einteilung in molekulare Subtypen durchgesetzt, da diese auch Konsequenzen für die Therapie hat. Auf diese wird weiter unten eingegangen.

Viele Faktoren beeinflussen die Pathogenese vom Brustkrebs. In der heutigen Vorstellung kommt es initial zu einer proliferativen Deregulierung mit Hyperplasie. Darauf folgend führt eine genetische Instabilität in einzelnen Zellklonen zu einer atypischen Hyperplasie. Danach ereignen sich in kaskadenartiger Abfolge genetische Störungen mit einer Aktivierung von Onkogenen wie z.B. c-erb-B2 (Synonym HER2 oder HER2/neu= human epidermal growth factor receptor, type 2) und mit einer Hemmung von Suppressorgenen wie z.B. das E-Cadherin-Gen, unter der die Zell-Zell-Interaktion leidet. Dadurch wird eine »epithelial-mesenchymale Transition« unterstützt und die Zellen können unabhängig vom restlichen Zellverband wachsen. Zur Verbesserung der Tumordurchblutung werden Angiogenesefaktoren und Matrix-auflösende Proteasen exprimiert, wodurch die Neoplasie wachsen und sich invasiv ausbreiten kann (Riede und Werner 2017).

Die Metastasierung des Mammakarzinoms erfolgt lymphogen je nach Quadrantenlokalisierung in die Axillarlymphknoten bzw. die Retrosternal- und Supraklavikularlymphknoten und/oder hämatogen bevorzugt in das Skelettsystem, die Lunge, die Leber und das Gehirn (Riede und Werner 2017). Fernmetastasen treten bei etwa 20-30% der betroffenen Frauen im Laufe der Erkrankung auf (Harbeck und Liedtke 2016).

1.1.3 Risikofaktoren

Als wichtigster populationsbezogener Risikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms gilt ein fortgeschrittenes Alter (S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2017). Weitere Risikofaktoren sind die positive Familien- und Eigenanamnese, endokrine und reproduktive Faktoren (frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität oder erste Geburt nach dem 30. Lebensjahr, keine Stillzeiten), hohe mammographische Dichte des Brustgewebes und Strahlenexposition des Thoraxes. Auch die Einnahme von kombinierten oralen Östrogen-Progesteron-Kontrazeptiva und eine Hormonersatztherapie in der Menopause steigern das Brustkrebsrisiko. Bestimmte „Lifestyle“-Faktoren führen ebenso zu einem erhöhten Risiko: Alkoholkonsum, kalorienreiche Ernährung und körperliche Inaktivität (Schnitt et al. 2014). Weiter nennt die AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie) Adipositas, Nikotinabusus, Schlafmangel (Nacht / Schichtarbeit) und chemische Noxen während der fetalen und frühkindlichen Entwicklung (AGO 2017).

Ein kleiner Anteil (etwa 5-10%) der Brustkrebserkrankungen ist auf familiäre Veranlagung zurückzuführen. Mutationen in den BRCA1 und BRCA2 Genen (Breast-Cancer-Gene 1 und 2) erhöhen erheblich das Risiko, an Mammakarzinom (und auch an Ovarialkarzinom) zu erkranken. Das Lebenszeitrisiko, an Brustkrebs zu erkranken, beträgt bei den Betroffenen 80% (Baum 2014). Es wurden aber auch andere Gene identifiziert, die neben den bereits bekannten wie z.B. p53 mit der Brustkrebsentstehung in

Verbindung stehen (AKT2, ARID1B, CASP8, CDKN1B, MAP3K1, MAP3K13, NCOR1, SMARCD1 und TBX3) (Schnitt et al. 2014).

1.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Brustkrebs ist eine sehr heterogene Gruppe von Krankheiten, die sich in ihrer Prognose und ihrem Ansprechen auf die Behandlung unterscheiden (Schnitt et al. 2014). Um die Prognose der Erkrankung abzuschätzen, werden zuerst klassische klinisch-pathologische Parameter herangezogen. Das Tumorstadium nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer) und der histologische Differenzierungsgrad gelten als die stärksten prognostischen Faktoren beim Mammakarzinom, aus welchen sich das Rezidiv- und das Sterberisiko ableiten lassen. Die Bestimmung des Tumorstadiums (Staging), basierend auf Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung, erfolgt nach der TNM (Tumour-Node-Metastasis)-Klassifikation. Der Differenzierungsgrad (Grading) wird nach dem Prozentsatz des drüsenartig/tubulär differenzierten Tumoranteils, nach dem Grad der Kernpleomorphie und nach der Mitoserate bestimmt (Rüschoff 2014). Das Alter der Patientin bei Diagnosestellung zählt ebenso zu den Prognosefaktoren (Gätje et al. 2015).

Die Prognose ist umso ungünstiger, je größer der Tumor ist, je mehr Lymphknoten befallen sind und je höher das Grading (je undifferenzierter der Tumor) ist. Eine schlechtere Prognose haben Frauen über 75 Jahren und Frauen unter 35 Jahren bei der Erstdiagnose (Riede und Werner 2017).

Wenn ein Mammakarzinom in einem frühen Stadium diagnostiziert wird, ist die Überlebenschance für die Patientinnen gut. Die American Cancer Society gibt für Erkrankungen im Stadium 0 (Tis= Tumor in situ) und Stadium I (T1= Tumorgröße \leq 2cm, keine Lymphknoten- und Fernmetastasen) nach UICC eine 5-Jahres-Überlebensrate von fast 100% an, während im Stadium IV (jede Tumorgröße bei Vorhandensein von Fernmetastasen) die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 22% beträgt (American Cancer Society 2017).

Der positive Hormonrezeptor-Status (Östrogen- und/oder Progesteron-Rezeptor) ist ein für die Prognose günstiger Faktor. Ein hoher Expressions- und Amplifikationsgrad des Onkogens HER2/neu korreliert negativ mit der Prognose (Riede und Werner 2017).

Der Proliferationsmarker Ki-67 eignet sich auch dafür, die Prognose der Erkrankung einzuschätzen. Je höher der Wert ist, desto schlechter ist die Prognose. Ki-67 ist zudem ein kontinuierlicher Parameter zur Bestimmung der Proliferationsrate im Verlauf der Erkrankung (AGO 2017).

Außer den Prognosefaktoren gibt es auch die so genannten prädiktiven Faktoren, die das Ansprechen auf bestimmte Therapien vorhersagen. Dazu gehört der Östrogenrezeptor (ER)- und Progesteronrezeptor (PR)- Status, welcher eine Vorhersage ermöglicht, ob ein Tumor auf eine endokrine Therapie (z.B. Tamoxifen oder Aromatasehemmer) ansprechen wird. Die Bestimmung des HER2/neu-Status liefert prädiktive Daten für den Erfolg einer Antikörper-Therapie gegen HER2/neu (z. B. Trastuzumab). Die oben genannten Therapien sind nicht geeignet für etwa 15% der Mamma-Tumoren, die als "dreifach negativ" („triple negative“) bezeichnet werden (keine Expression von ER, PR oder HER2/neu) und eine sehr schlechte Prognose haben (Schnitt et al.2014).

Heutzutage gibt es auch die Möglichkeit, durch die cDNA-Microarray-Technologie eine Multigenanalyse des Tumors zu machen. Dadurch werden sowohl prognostische als auch prädiktive Informationen für die Therapie gewonnen. Perou et al. identifizierten durch die Analyse von Genexpressionsprofilen molekulare Subtypen des Mammakarzinoms, die sich in ihrem klinischen Verlauf und Therapieansprechen signifikant unterscheiden: Luminal A und Luminal B, HER2-positiv und Basal-ähnlich (Perou et al. 2000). Es wurden daraufhin kommerzielle Tests entwickelt, die eine solche Typisierung erlauben. In Deutschland gebräuchliche Tests sind unter anderem EndoPredict®, MammaPrint®, Oncotype DX®, Prosigna®, wobei sich die Evidenzlage für die einzelnen Tests unterscheidet (S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2017). Nicht alle verfügbaren Tests sind gut validiert, die Kosten sind relativ hoch und die Interpretation noch nicht durch Evidenz belegt, so dass eine

Multigenanalyse nur bei ausgewählten Patientinnen empfohlen wird, wenn alle anderen Kriterien keine klare Therapieentscheidung zulassen und sich aus der Testung therapeutische Konsequenzen ergeben (AGO 2017).

Die molekularbiologische Untersuchung eines Mammakarzinoms ist aber nicht überall auf der Welt verfügbar, deswegen wurde durch einen Experten-Konsens auf dem alle zwei Jahren stattfindenden internationalen St. Gallen-Expertentreffen eine vereinfachte Klassifikation entwickelt (Tabelle 1). In dieser wird das Mammakarzinom anhand eines immunhistochemischen Algorithmus in Subtypen unterteilt, die mit Therapieansprechen und Prognose korrelieren (Goldhirsch et al. 2011, Goldhirsch et al. 2013, Coates et al. 2015). In dieser Einteilung fungieren ER-, PR-, HER2-Status und die Höhe des Ki-67-Wertes als Surrogat-Parameter für die molekularen Subtypen des Mamakarzinoms, die zuvor von Perou et al. 2000 definiert wurden (s.o.). Diese Einteilung kann auch in Teilen der Welt verwendet werden, in denen aus logistischen oder finanziellen Gründen die Multigenexpression-Testung nicht zur Verfügung steht. Dabei werden die weit verbreitete immunhistochemische (IHC) -Bestimmung für Östrogen- und Progesteronrezeptoren und die Bestimmung der HER2-Überexpression und -Amplifikation mittels IHC und In situ Hybridisierung verwendet. Für die Bestimmung von ER-, PR- und HER2-Status gelten die Leitlinien der ASCO (American Society of Clinical Oncology) und CAP (College of American Pathologists). Ki-67 wird als alternativer Marker der Proliferationsrate verwendet, wenn auch mit geringerer analytischer Validität als molekulare Tests, außerdem ist der Cut-off Point für Ki-67 unter den Experten umstritten (Coates et al. 2015). Wenn keine verlässliche Ki-67-Untersuchung verfügbar ist, können alternative Parameter, wie beispielsweise der histologische Differenzierungsgrad, verwendet werden (Goldhirsch et al. 2011).

Tab. 1: Therapie-orientierte Klassifikation des Mammakarzinoms in Subtypen (Übersetzt und modifiziert aus: Coates et al. 2015, Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 *Annals of Oncology* 26, 1541, Table 2. Treatment-oriented classification of subgroups of breast cancer) ASCO = American Society of Clinical Oncology, CAP = College of American Pathologists

Klinische Einteilung	Anmerkungen
Triple-negativ	ER-negativ, PR-negativ und HER2-negativ
Hormon-Rezeptor-negativ und HER2-positiv	Nach ASCO/CAP-Leitlinien
Hormon-Rezeptor-positiv und HER2-positiv	Nach ASCO/CAP-Leitlinien
Hormon-Rezeptor-positiv und HER2-negativ (Gruppe der luminalen Erkrankungen):	ER-positiv und/oder PR-positiv $\geq 1\%$ ^a
Hohe Rezeptorexpression, geringe Proliferation, niedrige Tumormast (luminal A-like)	molekularer Multiparameter-Marker "günstige Prognose" falls verfügbar. Hoher ER / PR und eindeutig niedriger Ki-67 ^b . Niedrige oder fehlende Lymphknotenbeteiligung (N0-3), kleine Tumor-Größe (T1, T2).
Zwischenstufe	molekularer Multiparameter-Marker "intermediär" falls verfügbar ^c . Unsicherheit besteht hinsichtlich des Risikos und der Ansprechbarkeit für endokrine und zytotoxische Therapien.
Niedrige Rezeptorexpression, hohe Proliferation, hohe Tumormast (luminal B-like)	molekularer Multiparameter-Marker "ungünstige Prognose" falls verfügbar. Niedriger ER / PR mit eindeutig hohem Ki-67 ^b . Ausgedehnte Lymphknotenbeteiligung, histologischer Grad 3, ausgedehnte lympho-vaskuläre Invasion, größere Tumormasse (T3).

^a ER-Werte zwischen 1% und 9% wurden als nicht eindeutig angesehen. Für Patienten mit diesen Werten kann daher eine endokrine Therapie alleine nicht zuverlässig sein.

^b Ki-67-Werte sollten im Lichte der lokalen Laborwerte interpretiert werden: Wenn ein Labor beispielsweise einen medianen Ki-67-Wert bei einer Rezeptor-positiven Erkrankung von 20% hat, können Werte von 30% oder mehr als eindeutig hoch angesehen werden; diejenigen von 10% oder weniger als eindeutig niedrig.

^c Nicht alle molekularen Multiparameter-Tests zeigen einen Zwischenwert an.

1.1.5 Therapie

Der enorme wissenschaftliche Fortschritt der letzten Jahrzehnte führte zum deutlich besseren Verständnis der Biologie der Brustkrebserkrankung. Die Erkenntnisse über molekulare Signalwege und genetische Veränderungen, die den verschiedenen Brustkrebs-Subtypen zugrunde liegen, konnten größtenteils in die klinische Routine übersetzt werden und führten zu einem gezielteren und individuelleren Ansatz bei der Behandlung von Brustkrebs (Schnitt et al.2014). Studien haben die Wirksamkeit verschiedener Therapien

geprüft und zu evidenzbasierten Empfehlungen geführt. Das ermöglicht, jeder Patientin eine evidenzbasierte individuelle und gezielte Therapie anzubieten mit dem Anspruch, eine Unter- oder Übertherapie zu vermeiden. In Deutschland werden diese Empfehlungen von der AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, aktuelle Empfehlungen 2017) herausgegeben, seit Dezember 2017 gibt es auch die überarbeitete interdisziplinäre „S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“. Zu konkreten evidenzbasierten Therapieempfehlungen wird auf die aktuell gültige Fassung dieser Empfehlungen verwiesen. Die Ausführungen hier dienen nur der Übersicht.

Die Therapie des Mammakarzinoms fußt auf den folgenden Säulen: antihormonelle und Immuntherapie, Chemotherapie, operative Therapie und Strahlentherapie.

Die Therapieoptionen leiten sich aus den folgenden bereits erwähnten Faktoren ab: Tumorausbreitung bei der Diagnosestellung (Staging/TNM-Klassifikation), der Differenzierungsgrad (Grading), Hormonrezeptor- und HER2/neu-Status, prä- oder postmenopausaler Status und Alter der Patientin, die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und eventuell auch die Ergebnisse eines Multigenexpressionstests des Tumors.

Operativ stehen zur Wahl eine Mastektomie oder wenn immer möglich eine Brust-erhaltende Operation. Bei der Brust-erhaltenden Therapie ist eine postoperative Bestrahlung zwingend, da diese die Lokalrezidivrate erheblich senkt (Gätje et al. 2015). Ob eine Lymphonodektomie der Axilla erfolgt, entscheidet sich nach der mikroskopischen Untersuchung des „Wächter“-Lymphknoten („Sentinel“) in Abhängigkeit davon, inwieweit dieser von Metastasen betroffen ist. Ein Sentinel-Lymphknoten (bzw. Lymphknoten-Gruppe) ist derjenige, der als erster das Tumorgebiet drainiert und durch intraoperative Markierung identifiziert wird. Wenn dieser tumorfrei ist, muss keine Axilla-Dissektion erfolgen.

Bei der systemischen Therapie gibt es neoadjuvante Therapieeinsätze, die zur Tumorverkleinerung vor einer Operation dienen, und adjuvante Therapien nach der Operation. Eine Übersicht über die Therapieempfehlungen bei früh erkanntem Mammakarzinom ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Empfehlungen für postoperative adjuvante systemische Therapie (Übersetzt und modifiziert aus: Coates et al. 2015, Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 *Annals of Oncology* 26, 1542, Table 3 Postoperative adjuvant systemic treatment recommendations) OFS=ovarian function suppression (Ovarialfunktionssuppression), AI= aromatase inhibitors (Aromatase-Inhibitoren)

Klinische Einteilung	Therapie
Triple-negativ	zytotoxische Chemotherapie einschließlich Anthrazyklin und Taxan
ER-negativ und HER2-positiv	
T1a, keine Lymphknotenbeteiligung	Keine Systemische Therapie
T1b, c, keine Lymphknotenbeteiligung	zytotoxische Chemotherapie plus Trastuzumab
höherer T- oder N-Stadium	Anthrazyklin → Taxan, gleichzeitig Trastuzumab für 12 Monate
ER-positiv und HER2-positiv	Wie oben plus endokrine Therapie entsprechend dem menopausalen Status wie unten beschrieben
ER-positiv und HER2-negativ (luminale Erkrankungen):	
Ohne Marker für schlechte Ansprechbarkeit für endokrine Therapie (luminal A-like)	Alleinige endokrine Therapie nach menopausalem Status
Prämenopausal, niedriges Risiko	Tamoxifen für 5 Jahre
Prämenopausal, alle restlichen	Tamoxifen für 5-10 Jahre oder OFS plus Tamoxifen oder OFS plus Exemestan
Postmenopausal, niedriges Risiko	Tamoxifen für 5 Jahre
Postmenopausal, alle restlichen	vorzugsweise zuerst AI, verlängerte adjuvante Therapie
Mit Markern, die auf eine schlechtere Ansprechbarkeit für eine endokrine Therapie hinweisen (luminal B-like)	Endokrine Therapie wie oben plus adjuvante zytotoxische Chemotherapie in vielen Fällen
Faktoren, die das Auslassen der Chemotherapie trotz des "luminalen B-ähnlichen" Phänotyps unterstützen	Ergebnis „gute Prognose“ des molekularen Multiparameter-Tests, falls verfügbar

Auf die Therapie der fortgeschrittenen Mammakarzinom-Erkrankung wird hier nicht eingegangen, und es wird auf die evidenzbasierten Empfehlungen der S3-Leitlinie „Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ in der aktuellen Fassung verwiesen. Es gibt viele neue Therapien, welche in klinischen Studien untersucht werden und vielleicht in naher Zukunft etabliert sein werden. Ein Beispiel sind die CDK4/ 6-Inhibitoren,

die bei Patientinnen mit Fernmetastasen bei Versagen anderer Therapien empfohlen werden.

Trotz des wissenschaftlichen Fortschritts und der heutigen Therapiemöglichkeiten gilt das Mammakarzinom bei Vorhandensein von Fernmetastasen weiterhin als nicht heilbar (Gätje et al. 2015, Harbeck und Liedtke 2016). Wie bereits erwähnt, ist die 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen mit Fernmetastasen nur 22% (American Cancer Society 2017), was erklärlich macht, warum weitere Forschung notwendig ist.

1.2 Aspekte der Tumorprogression

Es wird heute angenommen, dass nahezu alle manifesten Neoplasien aus einer Vielzahl von Zelltypen bestehen. Neben den eigentlichen Tumorzellen finden sich auch Entzündungszellen, Fibroblasten, Endothelzellen und andere Zelltypen. Ihre Interaktionen und ihre gegenseitige Beeinflussung machen die Tumorentwicklung erst möglich (Böcker et al. 2012). Die meisten Tumoren haben vermutlich einen klonalen Ursprung, d.h. dass alle malignen Zellen im Tumor aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind (Wagner und Müller 2010a). Bei dieser Zelle ist zum Beispiel aufgrund einer Mutation ein Gen verändert und ermöglicht die Expansion des Klons. Diese Eigenschaft vererbt die Zelle bei der Zellteilung an ihre Tochterzellen. In einer der Zellen der nächsten Generation kann ein weiterer Defekt auftreten, der sie zur weiteren Expansion befähigt und ihrerseits weitervererbt wird. So entsteht nach mehreren Generationen und neu aufgetretenen Veränderungen eine Tumorzelle, die mehrere Defekte in den regulatorischen Schaltkreisen besitzt, welche es ihr ermöglichen, eine bösartige Geschwulst zu bilden. Einige dieser erworbenen biologischen Fähigkeiten sind immer wieder bei Tumorzellen zu finden. Diese wurden 2000 von Hanahan und Weinberg zusammengefasst und gelten als Charakteristika der meisten, wenn nicht sogar aller Tumorzellen (Hanahan und Weinberg 2000):

- Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen

- Ausweichen gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose)
- Unbegrenzt Replikationspotential
- Fähigkeit zur anhaltenden Gefäßneubildung (Angiogenese)
- Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung

Elf Jahre später konnten die Autoren auf Grund der wissenschaftlichen Fortschritte auch folgende Fähigkeiten hinzufügen (Hanahan und Weinberg 2011):

- Fähigkeit zur Neuprogrammierung des Energiestoffwechsels
- Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem

Im Folgenden wird auf einige der Mechanismen näher eingegangen, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.2.1 Proliferation

Normale Zellen benötigen mitogene Wachstumssignale, damit sie aus einem Ruhezustand (G₀, siehe unten) in einen aktiven Proliferationszustand (G₁, siehe unten) gelangen können. Diese Signale werden durch Transmembranrezeptoren in die Zelle übertragen. Drei Klassen von Signalmolekülen binden an diese Rezeptoren: lösliche Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixkomponenten und Adhäsionsmoleküle, die Zell-Zell-Kontakte herstellen (Hanahan und Weinberg 2000).

Während die meisten löslichen mitogenen Wachstumsfaktoren von einem Zelltyp hergestellt werden, um die Proliferation eines anderen zu stimulieren (heterotypische Stimulation), erwerben viele Krebszellen die Fähigkeit, selbst Wachstumsfaktoren zu synthetisieren, auf die sie reagieren (autokrine Stimulation). Ein anderer Mechanismus, welchen Tumorzellen nutzen, ist die Rezeptor-Überexpression. Dies erlaubt ihnen, hyperreagibel auf Wachstumsfaktoren zu reagieren, deren Niveau normalerweise keine Proliferation auslösen würde (Fedi et al.1997). Ein Beispiel hierfür ist die Hochregulation des HER2/neu-Wachstumsrezeptors beim Mammakarzinom.

Ein anderer Mechanismus, der durch Tumorzellen genutzt wird, ist die Liganden-unabhängige Wachstumsfaktorrezeptor-Aktivierung.

Um proliferieren zu können, muss jede Zelle einen definierten Zellzyklus durchlaufen. Dieser startet mit der G1-Phase (G=gap), in der die Zelle wächst und die für die DNA-Replikation notwendigen Proteine bildet. Bestehen günstige Bedingungen, geht die Zelle in die S-Phase (S=Synthese) über. Hier findet die DNA-Synthese (Verdoppelung des Genoms) statt, und das Zentriol (Ausgangspunkt der Mitosespindel) teilt sich. Es folgt die G2-Phase, in der vermehrt RNA-Moleküle und teilungsspezifische Proteine gebildet werden, außerdem wird die synthetisierte DNA auf Basen-Fehlpaarungen kontrolliert und repariert. Läuft alles nach Plan und die Bedingungen sind weiterhin günstig, folgt die eigentliche Zellteilung, die M-Phase (=Mitose). Nach der Teilung kann die Zelle in einer Ruhe-Phase (G0-Phase) eintreten, in der sie spezifische Aufgaben erfüllt und sich nicht weiter teilt. Sie kann aber auch, abhängig von z.B. extrazellulären Wachstumsfaktoren, in die G1-Phase eintreten und erneut den replikativen Zellzyklus durchlaufen.

Der Zellzyklus wird sehr präzise und sehr aufwendig reguliert. Die oben genannten mitogenen Wachstumssignale lösen über ihre spezifischen Zellmembranrezeptoren Signalkaskaden aus, wodurch bestimmte Proteinkinasen aktiviert werden. Diese steuern spezifisch den Fortschritt des Zellzyklus. Sie werden CDK (cyclin dependent kinases) genannt, da diese nur aktiv sind, wenn sie mit Zyklinen dimerisieren. Die Zyklone sind regulatorische Proteine, die phasenspezifisch hochreguliert werden. Die Cyclin/CDK-Dimere können durch Phosphorylierung von anderen Enzymen und Transkriptionsfaktoren den nächsten Schritt im Zellzyklus einleiten. Ihre Aktivität selbst kann durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung an verschiedenen Aminosäuren oder durch spezifische CDK-Inhibitor-Proteine (CDKI) kontrolliert werden. Die CDKIs werden in zwei Familien eingeteilt, die Ink4-Familie und die Cip/Kip-Familie (Netzker 2016).

Die Abbildung 5 zeigt schematisch die Bedeutung der Zyklone, der CDKs und der CDKIs in den Phasen des Zellzyklus.

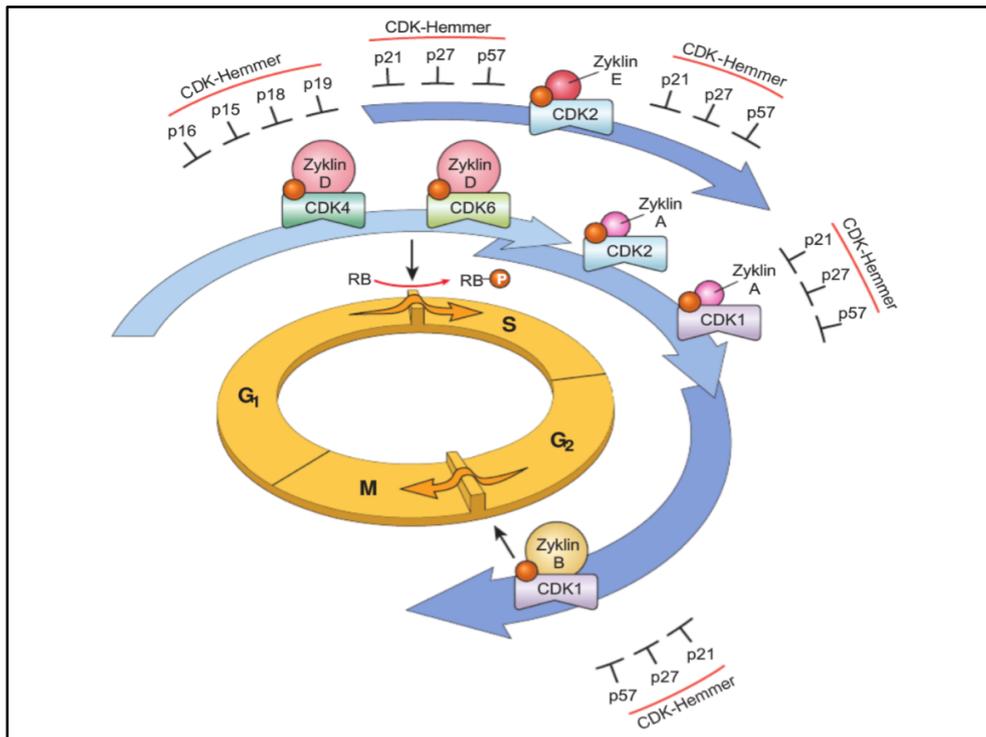


Abb. 5: Bedeutung von Zyklinen, CDKs und CDK-Inhibitoren. Cyclin D/CDK4, Cyclin D/CDK6 und Cyclin E/CDK2 ermöglichen den G₁-S-Übergang. Cyclin A/CDK2 und Cyclin A/CDK1 sind in der S-Phase von Bedeutung. Cyclin B/CDK1 bewirkt den G₂-M-Übergang. Die Ink4-Familie der CDK-Inhibitoren (p16, p15, p18, p19) hemmt spezifisch Cyclin D/CDK4 und Cyclin D/CDK6, während die Mitglieder der Cip/Kip-Familie der Inhibitoren (p21, p27, p57) alle CDKs hemmen können. (Quelle: Böcker et al. (2012). Pathologie, 5.A., S.147, Abb. 6.29 Bedeutung von Zyklinen, CDKs und CDK-Inhibitoren, <https://institut.elsevierelibrary.de/pdfreader/pathologie>)

Der G₁/S-Übergang ist der Schlüsselschritt für die Zellzyklusprogression. Dieser Übergang wird in der mittleren G₁-Phase durch Cyclin D/CDK4 und Cyclin D/CDK6-Dimere gesteuert, während in der späten G₁-Phase Cyclin E/CDK2-Dimere essentiell sind. Das Substrat dieser Proteinkinasen ist das nukleäre Tumorsuppressor-Retinoblastoma-Protein Rb (=p105) und seine verwandten Rb2 (=p130) und RBL1 (=p107), welche eine Schlüsselrolle in der Hemmung vom Zellzyklus spielen (Galderisi et al. 2003).

Zellspezifisch wird Cyclin D1, D2 oder D3 induziert, welches an CDK4 oder CDK6 bindet. Das Rb (=Retinoblastom-Protein) blockiert in dem Zellkern die Transkription vieler Gene durch Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren. Wird Rb von den o.g. Cyclin/CDK-Komplexen phosphoryliert, kommt es zu einer Chromatin-Umstrukturierung. Als Folge wird vermehrt Cyclin E exprimiert, welches in der späten G₁-Phase an CDK2 bindet und diese aktiviert. Cyclin

E/CDK4 hyperphosphoryliert Rb, was zur Freisetzung der Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie führt. Diese induzieren dann die Transkription vieler für den Eintritt in die S-Phase benötigter Gene. Die inhibitorischen Ink4-Proteine (p16, p15, p18 und p19) hemmen spezifisch CDK4 und CDK6 und verursachen eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase. Die Proteine der Cip/Kip-Familie (p21, p27 und p57) haben eine breitere Spezifität und hemmen alle CDKs. CyclinA/CDK2- und CyclinA/CDK1-Dimere spielen eine wichtige Rolle für die DNA-Synthese in der S-Phase (Netzker 2016). Der Übergang von der G2- in die M-Phase wird durch CyclinB/CDK2-Dimere (= „mitosis promoting factor“) initiiert. Dieser Proteinkinase-Komplex phosphoryliert Histone, Lamine und andere Zellkernbestandteile und bewirkt damit unter anderem die Chromosomenkondensation und die Auflösung der Kernmembran (Böcker et al.2012).

Die an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Gene können als Onkogene oder Tumorsuppressorgene fungieren und die Zellproliferation in Tumoren fördern. Eine Überexpression von Cyclin D1 wurde bei vielen Tumorarten gefunden. Bei etwa 50% der invasiven Mammakarzinome zeigt sich auch eine Cyclin D1-Überexpression, wobei eine Genamplifikation des für Cyclin D1 kodierenden CCND1-Gen seltener ist (5% bis 20%). Einige Studien fanden, dass die Überexpression von Cyclin D1 ein Prädiktor für eine schlechtere Prognose ist, andere eine Assoziation mit einem ER-positiven Phänotyp und einem besseren Outcome. Eine hohe CCND1-Genamplifikation ist mit einem aggressiven Tumorverhalten und einer schlechten Prognose verbunden (Ortiz et al. 2017).

Einige der CDK-Inhibitoren können als Tumorsuppressor-Proteine wirken. Gut belegt ist zum Beispiel die Aktivierung von p21 durch p53 an einem Kontrollpunkt, dem so genannten Checkpoint während der G1-Phase. Bei Strahlung, DNA-schädigender Chemotherapie oder anderem Stress wie Nährstoffentzug wird der Zellzyklus an diesem G1-Checkpoint arretiert, bis die Bedingungen günstiger sind oder die Schäden repariert sind (El-Deiry 2016).

Das Wissen über die Regulation des Zellzyklus hat bereits neue therapeutische Ansätze gebracht, z.B. wurden Antikörper gegen die CDKs

entwickelt. Beim Mammakarzinom sind es die CDK4/6-Hemmer, z.B. Palbociclib, die bei fortgeschrittener Tumorerkrankung in speziellen Fällen eingesetzt werden können (S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2017).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine erhöhte Fra-2 Expression eine Wirkung auf die für das Voranschreiten des Zellzyklus verantwortlichen Cycline A, B, D1 und E sowie die Zellzyklus-Inhibitoren Rb und Rb2 hat. Außerdem wurde die Proliferation von Fra-2 überexprimierenden Zellen direkt im Proliferationsassay untersucht.

1.2.2 Invasion

Ein übermäßig proliferierender transformierter Zellklon zeigt sich im histologischen Bild als ein in-situ-Karzinom. Hierbei ist die Basalmembran des Epithels noch intakt und nicht durch Tumorzellen durchbrochen. Die Basalmembran ist eines der Kompartimente der extrazellulären Matrix (ECM). Sie trennt die Epithelzellen vom interstitiellen Bindegewebe und erfüllt vielfältige Funktionen. Sie dient als Haftungsgrundlage für Epithelzellen und als Leitschiene für deren Migration, außerdem bildet sie eine Schranke für verschiedene Stoffe durch ihre Semipermeabilität. Ihre Hauptbestandteile sind Kollagen Typ IV, Laminin (Glykoprotein), Perlecan (Heparansulfat-Proteoglycan) und Entactin. Das sich unter der Basalmembran befindliche interstitielle Bindegewebe besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern (Typ I und III), Fibronectin, Elastin und Proteoglykanen, in denen gewebespezifisch verschiedene Zelltypen (Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen etc.) eingebettet sind (Wagener und Müller 2010b). Die ECM ist kein passives mechanisches Gerüst, sondern nimmt aktiv an physiologischen und neoplastischen Invasionen teil (Liotta 2016). Erst durch die Interaktion von den o.g. in-situ-Karzinom-Zellen mit der ECM kann ein invasives Karzinom entstehen.

Damit wird die nächste Stufe im Prozess der malignen Progression besprochen, die Invasion. Sie ist naturgemäß mit der Zellmigration verbunden.

Für diesen Prozess ist das „Drei-Schritt-Modell“ weitgehend akzeptiert. Diese Schritte wurden von Liotta 2016 so zusammengefasst: „Adhere, Degrade, and Move“ (Liotta 2016). Im ersten Schritt haftet die transformierte Zelle sich an die extrazelluläre Matrix. Beim zweiten Schritt wird durch eine Vorstülpung der Zelle (Podosom, bei malignen Zellen auch als Invadopodium bezeichnet) die ECM am vorderen Zellpol durch Proteasen abgebaut. Beim dritten Schritt erfolgt die aktive Bewegung des Zellkörpers durch die jetzt „löchrige“ Matrix (Liotta 2016, Wagener und Müller 2010b, Yamaguchi und Condeelis 2007). Durch diesen Prozess sind Tumorzellen in der Lage, ins Bindegewebe einzuwachsen und die normale Gewebestruktur zu zerstören. Er ist aber nicht nur für die lokale Gewebeinvasion notwendig, sondern auch Voraussetzung für die Invasion in Blut- und Lymphgefäße und somit auch für die Metastasierung.

Der Prozess der Metastasierung ist eine komplexe Kaskade von aufeinander aufbauenden, aufeinander bezogenen Schritten, einschließlich Angiogenese, lokaler Invasion, Intravasation und Extravasation, bei denen der aktive Abbau des Gewebes durch Enzyme eine große Rolle spielt. Die Synthese, Sekretion und katalytische Aktivität der entsprechenden Proteinase ist streng reguliert. Die meisten werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) sezerniert und müssen erst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Hochpotente natürliche Proteinase-Inhibitoren begrenzen die Dauer der aktiven Proteolyse. Unter physiologischen Bedingungen existiert ein Gleichgewicht zwischen dem proteolytischen Abbau und der regulatorischen Inhibition der Proteolyse bei normalen Ereignissen wie zum Beispiel bei der Wundheilung oder bei der Remodellierung des Bindegewebes während der Embryonalentwicklung. Bei bestimmten pathologischen Prozessen, einschließlich der Tumorprogression, ist jedoch das Gleichgewicht zwischen negativer Regulation und aktiver Proteolyse gestört, so dass keine Einschränkung der Proteolyse erfolgt (Garbett et al.2000).

Die Proteinase werden anhand ihres aktiven Zentrums in Serinproteinase (z.B. Kallikreine, Plasmin, Trypsin), Aspartatproteinase (z.B. Pepsin, Cathepsin D), Cysteinproteinase (Cathepsin B, H, L), Metalloproteinase (Matrix-Metalloproteinase, ACE= angiotensin converting enzyme) und

Threoninproteasen (Proteolytische Untereinheiten des Proteasoms) unterteilt (Müller und Graeve 2014). Einen besonderen Stellenwert bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren haben die Matrix-Metalloproteinasen und die Serinproteinase Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp (uPA) (Garbett et al. 2000, Wagener und Müller 2010b). Diese Enzyme müssen die Tumorzellen nicht zwingend selbst produzieren, sondern sie nutzen auch Proteinasen, die von den normalen Zellen der Tumor-Mikroumgebung, u.a. Fibroblasten und inflammatorische Zellen sezerniert werden (DeClerck et al. 2004, Liotta 2016).

Matrix-Metalloproteinasen

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die gemeinsam fast alle Matrixkomponenten abbauen können (Vihinen und Kähäri 2002). Sie werden in vivo nicht ständig exprimiert, sondern ihre Expression wird abhängig von exogenen Signalen wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen induziert. Alle MMPs außer MMP-2 besitzen in ihren Promotor-Regionen AP-1-Bindungsstellen (Westermarck und Kähäri 1999), was sie für diese Arbeit interessant machte. Außer auf der Ebene der Transkription wird die Aktivität der MMPs auch posttranskriptionell reguliert. Fast alle der MMPs werden als inaktive Vorstufen sezerniert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Ihre Inaktivierung erfolgt entweder unspezifisch (alpha-2-Makroglobulin, alpha1-Antiproteinase) oder durch spezifische Inhibitoren, die so genannten TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteases). Basierend auf ihren Substraten wurden die MMPs in Untergruppen eingeteilt, die Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine (Wagener und Müller 2010b). Sie kommen in löslicher Form oder Membran-gebunden (Membran-Typ-MMPs) vor. Erhöhte Spiegel von bestimmten MMPs können in Tumorgewebe oder Serum von Patienten mit fortgeschrittener maligner Erkrankung nachgewiesen werden, und ihre Rolle als prognostische Tumormarker wurde vielfach untersucht (Vihinen und Kähäri 2002). Es wurden auch MMP-Inhibitoren mit breitem Wirkungsspektrum als Medikamente entwickelt und getestet. Je nach Proteinase und biologischem Zusammenhang können aber die MMPs Tumorwachstum und –Progression positiv oder negativ beeinflussen, so dass sich diese Inhibitoren in klinischen Studien nicht

bewährt haben (Wagener und Müller 2010b).

uPA-System

Das uPA-System umfasst die Serinproteinasen uPA und Plasmin, ihre Inhibitoren PAI-1, PAI-2 (Inhibitoren von uPA), Alpha2-Anti-Plasmin (Inhibitor von Plasmin) und den uPA-Rezeptor (uPAR). Dieses System hat eine wichtige physiologische Funktion bei der Fibrinolyse und bei der Wundheilung. Trotz des Namens hat uPA (Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp) keine Kinase-, sondern nur Proteinase-Aktivität. Es spaltet das Proenzym Plasminogen in das aktive Plasmin. Davor muss uPA selbst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. In-vitro-Befunde deuten darauf hin, dass uPA auch andere Proteine als Plasminogen spalten kann, z.B. Fibronectin, Alpha6-Integrin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), uPAR und sich selbst. Plasmin dagegen ist eine Breitspektrum-Proteinase, welche neben Fibrin auch Bestandteile der ECM und der Basalmembran wie Fibronectin, Laminin, Thrombospondin und nicht fibrilläre Kollagene spalten kann (Andreasen et al. 1997, Wagener und Müller 2010b, Duffy et al. 2014). Durch Abspaltung von ECM-Proteinen kann Plasmin an dieser Stelle sezernierte Wachstumsfaktoren freisetzen und damit aktivieren. Dazu gehören Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2, transformierender Wachstumsfaktor-beta (TGF- β) und HGF. Diese Wachstumsfaktoren können nach Bindung an ihre Rezeptoren zu verstärkter Proliferation, Migration, Invasion und Metastasierung führen. Zusätzlich kann Plasmin die Zymogenformen von Matrix-Metalloproteinasen (z. B. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 und MMP-13) und die Vorläuferform von uPA, pro-uPA, aktivieren. Die aktivierten MMPs können dann ihrerseits Kollagene und andere Proteinen in der ECM abbauen. Somit erzeugt die uPA-vermittelte Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin ein starkes proteolytisches System, das die ECM umbauen und Wachstumsfaktoren aktivieren kann (Duffy et al. 2014).

Die zweite Eigenschaft von uPA, die es von den meisten anderen Proteasen unterscheidet, ist, dass es mit hoher Affinität an seinen Zellmembranrezeptor uPAR (Synonym CD87), bindet. Dadurch erfolgt die Umsetzung von

Plasminogen zu Plasmin deutlich schneller, als wenn diese Reaktion durch freies uPA katalysiert wird (Andreasen et al. 2000). Dem uPAR fehlt eine Transmembran-Domäne, nach Aktivierung durch uPA folgen aber Interaktionen mit anderen Molekülen wie z.B. mit dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor, dem Thrombozyten-Wachstumsfaktorrezeptor, mit spezifischen Integrinen oder Low-Density-Lipoproteinrezeptoren (LDLR), die Signalwege aktivieren, welche an der Regulation von Zellproliferation, Migration und Metastasierung beteiligt sind.

Die proteolytische Aktivität von uPA wird durch zwei Inhibitoren mit hoher Spezifität gehemmt: PAI-1 und PAI-2. Sowohl PAI-1 als auch PAI-2 gehören zur den Proteinase-Inhibitoren der Serpin (**Ser**inproteinase-**In**hibitoren)-Superfamilie, wobei PAI-1 als SerpinE1 und PAI-2 als SerpinB2 bezeichnet wird. Von diesen beiden Inhibitoren ist PAI-1 zumindest in-vitro schneller wirkend (10 bis 100-fach schneller als PAI-2) (Wagener und Müller 2010b, Duffy et al. 2014).

Mehrere Untersuchungen, unter anderem an verschiedenen Tiermodellen, haben gezeigt, dass uPA an der Förderung von Tumorzellinvasion und Metastasierung beteiligt ist. Mit dem Wissen über die Funktion von uPA ist es nachvollziehbar, warum hohe Konzentration im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose korrelieren. Bei PAI-1 würde man das Gegenteil erwarten, hier hat sich aber in klinischen Studien gezeigt, dass hohe PAI-1-Levels auch mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sind (Duffy et al. 2014). Ein möglicher Mechanismus, durch den PAI-1 die Tumorprogression fördert, ist die Aktivierung der Angiogenese (Bajou et al. 2004). Außerdem gibt es Nachweise, dass PAI-1 einen anti-apoptischen Effekt hat und damit das Überleben der malignen Zellen verbessert (Kwaan et al. 2000).

Eine Beeinflussung von uPA durch die AP-1-Transkriptionsfaktoren ist bekannt. Es wurde auch ein Zusammenhang zwischen der Expression des für uPA kodierenden Gens PLAU und dem AP-1 Mitglied Fra-1 in Mammakarzinom-Zelllinien gefunden (Moquet-Torcy et al. 2014).

Klinisch wurden uPA und PAI-1 als Prognoseparameter bei nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen mit hohem Evidenzlevel empfohlen, um sich

für oder gegen eine Chemotherapie zu entscheiden (Duffy et al. 2014). Heute wird das kontrovers gesehen. Die aktuelle deutsche S3-Leitlinie spricht sich dagegen aus, da die Patientinnen in der zugrundeliegenden Chemo-N0-Studie keine endokrine Therapie erhalten haben, wie es den heutigen Standards beim ER- und PR-positiven Mammakarzinom entspricht (S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2017).

Da TREs (TPA responsive elements) in Promotorregionen des Plasminogen-Aktivator-System und der meisten MMPs vorhanden sind (Dang et al. 1999, Nerlov et al. 1991, Westermarck und Kähäri 1999) und AP-1-Faktoren über TREs die Transkription beeinflussen, wurde in dieser Arbeit nach einer Veränderung in diesen Systemen gefahndet. Bei veränderter Expression von AP-1-Mitgliedern wurden solche Zusammenhänge bereits gefunden (Milde-Langosch et al. 2004, Andersen et al. 2002). Unter diesen Aspekten, um den Einfluss des AP-1-Mitglieds Fra-2 zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Proteinmengen von MMP-1, MMP-3, uPAR und PAI-1 bestimmt. Außerdem wurde der Einfluss einer Überexpression von Fra-2 auf die Invasionsfähigkeit der MCF-7-Zellen in Invasionsassays untersucht.

1.2.3 Migration

Die Zellmigration ist ein häufig vorkommender physiologischer Vorgang. Sie ist ein komplexer Prozess, der von allen kernhaltigen Zelltypen in einem bestimmten Zeitfenster ihrer Entwicklung ausgeführt wird. Für die meisten Zellen, einschließlich epithelialer, Stroma- und neuronaler Zellen, sind Migrationsphasen auf die embryonale Organogenese beschränkt und hören mit der terminalen Gewebedifferenzierung auf. Für andere Zelltypen, wie z. B. Leukozyten, ist Migration ein integraler Bestandteil ihrer Funktion und wird während ihrer gesamten Lebenszeit aufrechterhalten. Einige Zelltypen wandern nur in Zusammenhang mit einem definierten Substrat, wie Epithelzellen, die sich entlang einer Basalmembran, aber nicht durch interstitielles Gewebe bewegen. Andere Zelltypen wie Leukozyten können

praktisch mit jedem vorhandenen Substrat interagieren und im gesamten Körper wandern (Friedl und Wolf 2010). Abweichungen in der Regulation der Zellmigration fördern das Fortschreiten vieler Krankheiten, einschließlich Tumorinvasion und Metastasierung (Yamaguchi und Condeelis 2007).

Da Tumorzellinvasion und -migration miteinander verbunden sind, wurde im Kapitel Invasion bereits das vereinfachte Modell für die Zellinvasion- und Migration beschrieben: „Adhere, Degrade and Move“ (Liotta 2016). Im Folgenden werden weitere Details der Migration dargestellt.

Es gibt drei Formen der Zellbewegung im Bindegewebe. Die erste Form ist das amöboide Gleiten, so bewegen sich einzelne Zellen wie z.B. Granulozyten und Lymphozyten durch Verformung ihres Zellkörpers in der ECM. Dabei gehen die Zellen nur wenige und gering affine Kontakte mit der ECM ein. Sie verändern ihre Zellform, wenn sie auf Hindernisse treffen. Die zweite Bewegungsform ist die mesenchymale Migration, die z.B. von Fibroblasten genutzt wird. Dabei erfolgt eine Adhäsion an Bestandteile des Bindegewebes, und die Übertragung dieser Bindung auf das Aktinzytoskelett führt zu starken Spannungen innerhalb der Zelle. Dieser mesenchymale Bewegungstyp ist nicht nur auf einzelne Zellen beschränkt, mehrere Zellen können sich dabei kettenförmig aneinanderreihen. Die dritte Migrationsform ist die kollektive Bewegung epithelialer Gewebeverbände. Solche Bewegungen finden während der Embryogenese statt oder bei der Umbildung der Brustdrüse zur Laktation. Karzinomzellen nutzen häufig diese Bewegungsform. Sie sind aber auch in der Lage, zwischen diesen drei Formen zu wechseln. Wenn die Adhäsionsmöglichkeit an ECM-Bestandteile blockiert ist, kann eine Tumorzelle von der mesenchymalen Bewegungsform in die amöboide wechseln, dafür ist die Adhäsion nicht notwendig (Wagner und Müller 2010c).

Für die Invasion und Metastasierung der Karzinomzellen spielt die so genannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eine Rolle. Bei diesem Prozess werden epitheliale Marker (z.B. E-Cadherin) herunterreguliert und mesenchymale Marker (z.B. Vimentin und glattmuskuläres Aktin) hochreguliert. Dadurch verlieren die Karzinomzellen den Zusammenhalt und nehmen einen mesenchymalen spindelförmigen Phänotyp an. Diese

Veränderung verleiht ihnen bessere Migrationseigenschaften und erlaubt ihnen auch die Blutgefäße zu invadieren (Böcker et al. 2012).

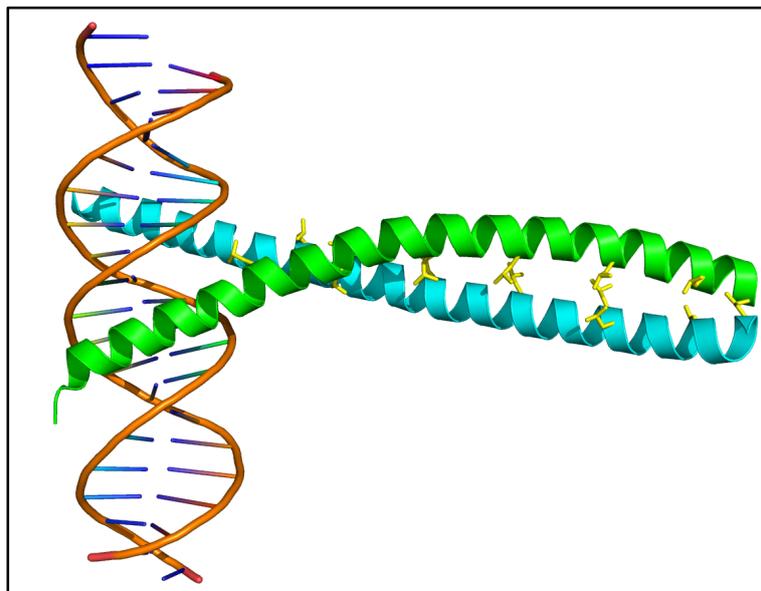
Um festzustellen, ob eine Fra-2-Überexpression eine solche Veränderung bei den epithelial aussehenden MCF-7-Mammakarzinom-Zellen hervorruft, wurde für diese Arbeit die Morphologie der stabilen Transfektanten untersucht. Um eine Veränderung im Migrationsverhalten der Zellen zu detektieren, wurden Migrationsassays durchgeführt.

1.3 Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie

Für jede Zelle im menschlichen Organismus nimmt die Genexpression eine zentrale Rolle in der Steuerung von Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung und programmiertem Zelltod ein. Mit der differenziellen Expression von Genen antwortet die Zelle auf externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone und chemische Stoffe und reagiert so auf ihre Umgebung. Diese Signale aktivieren membranständige oder zytoplasmatische Rezeptoren und lösen Signaltransduktionskaskaden aus, welche häufig in der veränderten Expression von Transkriptionsfaktoren enden. Die Transkriptionsfaktoren binden an spezifische DNA-Sequenzen oder treten in Kontakt mit dem RNA-Polymerase II-Transkriptionskomplex und aktivieren oder hemmen die Genexpression des jeweiligen Zielgens. Ein Beispiel sind die Transkriptionsfaktoren der AP-1 (**activating protein-1**)-Familie. Die für sie kodierenden Gene gehören zu den so genannten „immediate early genes“, welche nach Stimulus innerhalb weniger Minuten induziert werden (Karin 1995, Angel und Hess 2010). Die Transkription dieser Gene ist nur vorübergehend und endet bereits kurze Zeit nach der Stimulation.

Die AP-1-Aktivität wird einerseits durch veränderte Genexpression, andererseits durch posttranslationale Modifizierung, z.B. Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren durch MAPKs (mitogen activated protein kinases), reguliert (Angel und Karin 1991).

Der AP-1-Transkriptionskomplex setzt sich aus Proteinen der Fos-, Jun-, und ATF (**activating transcriptional factor**)-Subfamilien zusammen (Shaulian und Karin 2001, Karin und Hess 2010). Diese Proteine gehören zu den bZIP (**basic leucine zipper**)-Proteinen, die eine basische DNA-Bindungsdomäne und eine Leucin-Zipper-Region besitzen (Hai und Curran 1991). Mithilfe der Leucin-Zipper-Region bilden die AP-1- Mitglieder Homo- oder Hetero-Dimere. Die Dimer-Bildung ist Voraussetzung für die DNA-Bindung. Bei den bZIP-Proteinen lagern sich hydrophobe Leucine in einer hydrophilen Umgebung zusammen. Die jeweils nachfolgenden Leucine stehen nicht in einer geraden Linie, deswegen winden sich die Alpha-Helices der Proteine zu einer linksgängigen Super-Helix zusammen (Landschulz et al. 1988), (Abbildung 6).



Quelle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3A1FOS.png>

Abb. 6: Beispiel eines AP-1-Komplexes gebunden an DNA (braun). Der AP-1-Komplex besteht in diesem Fall aus c-Fos (cyan) und c-Jun (grün).

Neben der basischen DNA-Bindungs- und der Leucin-Zipper-Domäne haben AP-1-Proteine eine dritte funktionelle Domäne, die Transaktivierungsdomäne, die einen Kontakt zu der Transkriptionsmaschinerie der Zelle herstellt und damit einen Einfluss auf die Transkriptionsrate der AP-1-Zielgene hat (Angel und Karin 1991).

Durch die Dimer-Bildung ergibt sich eine große Vielfalt an AP-1-Komplexen, die verschiedene biologische Funktionen haben und unterschiedliche Zielgene regulieren (Karin et al. 1997). Die Dimere binden mit verschiedener Affinität an bestimmte DNA-Sequenzen, die TRE- (TPA responsive elements) (TPA=12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat, ein Tumorpromotor) oder CRE- (cAMP-responsive elements) Sequenz, welche in den Promotor- und Enhancer-Regionen vieler Zielgene enthalten sind (Hai und Curran 1991).

Viele der identifizierten Zielgene des AP-1-Komplexes sind nicht nur an physiologischen Prozessen der Zellen beteiligt, sondern spielen auch eine Rolle bei der Tumorprogression. In Mammakarzinomen wurden Korrelationen mit den AP-1-Faktoren bei Genen gefunden, die an einer verstärkten Proliferation (Cyclin D1, Rb, p16) oder an der erhöhten Invasivität (uPA, PAI-1, MMPs) von Tumorzellen beteiligt sind (Milde-Langosch et al. 2000, 2003).

Eine veränderte Zusammensetzung von AP-1-Mitgliedern wurde auch bei vielen Tumoren nachgewiesen. Erhöhte AP-1-Levels finden sich beim Mamma-, Endometrium-, und Kolonkarzinom, bei der akuten myeloischen Leukämie, beim Hodgkin-Lymphom und beim anaplastischen großzelligen Lymphom. Eine Down-Regulation der AP-1-Proteine wurde beim Ovarial- und Magenkarzinomen und bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie gefunden. Außerdem ist eine veränderte Expression der AP-1-Faktoren bei vielen Autoimmunerkrankungen vorhanden, z.B. bei der rheumatoiden Arthritis, bei der Psoriasis und beim systemischen Lupus erythematoses (Trop-Steinberg und Azar 2017).

Zu der Fos-Subfamilie der AP-1-Faktoren gehören c-Fos, FosB (und seine Spleißvarianten FosB2 und deltaFosB2), Fra-1 (Fos related Antigen-1) und Fra-2 (Fos related Antigen-2) (Milde-Langosch 2005). Die Jun-Familie besteht aus c-Jun, JunB und JunD, die ATF-Familie aus ATF2, LRF1/ATF3 und B-ATF. Zusätzlich können einige Maf-Proteine mit c-Fos und c-Jun und die JDP 1 (Jun dimerisation partner 1) und JDP 2 (Jun dimerisation partner 2) mit Jun-Proteinen Dimere bilden (Shaulian und Karin 2001, Angel und Hess 2010). In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Überexpression von Fra-2 auf

die Fos- und Jun-Proteine untersucht und deswegen werden diese hier näher betrachtet.

Die Jun-Proteine bilden Homodimere untereinander oder Heterodimere mit Fos-Proteinen. Aufgrund der elektrostatischen Eigenschaften ihres Leucin-Zippers ist es den Fos-Proteinen nicht möglich, Homodimere untereinander zu bilden, sie bilden Heterodimere mit den Jun-Proteinen. In vitro-Experimente haben gezeigt, dass die Jun/Fos-Heterodimere stabiler sind und höhere DNA-Bindungsaktivität haben als die Jun/Jun-Homodimere (Ryseck und Bravo 1991).

Fra-2 und auch Fra-1 unterliegen einer Autoregulation über TREs, welche sich in ihren eigenen Promotor- und Enhancer-Regionen befinden (Yoshida et al. 1993, Tulchinsky 2000). Deswegen war es für diese Arbeit interessant, ob eine erhöhte Fra-2-Expression zu einer veränderten Expression der anderen Fos- und der Jun-Proteine führt.

1.3.1 *Fra-2*

Der in dieser Arbeit untersuchte AP-1-Faktor Fra-2 wurde erstmals 1990 in Hühner-Fibroblasten beobachtet und beschrieben (Nishina et al.1990). Je nach Phosphorylierungszustand hat das Fra-2-Protein ein Molekulargewicht zwischen 40-46 kDa (Nishina et al.1990, Yoshida et al. 1991). Fra-2 und das ihm nah verwandte Fra-1 gehören zu den Fos-Proteinen, im Unterschied zu c-Fos oder FosB besitzen sie jedoch keine C-terminale transaktivierende Domäne (Tulchinsky 2000). Da Fra-2 nicht in der Lage ist (wie auch Fra-1), Hühner-Fibroblasten zu transformieren, postulierte man initial, dass Fra-2 und Fra-1 nicht zu einer Transkriptionsaktivierung fähig sind (Suzuki et al. 1991). Viele spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass die beiden Faktoren trotzdem eine Rolle bei der Aufrechterhaltung und dem Fortschreiten des transformierten Zustands spielen und sie in transformierten Zellen reichlich vorhanden sind (Mechta et al.1997, Tulchinsky 2000). Zhang und Kollegen fanden in einer Studie an kolorektalen Neoplasien eine Überexpression von Fra-2 in Karzinomen, aber viel seltener in Adenomen, die als Vorstufe der

Karzinome gelten. Dies ließ die Autoren vermuten, dass Überexpression von Fra-2 an der Tumorprogression in diesen Tumortypen beteiligt ist (Zhang et al. 2005).

In einem Karzinogenese-Modell an der Haut von Mäusen fanden Zoumpourlis et al. (2000) eine Korrelation von Fra-2 (und Fra-1) mit einem malignen Phänotyp. In anderen Untersuchungen an der murinen Adenokarzinom-Zelllinie CSML0 fanden sich bei einer Fra-2-Überexpression keine morphologischen Veränderungen der Zellen, keine Aktivierung der uPA/PAI-1/uPAR-Expression und keine Steigerung der Motilität der Zellen, wie dies bei Fra-1- und c-Fos-Überexpression der Fall war. Bei allen drei Faktoren fand sich aber eine erhöhte Expression von Osteopontin, CD44 und Thrombospondin-1, welche bei der Metastasierung eine Rolle spielen (Andersen et al. 2002, Tkach et al.2003). Eine Ausschaltung von Fra-2 und Fra-1 mit Fra-2- und Fra-1-siRNA in den fibroblastoiden L929-Zellen führte aber zu einer deutlichen Reduktion der Zellmotilität, sowohl bei Fra-2 als auch bei Fra-1 (Tkach et al.2003).

In Untersuchungen an Mamma-Karzinomen und Mammakarzinom-Zelllinien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Fra-2 im normalen Mamma-Gewebe gar nicht oder nur schwach exprimiert war, während bei 70% der untersuchten Mamma-Karzinomen und bei zwei Mammakarzinom-Zelllinien (MDA-MB 231 und HBL-100) sich eine moderate oder starke Fra-2-Expression zeigte (Bamberger et al. 1999). Bei einer weiteren Studie wurde eine Korrelation zwischen Fra-2-Expression und Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 und Cyclin E nachgewiesen, was einen die Proliferation stimulierenden Effekt vermuten lässt (Milde-Langosch et al. 2000). In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe wurde in Mammakarzinom-Tumormaterial eine Korrelation von erhöhter Fra-2-Expression mit erhöhten Proteinmengen von MMP-1, MMP-9 und PAI-1 gefunden, wobei MMP-9 und PAI-1 als ungünstige Parameter beim Mamma-Karzinom gelten. Äußerst interessant und auch statistisch signifikant war die Korrelation von Rezidiv-Neigung und Fra-2-Expression. Fast alle Patientinnen, die im Beobachtungszeitraum einen Rezidiv erlitten, zeigten eine deutlich erhöhte Fra-2-Expression (Milde-Langosch et al. 2004).

In einem experimentellen Modell mit transienten Transfektionen an Mammakarzinom-Zelllinien (MCF-7 und MDA-MB 231) zeigte sich für Fra-2 keine (MCF-7) oder nur geringe Steigerung (MDA-MB231) der Invasivität im Vergleich zu Fra-1, welches zu deutlicher Steigerung der Invasivität führte. Bei Fra-2 überexprimierenden Zellen wurden keine morphologischen Veränderungen beobachtet, es wurde aber eine Hochregulation von PAI-1 gefunden (die auch bei Fra-1- und c-Fos-Überexpression vorhanden war). Weiterhin zeigten sich bei den Fra-2-transfizierten MCF-7 erhöhte c-Jun- und Jun-B-Proteinlevel (Milde-Langosch et al. 2004).

In einer Studie, die Mammakarzinome mit benachbartem gesunden Gewebe verglich, fanden Kharman-Biz et. al eine signifikant höhere Expression von Fra-2 (und auch von Fra-1, Jun-B und Jun-D) im Tumorgewebe als im normalen Mamma-Gewebe. Es war sogar möglich, Tumorgewebe vom Normalgewebe anhand der Fra-2-Expression zu unterscheiden, wobei aber diese Eigenschaft für JunB und JunD stärker ausgeprägt war (Kharman-Biz et. al 2013).

1.4 Ziel und Fragestellungen der Arbeit

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und anderer Autoren weisen darauf hin, dass der AP-1-Transkriptionsfaktor Fra-2 eine wichtige Rolle bei der Progression und Invasion von malignen Neoplasien besitzt, insbesondere beim Mammakarzinom. Das experimentelle Modell der transienten Transfektionen, das in unserer Arbeitsgruppe verwendet wurde, war nur begrenzt geeignet, um die Funktion von Fra-2 eingehend zu analysieren, da der Prozentsatz überexprimierender Zellen nach Transfektion sehr gering ist und die Effekte des transfizierten Proteins somit nicht eindeutig untersucht werden können.

Um die Rolle des AP-1-Faktors Fra-2 in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit zunächst eine stabil transfizierte Zelllinie etabliert werden, bei der alle Zellen dauerhaft Fra-2 überexprimieren. Durch ein FLAG-Epitop (siehe 2.1.2) sollte die Überexpression von

transfizierterem Fra-2 im Western Blot nachgewiesen und von endogenem Fra-2 unterschieden werden. An den so gewonnenen Zellklonen sollten folgende Fragestellungen im Vergleich zur Ausgangszelllinie überprüft werden:

- Welche Auswirkungen hat eine Überexpression von Fra-2 auf die Morphologie, das Proliferationsverhalten, die Invasivität und die Migrationsfähigkeit der MCF-7-Zellen?
- Welche Auswirkungen hat eine Überexpression von Fra-2 auf die Expression von Zielgenen? Führt sie zu einer veränderten Expression der anderen AP-Proteinen der Fos- (c-Fos, FosB und Fra-1) und der Jun-Gruppe (JunB, c-Jun, JunD)? Führt sie zu einer veränderten Expression von Regulatoren des Zellzyklus (CyclinA, Cyclin B, Cyclin D1, Cyclin E, Rb und Rb2)? Führt sie zu einer veränderten Expression von an der Invasion beteiligten Faktoren (PAI-1, uPAR, MMP-1 und MMP-3)?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Für diese Arbeit wurde die Zelllinie MCF-7 (HTB 22, ATCC Rockville, USA) verwendet. Diese Zellen wurden von Soule et al. 1973 aus einem malignen Pleura-Erguss bei Mammakarzinom einer 69-jährigen Frau isoliert und beschrieben. Es handelt sich dabei um humane Adenokarzinom-Zellen der Mamma, die epithelartig und adhärent als Monolayer auf Zellkultur-Gefäßen wachsen. Die MCF-7-Zellen besitzen Rezeptoren für Östrogen und Progesteron, zeigen geringe Invasivität und niedrige Expression von Fra-2.

2.1.2 Plasmide

Für die Transfektion wurden die in der Tabelle 3 aufgeführten Vektoren verwendet.

Tab. 3: Verwendete Vektoren

Plasmide	Eigenschaften	Quelle
pIRES-P	Bicistronischer Expressionsvektor mit Puromycin-Resistenz	freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr.rer.nat. Volker Assmann (Institut für Tumorbologie, UKE) Genbanknummer: Z75185
Fra-2-FLAG-pIRES-P	Expressionsvektor für Fra-2 mit FLAG-Epitop und Puromycin-Resistenz	Milde-Langosch und Bamberger 2004 (damals Institut für Gynäkopathologie, UKE)

Der Leervektor pIRES-P wurde für die Negativkontrolle verwendet.

Das Plasmid Fra-2-FLAG-pIRES-P wurde durch Einklonieren der vollständigen für Fra-2 kodierenden cDNA-Sequenz an den Schnittstellen Nhe1 und EcoR1 erstellt, und diese wurde durch Sequenzierung bestätigt (Milde-Langosch et al. 2008).

2.1.3 Antikörper

Die in der Tabelle 4 aufgeführten Antikörper wurden für die Western-Blot-Analysen verwendet.

Tab. 4: Verwendete Antikörper

Antikörper gegen	Spezies	Vertrieb
Actin (I-19), sc-1616	goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
c-fos (4), sc-52	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Cyclin A (H-432), sc-751	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Cyclin B (18)	mouse	BD Biosciences, Heidelberg
Cyclin D1 (R-124), sc-6281	mouse	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Cyclin E (Ab-3)	rabbit	Oncogene, Boston, MA, USA
FLAG M2, F 3165	mouse	Sigma Aldrich, USA
FosB (102), sc-48	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Fra-1 (R-20), sc-605	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Fra-2 (Q-20), sc-604	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
goat IgG-HRP-conjugated, sc-2020	donkey	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
jun B (210), sc-73	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
jun D (329), sc-73	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
MMP-1 (Ab-6)	mouse	Oncogene, Boston, MA, USA
MMP-3 (Ab-2)	mouse	Oncogene, Boston, MA, USA
mouse IgG-HPR-conjugated, sc-2005	goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
p-c-jun (KM-1), sc-822	mouse	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PAI-1 (Ab-1),	mouse	Oncogene, Boston, MA, USA
rabbit IgG-HRP-conjugated, sc-2004	goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rb (554136)	mouse	BD Biosciences, Heidelberg
Rb 2/p-130 (C-20), sc-317	rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
uPAR (N-19), sc-9793	goat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.4 Reagenzien

Es wurden die in der Tabelle 5 aufgeführten Reagenzien verwendet.

Tab. 5: Verwendete Reagenzien

Reagenzien	Vertrieb
Aceton	Sigma Aldrich, Seelze
Acrylamid/bis-Acrylamid	Qbiogene, Heidelberg
Blotting-Grad Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Bromphenolblau	Sigma, St.Loious, MO, USA
DMEM (Dulbecco´s Modified Essential Medium)	Gibco, Paisley, UK
DPBS (Dulbecco´s Phosphate-Buffered Saline)	Gibco, Paisley, UK
Eosin-G-Lösung	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS (foetal calf serum)	Gibco, Paisley, UK
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt
Insulin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Gibco, Paisley, UK
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Baker, Deventer, Holland
Nutrient Mixture HAM F12	Sigma, St.Loious, MO, USA
PBS (phosphat buffered saline)	Gibco, Paisley, UK
Penicillin/ Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
Puromycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Rainbow Coloured Molecular Weight Marker	Amersham Biosciences, Freiburg
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure 25%	Sigma Aldrich, Seelze
SDS (Soduimdodezylsulfat)	Sigma Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Thimerosal	Sigma Aldrich, Steinheim
Tricine	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley, UK
Tween 20 (Polysorbat 20)	Merck, Darmstadt
Xylol	SDS, Peypin, Frankreich

2.1.5 Fertigkits

Um bessere Standardisierung bei verschiedenen Experimenten zu erreichen, wurden kommerziell erhältliche Fertigkits benutzt. Diese sind in der folgenden Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Verwendete Fertigkits

Kit-Bezeichnung	Hersteller
BCA-Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Biocoat Control Inserts	BD, Bedford, MA, USA
Biocoat Matrigel Invasion chambers	BD, Bedford, MA, USA
Cell Proliferation Kit (MTT)	Roche, Mannheim
Diff-Quick Färbeset	Dade Behring, Marburg
LipofektAMINE PLUS Reagent	Gibco, Paisley, UK
Reblot Mild Solution	Chemicon International, Temescula, CA, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Es wurden die in der Tabelle 7 aufgeführten Verbrauchsmaterialien verwendet.

Tab. 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Vertrieb
Gel Blotting Papier	Whatman, Dassel
Hyperfilm ECL Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Freiburg
Immobilon-PVDF Transfer Membran	Merck Millipore, Darmstadt
Küvetten	Müller Ratiolab, Dreieich
Objekträger	Süsse Labortechnik, Gudensberg
Parafilm	American National Can, Greenwich, CT, USA
Roentoroll 25 Röntgenentwickler	Tenetal, Norderstedt
Superfix 25 Röntgen-Fixierlösung	Tenetal, Norderstedt
Wattestäbchen	Beese, Barsbüttel

Kunststoff-Artikel zur Einmalverwendung wie Zellkultur-Platten und -Flaschen, Zellkammer-Objektträger, Zellschaber, Reagenzgefäße und Pipetten-Spitzen wurden von verschiedenen Herstellern wie Becton & Dickinson (Heidelberg), Sarstedt (Nürnberg), Eppendorf (Hamburg) und Nunc (Roskilde, Dänemark) bezogen und werden nicht im Einzelnen aufgelistet.

2.1.7 Geräte und wiederverwendbare Artikel

Es wurden die in der folgenden Tabelle 8 aufgeführten Geräte und wiederverwendbaren Artikel genutzt.

Tab. 8: Verwendete Geräte und wiederverwendbare Artikel

Gerät/Artikel	Hersteller
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Blottingkammer Hoefer Transfor Unit TE 42	Amersham Biosciences, Freiburg
Densitometer GS700	BioRad, München
Elektrophoresekammer mit Zubehör	Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
Elektrophoresis Power Supply EPS600	Amersham Biosciences, Freiburg
Elisa-Reader SF Plus	SLT-Labinstruments, Crailsheim
Gelgießapparatur Hoefer SE 600 Vertikal Slab	Amersham Biosciences, Freiburg
Inkubator HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Magnetrührer RO5	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskope	Hund, Wetzlar Leitz, Wetzlar Zeiss, Göttingen
pH-Meter CG 820	Schott Geräte, Hofheim a.Ts.
Röntgenfilm-Entwicklungsgerät Optimax X-Ray Film Processor	Protec, Obestfeldt
Röntgenfilm-Kassette	BioTech Trade&Service, St.Leon-Rot
Schüttler Certomat TC3	B.Braun, Melsungen
Thermocycler	Appligene Oncor, Heidelberg
Varioclav Dampfsterilisator 400E	H+P Labortechnik, München
Vortex	Janke & Kunkel, Staufen
Waagen PJ300 und AE100	Mettler, Giessen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Sterile Werkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau
Zentrifugen Biofuge 13, Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeiten mit den lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank durchgeführt. Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und unter wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂-Beimischung in Kultur gehalten. Für die Ausgangszelllinie MCF-7 wurde für das Medium Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) im Verhältnis 1:1 mit HAM F12 Nutrient Mixture gemischt und mit folgenden Zusätzen versehen:

Kulturmedium MCF-7:

Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) / HAM F12 Nutrient Mixture mit:

Fötale Kälberserum (FCS) 10%

L-Glutamin 1%

Penicillin / Streptomycin 1%

Insulin 0,1%

Für die transfizierten Zellen wurde zusätzlich Puromycin in einer Konzentration von 1µg/ml zum o.g. Medium hinzugefügt.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 oder 75 cm²) oder bei verschiedenen Versuchen in Zellkulturschalen (6-, 12-, 96-well-plates) kultiviert.

Bei Erreichen einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen mit vorgewärmtem PBS (37°C) gewaschen, mit Trypsin/EDTA bedeckt, zwei Minuten bis zum Ablösen von der Flasche inkubiert, in frisches Medium aufgenommen und anschließend in verschiedener Verdünnung in zwei neue Flaschen überführt.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl für die verschiedenen Experimente erfolgte mit Hilfe einer Zählkammer nach Fuchs/Rosenthal (16 Großquadrate mit 1mm Seitenlänge und eine Kammerhöhe von 0,2mm). Die in Suspension befindlichen Zellen, deren Zellzahl bestimmt werden sollte, wurden vorsichtig durch Resuspendieren mit einer Pipette vereinzelt. Ca. 20µl der Zellsuspension wurden auf die Zählkammer gegeben. Es wurde ein Deckgläschen auf die befeuchteten Träger der Kammer gesetzt. Dadurch ergab sich zwischen den eingravierten Linien ein definiertes Volumen, in dem die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop bestimmt werden konnte. Es wurden 3 Großquadrate ausgezählt, ein Mittelwert gebildet und mit dem Faktor 5000 multipliziert, was die Zellzahl pro Milliliter ergab.

2.2.1.3 Stabile Transfektion und Gewinnung von Klonen

Für die Transfektion wurde die Methode der Lipofektion gewählt. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Liposomen zunutze, mit der Zellmembran (Phospholipid-Doppelschicht) leicht verschmelzen zu können. Die Lipide bilden dabei im ersten Schritt mit der zu transfizierenden DNA Komplexe, die anschließend in die Zelle aufgenommen werden.

Für die Transfektion wurde initial der Expressionsvektor pcDNA3.1+ (Invitrogen, Karlsruhe) mit einklonierter Fra2-cDNA-Sequenz verwendet. Damit ließ sich keine dauerhafte Fra-2-Überexpression in den MCF-7-Zellen erzielen, deswegen wird das verwendete Protokoll für diese Experimente hier nicht weiter beschrieben. Für diese Arbeit wurde danach der bicistronische pIRES-P Expressionsvektor (Genbank Nr. Z75185) ausgesucht. In diesen wurde die vollständige kodierende Sequenz für Fra-2 mit einem C-terminalen FLAG-Epitop mit Hilfe der Restriktionsenzyme NheI und EcoR1 einkloniert

(Milde-Langosch et al. 2008). Das so konstruierte Plasmid Fra-2-FLAG-pIRES-P wird im folgenden einfachheitshalber Fra-2-pIRES-P genannt.

Bei diesem Vektor wird die Puromycin-Resistenz über den gleichen CMV (Cytomegalievirus)-Promotor wie die Fra-2 Expression reguliert. Dadurch ist gesichert, dass Puromycin-resistente Zellen gleichzeitig Fra-2 exprimieren. Durch das FLAG-Epitop kann der transfizierte Fra-2 Transkriptionsfaktor auf Proteinebene (Western Blot) in Vergleich zum zelleigenen Fra-2 sichtbar gemacht werden.

Es wurden für die Untersuchungen MCF-7-Zellen mit Fra-2-pIRES-P und mit dem leeren Plasmid pIRES-P als Negativkontrolle transfiziert. Von den mit Fra-2-pIRES-P transfizierten Zellen wurden Klone wie unten beschrieben gewonnen, einer davon (MCF-7-pFra-2/T6) wurde weiter untersucht. Die übrigen mit Fra-2-pIRES-P transfizierten Zellen wurden als „pool“ weiter kultiviert und untersucht. Die mit Leervektor transfizierten Kontroll-Zellen MCF-p wurden nicht vereinzelt und als „batch“ weiter kultiviert.

Alle transfizierten Zellen wurden mit Puromycin wie unten beschrieben selektiert. Die so etablierten stabil transfizierten Zellen wurden dauerhaft mit Puromycin kultiviert, um eine Down-Regulation der Fra-2 Expression durch fehlenden Selektionsdruck in Abwesenheit vom Antibiotikum zu verhindern.

2.2.1.3.1 Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, von der Zellkulturflasche mit Trypsin/EDTA abgelöst und im frischen Medium aufgenommen. Danach wurde die Zellzahl pro ml bestimmt wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Die Zellsuspension wurde so verdünnt, dass für die Transfektion eine Konzentration von 200 000 Zellen/ 1ml eingestellt wurde. Von dieser Suspension wurden 2ml, also 400 000 Zellen in ein Well einer 6-well-Platte gegeben und 24h inkubiert.

Für die Transfektion wurde das LipofectAMINE PLUS² Reagent-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Für bessere Transfektionsergebnisse wurde während der ersten drei Stunden der Transfektion Basalmedium

(DMEM und F-12 HAM im Verhältnis 1:1) ohne FCS und Antibiotika verwendet.

Für jedes Well der 6-well-Platte wurden folgende Ansätze in Reaktionsgefäßen vorbereitet:

Plasmid-Ansatz:

100µl Basalmedium

1µl Plasmid-DNA (entspricht 1µg)

6µl PLUS® Reagent

Lipofectamin-Ansatz:

100µl Basalmedium

4µl LIPOFECTAMIN® Reagent

Zuerst wurde der Plasmid-Ansatz vorbereitet, auf dem Whirlmix gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde der Lipofectamin-Ansatz vorbereitet und nach der Inkubationszeit zum Plasmid-Ansatz hinzu pipettiert. Es wurde erneut gemischt und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen in der 6-well-plate hatten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 80-90%. Sie wurden mit PBS und danach mit dem Basalmedium gewaschen. Pro well wurden 0,8 ml Basalmedium und die DNA/Lipofectamin-Komplexe gegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 3 Stunden im Inkubator (37°C, 5% CO₂).

Währenddessen wurde Basalmedium mit FCS versetzt, so dass sich eine FCS-Konzentration von 20% ergab. Nach der dreistündigen Inkubation wurde pro Well 1 ml von dem so vorbereiteten Medium gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 10% FCS ergab.

Nach 24h wurde auf das übliche Medium für diese Zellen gewechselt, nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden.

Die Zellen wurden weiter kultiviert und am Folgetag in größere Gefäße überführt.

2.2.1.3.2 Selektion mit Antibiotikum

Bei dem Ausplattieren für die Transfektion wurden auch Wells mit MCF-7-Zellen mit der gleichen Konzentration (400 000 Zellen/ 2ml) vorbereitet, die keine Transfektion erhielten. Diese dienten zur Kontrolle bei der Selektion.

Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde die Selektion mit dem Antibiotikum begonnen. Dafür wurde das Medium der transfizierten und nicht-transfizierten MCF-7-Zellen mit dem Selektionsantibiotikum Puromycin in einer Konzentration von initial 2µg/ml versetzt. Nach 13 Tagen wurde die Konzentration auf 1µg/ml reduziert.

Nach 53 Tagen Kultivierung mit dem Antibiotikum waren die nicht transfizierten MCF-7-Zellen komplett abgestorben. Dies wurde so gewertet, dass die noch unter Antibiotikum lebenden Zellen zu 100% Puromycin-resistent waren und somit vermutlich das Plasmid stabil in ihrem Genom integriert hatten.

Zu diesem Zeitpunkt wurden von den transfizierten Zellen Proteine geerntet und es erfolgte eine Kontrolle der Fra-2-Expression im Western-Blot.

2.2.1.3.3 Gewinnung von Zellklonen

Zur Gewinnung von einzelnen stabil transfizierten Zellklonen, die Fra-2 überexprimieren, wurde die Methode des „Pickens“ verwendet. Einundvierzig Tage nach erfolgter Transfektion wurden in 6-well-Plates unter dem Mikroskop einzelne Kolonien der transfizierten Zellen ausgesucht und auf der Unterseite der Platte markiert. Das Medium wurde abgesaugt und auf die markierten Kolonien ein mit Trypsin/EDTA getränktes Stückchen steriles Filterpapier aufgelegt. Es wurde fünfzehn Minuten inkubiert und die Stückchen in frischem Medium (mit Puromycin 1µg/ml) in die Wells einer 96-well-Platte gelegt. Nach 2 Tagen wurden die Papierstückchen entfernt und die in dem Well befindlichen Zellen weiter kultiviert.

2.2.1.4 Kammer-Objektträger und Hämalaun-Eosin-Färbung

Um die Morphologie der mit Fra-2 stabil transfizierten Zellen mit der Ausgangszelllinie und den mit dem Leervektor transfizierten Zellen zu vergleichen, wurden die Zellen auf spezielle Kultivierungskammer-Objektträger (Culture Slides, Becton Dickinson Labware, Heidelberg) aufgetragen. Sie bestehen aus einem Glas-Objektträger mit fixiertem Kammeraufsatz aus Kunststoff. Das erlaubt die Kultivierung von lebenden Zellen auf den Objektträgern. Danach können die Kammeraufsätze entfernt werden und die Zellen auf den Objektträgern nach Anfärben mikroskopisch beurteilt werden.

Es wurden Objektträger mit zwei Kammern verwendet. Zuerst wurden die kultivierten Zellen mit PBS gewaschen, von der Zellkulturflasche mit Trypsin/EDTA abgelöst und im frischen Medium aufgenommen. Danach wurde wie oben beschrieben die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension so verdünnt, dass pro Kammer des Objektträgers 100 000 Zellen in 2ml Medium aufgetragen wurden. Die Zellen wurden 48 Stunden unter den für die Zellen üblichen Inkubationsbedingungen im Inkubator kultiviert. Danach wurden sie mit PBS gewaschen und zur Fixierung zunächst 10 Minuten in einem Gemisch aus Methanol und Aceton (Verhältnis 2:1) in Glasschalen gelegt. Nach sorgfältigem Abtropfen des o.g. Gemisches von den Objektträgern wurden diese weitere 10 Minuten in Ethanol fixiert. Daraufhin wurden die Kunststoff-Aufsätze von den Objektträgern gelöst und die Objektträger für 20 Minuten an der Luft getrocknet. Die so vorbereiteten Objektträger wurden bei -80°C gelagert.

Zur Beurteilung der Zell-Morphologie wurden die Objektträger einer Hämalaun-Eosin-Färbung unterzogen. Bei dieser Färbung handelt es sich um eine kombinierte Kern- und Plasmafärbung. Hämalaun führt zu einer blauen Kernfärbung und Eosin zu einer roten Plasmafärbung.

Die Objektträger wurden für die Färbung eine Minute aufgetaut und drei Minuten in Hämalaun inkubiert. Danach wurden sie drei Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert und anschließend drei Mal kurz in Eosin eingetaucht. Danach wurde erneut gewässert, die Objektträger in einer

aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 96% 100% Ethanol) und anschließend in Xylol getaucht. Nach Trocknung wurden die Objektträger mit Hilfe von Eukitt und Deckgläschen eingedeckelt und konnten mikroskopiert werden.

2.2.1.5 Proliferationsassay

2.2.1.5.1 Prinzip

Lebende Zellen haben die Fähigkeit, Tetrazolium-Salze wie beispielsweise das gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid) in violettfarbene Formazan-Kristalle umzuwandeln. Diese Kristalle können durch eine Solubilisationslösung wasserlöslich gemacht werden und die Lichtabsorption der so entstandenen Lösung bei einer Wellenlänge von 592nm in einem ELISA-Reader gemessen werden. Wenn MTT zu verschiedenen Zeitpunkten zu Zellen gegeben wird, die in gleicher Anzahl ausplattiert wurden, kann so anhand der Violett-Färbung die Proliferation quantitativ im Zeitverlauf untersucht werden. Für diese Experimente wurde das Cell Proliferation Kit (MTT) von Firma Roche (Mannheim) verwendet.

2.2.1.5.2 Durchführung

Es wurden in drei 96-well-plates identische Ansätze vorbereitet. Für das Experiment wurden nur 12 Wells einer solchen Platte benötigt. In jedem Ansatz wurden die zu vergleichenden Zellen in drei Wells (Dreifachbestimmung) mit einer Konzentration von 5000 Zellen/100µl Nährmedium gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation wurden zu den Zellen der ersten Platte in jedes Well 10µl vom MTT-Reagenz hinzugefügt. Vier Stunden später wurden 100µl der Solubilisationslösung dazu gegeben, um die Formazan-Kristalle wasserlöslich zu machen. Die spektrometrische Bestimmung des Farbstoffs erfolgte am nächsten Morgen mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 592 nm. Das gleiche Procedere wurde bei

der zweiten und dritten Platte angewendet, dies im Abstand von jeweils weiteren 24h. Damit war es möglich, die Proliferation der Zellen im Zeitverlauf zu drei Zeitpunkten (24h, 48h und 72h) zu bestimmen und zu vergleichen.

Dieser Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die Daten wurden graphisch aufgetragen und statistisch analysiert. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests bestimmt.

2.2.1.6 Invasions- und Migrationsassay

2.2.1.6.1 Prinzip

Das Prinzip dieser in-vitro Methode wurde von Albini et al. 1987 als „Boyden chamber assay“ beschrieben. In diesem Assay können nur invasive Tumorzellen eine der Basalmembran ähnelnde künstliche Membran durchwandern.

Zur Bestimmung des Invasions- und Migrationspotentials der stabil transfizierten Zellen wurde das Invasionsassay verwendet (BD Biocoat Matrigel™ Invasion Chamber und BD Biocoat™ Control Inserts). Dabei wurden zur Beurteilung der Invasivität die Matrigel™-Inserts, zur Beurteilung der Migrationsfähigkeit die Control™-Insert genutzt. Im Folgenden werden diese als Matrigel-Inserts und Control-Inserts bezeichnet.

Der Boden der Control-Inserts besteht aus einer runden PET (Polyethylenterephthalat)-Membran, welche Poren von 8µm Durchmesser besitzt. Diese Membran ist bei den Matrigel-Inserts zusätzlich mit einer so genannten Matrigel Basement Membran beschichtet. Diese besteht aus gelösten Basalmembran-Bestandteilen, die aus Engelbrecht-Holm-Swarm-Sarkomen der Maus extrahiert wurden. Sie enthält Laminin, Kollagen Typ IV, Heparansulfat-Proteoglycane, Entactin und verschiedene Wachstumsfaktoren und dient als in-vitro-Äquivalent einer Basalmembran. Sie verschließt die Poren der PET-Membran und verhindert das Durchwandern von nicht

invasiven Zellen. Zellen mit invasivem Potenzial können dagegen die Matrigel-Membran lokal degradieren und hindurchwandern.

Das Durchwandern der Zellen durch die Poren der Control-Insert ohne weitere Beschichtung wurde als Maß für ihre Migrationsfähigkeit bewertet.

2.2.1.6.2 Durchführung

Der Versuch wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Matrigel-Kammer wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert (davor Lagerung bei -20°C). Daraufhin wurden 12 der 24 Wells der Kammer mit 500 µl eines Basalmediums befüllt, bestehend aus gleichen Teilen DMEM und Nutrient Mixture F-12 HAM. Die Matrigel-Inserts wurden in die befüllten Wells gestellt und selbst mit 500µl Basalmedium befüllt. Die Kammer wurde daraufhin in dem Inkubator (37°C, 5% CO₂) für 2 Stunden rehydriert, in dieser Zeit und unter diesen Bedingungen geliert die Matrigel-Membran. In der Zwischenzeit wurden die Zellen aus der Kultur geerntet, ausgezählt und in Nährmedium aufgenommen. Es wurden für jedes Insert jeweils 100 000 Zellen in 500µl Medium vorbereitet. Die 12 Control-Inserts wurden aus der Lagerung bei -20°C genommen. Diese bedürfen keine Rehydrierung.

Nach der Rehydrierung der Matrigel-Inserts wurde das Basalmedium aus den Wells der Kammer und aus den Inserts abgesaugt. Es wurden jetzt in alle 24 Wells jeweils 750 µl Nährmedium gegeben. Die 12 Matrigel- und die 12 Control-Inserts wurden in die Wells eingesetzt. Es wurden je 3 Matrigel-Inserts und je 3 Control-Inserts pro Zellart mit den vorbereiteten 500 µl Zellsuspension befüllt. Die Kammer wurde für 48 Stunden in den Inkubator verbracht. Danach wurde die Kammer aus dem Inkubator genommen, das Medium aus den Inserts entfernt und die nicht durchgewanderten Zellen auf der Oberseite der Membranen mit einem Wattestäbchen entfernt (Abbildung 7).

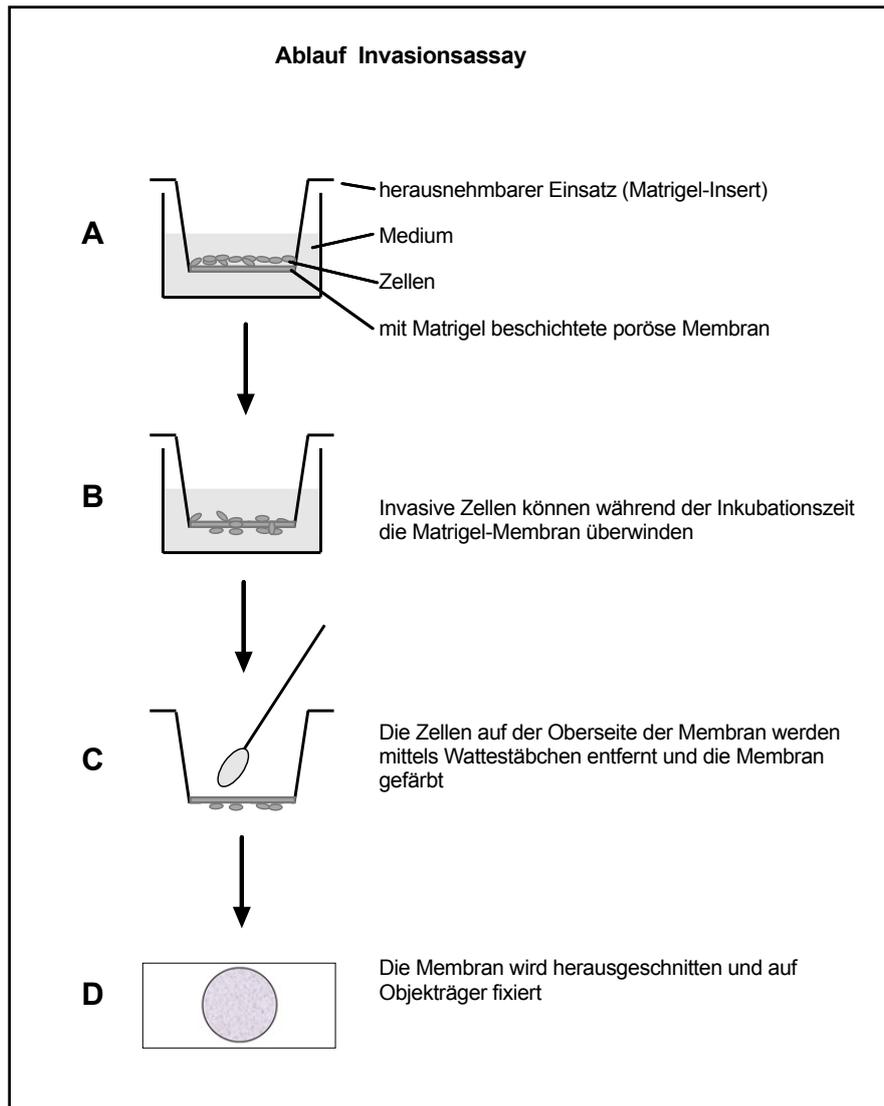


Abb. 7: Vereinfachter schematischer Ablauf vom Invasionsassay

Die Inserts wurden mit Hilfe des Diff-Quick Färbesets (Dade Behring) zuerst fixiert, in Eosin und Thiazin gefärbt und in drei Reihen Aqua dest. gespült. Die Zeit pro Lösung betrug 2 1/2 Minuten. Die Inserts wurden in der Folge 30 Minuten an der Luft getrocknet. Daraufhin wurden die Membranen mit Hilfe eines Skalpells vom Insert abgelöst, auf Objektträgern mit Eukitt fixiert, mit Deckgläschen abgedeckt und 20 Minuten im Trockenschrank getrocknet.

2.2.1.6.3 Auswertung

Unter dem Mikroskop mit einem Zählkular wurden pro Membran (= Objektträger) sieben Gesichtsfelder ausgezählt. Das entsprach einem großen Teil der Fläche der Membran ohne den Rand. Es wurde aus den sieben

ausgezählten Gesichtsfeldern eine Summe gebildet. Pro Assay wurde eine Dreifachbestimmung für jede Zellart durchgeführt. Dieser Versuch wurde drei Mal wiederholt. Für die Auswertung wurden die Mittelwerte aus den drei Versuchen verwendet, dabei wurden die durch die Matrigel-Membran invadierten (Invasionsassay) und die durch die Porenmembran gewanderten (Migrationsassay) MCF-7-pFra-2/pool und Klon MCF-7-pFra-2/T6 in Verhältnis zu den Zellen der Negativkontrolle gesetzt.

Eine statistische Analyse der Signifikanz der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des t-Tests, wobei nur Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant gewertet wurden.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinextraktion aus Zellen

Für die Proteinisolierung aus den Zellen wurden diese zuerst mit PBS-Puffer gewaschen. Auf die Zellen wurde eisgekühlter pcsb1-Lysepuffer gegeben und die Zellkulturflasche bzw. die 6-well-Platte auf Eis gestellt, um die Proteine vor Abbau durch Proteasen zu schützen. Die Zelllysate wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Sie wurden in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und durch Resuspendieren mit der Pipette homogenisiert.

Lysepuffer pcsb1:

50 mM Tris-HCl (pH 6,8)

10 % Saccharose

1 % SDS

Es wurden je nach Zellkulturgefäß und Konfluenz die in der folgenden Tabelle 9 aufgeführte Mengen pcsb1 verwendet.

Tab. 9: pcsb1 Lysepuffer-Mengen bei verschiedenen Konfluenzen und Gefäßgrößen

Kulturgefäß	Konfluenz	Menge pcsb-1
25 cm ² -Flaschen	90 - 100 %	1 ml
1 well der 6-well-Platte	90 - 100 %	300 µl
1 well der 6-well-Platte	80 – 90 %	200 µl
1 well der 6-well-Platte	70 – 80 %	150 µl

Die so gewonnenen Proben wurden bis zu der weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration aus den Zelllysaten ermöglicht das Erstellen von Proben mit gleicher Gesamtproteinmenge, um im Western Blot ausgewählte Proteine in den untersuchten Zellen vergleichen zu können.

Diese Bestimmung erfolgte spektrophotometrisch. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass Proteine im alkalischen Milieu zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer reduzieren. Nach Zugabe von einem chromogenen Reagenz fällt das reduzierte Kupfer als farbiger Komplex aus. Die mit Hilfe des Photometers ermittelte Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Für diese Bestimmung wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce) verwendet, bei welchem Bicinchoninsäure mit den reduzierten Kupfer-Ionen zur Bildung eines blauvioletten Komplexes führt. Zuerst wurden aus der BSA-Stammlösung des Kits Eichlösungen mit Konzentrationen vom 25 - 1000 µg/ml durch Verdünnung mit pcsb1 erstellt. Die zu untersuchenden Proteinextrakte wurden 1:11 verdünnt (11µl Probe und 109µl pcsb1). Alle Lösungen wurden auf Eis gestellt.

Die verdünnten Proteinproben und die Eichlösungen wurden in doppelter Ausführung vorbereitet, um durch Zweifachbestimmung und Errechnen des Mittelwertes größere Genauigkeit zu erreichen.

Zusätzlich wurde pcsb1-Puffer zur Bestimmung des Leerwertes vorbereitet, sowie auch Aqua dest. für die Nullpunkteinstellung des Spektrophotometers.

Die im Kit enthaltenen Lösungen A und B wurden 50:1 gemischt, so dass die Gesamtmenge für alle Proben ausreichte. Zu allen Proben, Eichlösungen, pcsb1-Puffer und Aqua dest. wurde 1ml dieser Farbkomplex-bildenden Lösung beigemischt. Es erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Danach erfolgte die Absorptionsmessung am Photometer bei einer Wellenlänge von 562nm. Aus der Messung der Eichlösungen wurde eine Eichkurve erstellt. Anhand dieser konnten die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

2.2.2.3 Western Blot – Verfahren

Das Western Blot-Verfahren dient zum Nachweis eines gesuchten Proteins in einem Proteingemisch. Zuerst werden die Proteine mittels Gelelektrophorese in einzelne Banden aufgetrennt. Im nächsten Schritt werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine feste Membran übertragen, das so genannte „Blotting“. Auf dieser Membran können die Proteine mit einem spezifischen Antikörper reagieren. In einem nächsten Schritt können die Primär-Antikörper mit einem Enzym-gekoppelten Sekundär-Antikörper sichtbar gemacht werden.

Für diese Arbeit erfolgte die Auftrennung der Proteingemische mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergens, welches in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol und Hitze zur Denaturierung der Proteine führt. Es lagert sich den Proteinen an und verdeckt deren Ladung. So werden sie in ihre Primärstruktur überführt (Polypeptid-Ketten) und können abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell im elektrischen Feld im Gel wandern. Je nach Molekulargewicht des gesuchten Proteins wurden Gele mit verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen gewählt, da je nach Konzentration des Acrylamids diese Gele verschiedene Porengrößen aufweisen.

Anschließend wurden die getrennten Proteine auf eine haltbare Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern überschichtet. Im einem weiteren Schritt wurden diese mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion auf Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte dieses Verfahrens näher beschrieben.

2.2.2.3.1 Probenaufbereitung

Die bei -80° gelagerten Proteinproben aus Zelllysaten wurden auf Eis aufgetaut und kurz auf dem Whirlmix gemischt. Es wurden in Reagenzgefäßen die Proteine mit pcsb1-Puffer so verdünnt, dass jede einzelne Probe im Reagenzgefäß $20\mu\text{g}$ Protein in $25\mu\text{l}$ pcsb1 enthielt. Auf die gleiche Weise wurde auch ein Molekulargewichts-Marker in pcsb1 verdünnt (Rainbow[®] coloured protein molecular weight marker, Amersham Biociences). Zu den so vorbereiteten Proben wurden je $25\mu\text{l}$ pcsb2-Puffer pipettiert. Dieser enthält SDS und β -Mercaptoethanol. Die Proben wurden nochmal gemischt, kurz anzentrifugiert und zur Denaturierung für 5 Minuten bei 99°C im Thermocycler erhitzt. Nach erneutem kurzen Zentrifugieren konnten die Proben in die geformten Taschen des Acrylamidgels einpipettiert werden.

Puffer pcsb2:

50 mM Tris-HCL (pH 6,8)

10 % β -Mercaptoethanol

10 % Saccharose

3 % SDS

0,01 % Bromphenol-Blau

2.2.2.3.2 Gelherstellung und Elektrophorese

Für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 100-140kDa wurde ein Gel mit 6 % Acrylamid verwendet, für Proteine zwischen 30-80 kDa eines mit 10%.

Zuerst wurde das Trenngel in eine dafür vorgesehene Apparatur gegossen. Diese bestand aus zwei Glasplatten und zwei Spacern, die auf einem Fußteil verschraubt wurden. Dieses Gel wurde vorsichtig mit Aqua dest. überschichtet, wodurch eine glatte Oberfläche entsteht. Nach einer Zeitspanne von mindestens 30 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert und das Aqua dest. konnte entfernt werden. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen, nachdem ein Spacer in Form eines Kamms eingesetzt wurde, um die Taschen für die Proben auszusparen. Nach weiteren 30 Minuten war das Sammelgel auch auspolymerisiert. Der Kamm wurde entfernt und die Gele mit frisch angesetztem Kathodenpuffer überschichtet. Die wie unter 2.2.2.3.1 beschriebenen vorbereiteten Proben wurden in die Taschen des Sammelgels mit einer Kapillar-Pipettenspitze einpipettiert. Die Gelapparatur wurde in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, nachdem diese mit Anodenpuffer gefüllt worden war. Der Kammerdeckel wurde eingesetzt und es wurde eine Spannung von 60 Volt für 18 Stunden angelegt.

Tab. 10: Verwendete Gele und deren Zusammensetzung

	Trenngel 6%	Trenngel 10%	Sammelgel
Glycerin 87%	4 g	4 g	-
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

Die Substanzen APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (Tetramethylethyldiamin) wurden zum jeweiligen Gel als letzte hinzugefügt, weil sie die Polymerisation bewirken.

Verwendete Puffer:

3 x Gelpuffer:

3 M Tris-HCl (pH 8,45)

0,3 % SDS

Kathoden-Puffer:

0,1 M Tris-HCl (pH 8,25)

0,1 M Tricine

0,1 % SDS

Anoden-Puffer:

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

2.2.2.3.3 Blotting

Nach der elektrophoretischen Auftrennung mussten die Proteine aus dem Gel auf einen haltbaren und festen Träger übertragen werden, das eigentliche „Blotting“. Dafür wurde eine Immobilon-P-Membran genutzt, die aus PVDF (Polyvinylidenfluorid) besteht. Die hydrophobe Membran wurde zur Hydrophilisierung in Methanol geschwenkt, dann in Aqua dest. und anschließend in Transferpuffer. Die zugeschnittene Membran wurde auf das Gel gelegt. Über die Membran und unter das Gel wurden drei Lagen in Transferpuffer angefeuchtetes Blotting-Papier (Whatman 3MM) angelegt. Auf beiden Seiten dieses Stapels wurden in Transferpuffer getränkte Schwämme aufgelegt und das Gesamtpaket in einer speziellen Halterung der Transferkammer befestigt. Die Transferkammer war mit Transferpuffer vorgefüllt. Der Deckel mit den Strom-Anschlüssen wurde aufgesetzt und für 4 Stunden ein Strom von 400 mA angelegt.

Transferpuffer:

100 mM Tris

193 mM Glycin

Nach dem Blotting wurde die Membran in Methanol geschwenkt und 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurde sie erneut in Methanol und anschließend in Aqua dest. geschwenkt. Die Membran wurde sofort weiterverwendet oder in Folie eingeschweißt und bei -20°C eingefroren.

2.2.2.3.4 Blockierung

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die wie oben beschrieben vorbereitete Membran in 5 % TBST/Milchpulver-Blockierungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

TBST:

20 mM Tris-HCl (pH 7.6)

137 mM Natriumchlorid

0,05 % Tween 20

5 % TBST/Milchpulver - Blockierungslösung:

1g Milchpulver ad 20ml mit TBST

2.2.2.3.5 Inkubation mit Antikörpern

Der Primär- und der Sekundärantikörper wurden mit 1,5% TBST/Milchpulver-Lösung verdünnt, entsprechend der Tabelle 11. Alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

1,5% TBST/Milchpulverlösung:

0,3 g Milchpulver ad 20ml mit TBST

Tab. 11: Verwendete Antikörper mit Verdünnungsangaben

Primär-Antikörper gegen	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
actin	1:10000	Anti-goat	1:8000
c-fos	1:1000	Anti-rabbit	1:8000
c-jun	1:1000	Anti-rabbit	1:8000
Cyclin A	1:5000	Anti-rabbit	1:8000
Cyclin B	1:2000	Anti-mouse	1:8000
Cyclin D1	1:400	Anti-mouse	1:8000
Cyclin E	1:500	Anti-rabbit	1:8000
FLAG	1:10000	Anti-mouse	1: 20000
FosB	1:200	Anti-rabbit	1:8000
Fra-1	1:400	Anti-rabbit	1:8000
Fra-2	1:800	Anti-rabbit	1:8000
jun B	1:100	Anti-rabbit	1:8000
jun D	1:2000	Anti-rabbit	1:8000
MMP-1	1:1000	Anti-mouse	1:8000
MMP-3	1:200	Anti-mouse	1:8000
p-c-jun	1:200	Anti-mouse	1:8000
PAI-1	1:100	Anti-mouse	1:8000
Rb	1:800	Anti-mouse	1:8000
Rb 2	1:1000	Anti-rabbit	1:10000
uPAR	1:200	Anti-goat	1:8000

Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Blockierungslösung abgegossen und die Membran für 1 Stunde mit dem Primär-Antikörper auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran drei Mal jeweils 10 Minuten mit TBST auf dem Schüttler gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Sekundär-Antikörper dazu gegeben, welcher an eine Peroxidase (HRP-horseradish peroxidase) gekoppelt ist. Es erfolgte eine Inkubation von 60 Minuten auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut vier Mal jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen und daraufhin mit der frisch angesetzten Chemilumineszenz-Lösung (Super Signal ® West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) für 5 min auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.2.3.6 Detektion

Das o.g. Chemilumineszenz-Kit enthält Luminol. Das Luminol wird in einer durch die Peroxidase katalysierten Reaktion im alkalischen Milieu oxydiert. Dabei sendet das angeregte Luminol-Molekül Licht aus, welches auf einem hochempfindlichen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Nach der Inkubation mit der Chemilumineszenz-Lösung wurde diese abgossen und die Membran in einer Folie eingeschweißt. Danach wurde die Membran in eine Röntgenkassette verbracht und in einer Dunkelkammer der Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) für eine Minute exponiert. Der Film wurde sofort in einer Entwicklungsmaschine entwickelt und je nach Schwärzung wurden ggf. weitere Röntgenfilme für eine verkürzte oder verlängerte Expositionszeit auf die Membran gelegt.

2.2.2.3.7 Entfernung von Antikörpern von Membranen („Reblot“)

Mit dem Reblot-Verfahren ist es möglich, eine bereits mit Primär- und Sekundär-Antikörpern beschichtete Membran mit anderen Antikörpern erneut zu verwenden. Das bietet den Vorteil, Proben, die unter exakt den gleichen Bedingungen hergestellt wurden, auf unterschiedliche Proteine zu untersuchen.

Dazu wurde die bei -20°C eingefrorene Membran kurz bei Raumluft aufgetaut und fünf Minuten in Aqua dest. gespült. Danach wurde sie für 25 Minuten auf dem Schüttler mit Reblot Mild Solution (Chemicon) in einer Verdünnung 1:10 mit Aqua dest. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden wieder die unspezifischen Bindungen blockiert, indem die Membran in einer neuen Schale zwei Mal mit 5%-iger TBST-Milchpulver-Lösung gespült wurde.

Die nachfolgende Inkubation mit dem Primär- und Sekundär-Antikörper erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.2.3.8 Auswertung mittels Densitometrie

Die unterschiedliche Schwärzung der Proteinproben auf den Röntgenfilmen wurde mit Hilfe eines Densitometers (GS700, Biorad) und der dazu gehörigen

Software (Quantity One) gemessen. Die Banden konnten anhand ihres Molekulargewichts durch den parallel aufgetragenen Molekulargewichtsmarker identifiziert werden.

Um Konzentrationsdifferenzen zwischen den einzelnen Proben auszuschließen, macht man sich zunutze, dass Aktin, ein in allen eukaryoten Zellen vorkommendes Protein, in allen Proben in etwa gleicher Konzentration vorhanden ist. Es wurden dafür die Schwärzungswerte von Aktin von allen Zelllysaten ermittelt. Daraus wurde ein Mittelwert gebildet und jeder Aktin-Probenwert durch diesen Mittelwert geteilt. Daraus ergab sich ein Korrekturfaktor, mit dem jede entsprechende Probe normalisiert wurde.

2.2.3 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse wurden mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Verteilung der Software Microsoft Excel ausgewertet (Version 2016). Dabei wurden Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau (p-Wert) von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Die Graphische Darstellung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 7.0.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung von stabil transfizierten Zellen mit Überexpression von Fra-2

Für die Generierung von MCF-7-Zellen, die dauerhaft Fra-2 überexprimieren, wurde der bicistronische pIRES-P Expressionsvektor verwendet. In diesen wurde die vollständige kodierende Sequenz für Fra-2 mit einem C-terminalen FLAG-Epitop kloniert und durch Sequenzierung bestätigt (Milde-Langosch et al. 2008). Bei diesem Vektor wird die Puromycin-Resistenz über den gleichen CMV-Promotor wie die Fra-2 Expression reguliert. Diese Tatsache erschien erfolgsversprechend, nachdem mehrere Pilotversuche mit dem pcDNA3.1+ Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe) mit Geneticin-Resistenz, der diese Eigenschaft nicht besitzt, erfolglos blieben. Die transfizierten Zellen waren zwar Geneticin-resistent, zeigten aber keine Fra-2 Überexpression, deswegen werden diese Versuche hier nicht ausführlich beschrieben.

Um stabil transfizierte MCF-7-Zellen mit Fra-2 Überexpression zu gewinnen, wurde das unter 2.2.1.3 beschriebene Protokoll etabliert. MCF-7-Zellen wurden mit dem Leervektor pIRES-P und mit den Fra-2-pIRES-P mit Hilfe der Lipofectamin-Methode transfiziert und mit Puromycin selektiert.

Danach erfolgte eine Kontrolle der Fra-2-Expression auf Protein-Ebene in Western-Blot-Analysen. Verglichen wurden die nativen MCF-7-Zellen mit den mit Fra-2-pIRES-P transfizierten und selektierten Zellen, MCF-7-pFra-2/pool genannt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Es zeigte sich nach der Detektion mit Fra-2-Antikörpern eine deutliche Überexpression von Fra-2 bei den Transfektanten (Abbildung 8A). Durch das FLAG-Epitop des Plasmids war es möglich, mit Hilfe eines FLAG-Antikörpers den exogenen Ursprung des Fra-2 nachzuweisen (Abbildung 8B).

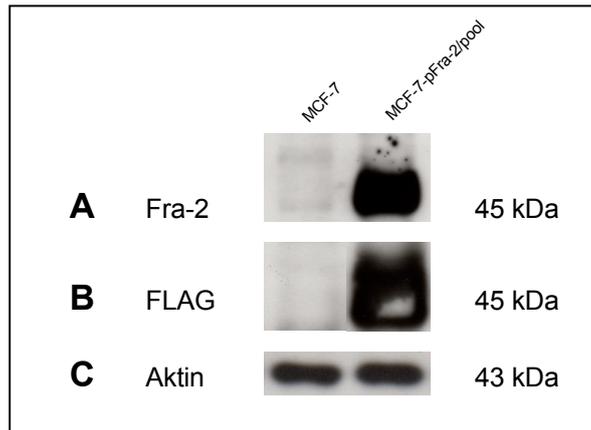


Abb. 8: Nachweis der Überexpression von exogenem Fra-2 nach Transfektion mit dem Fra-2-pIRES-P-Plasmid und Selektion mit Puromycin. A) Nach Überschichtung mit dem Fra-2-Antikörper zeigte sich eine deutliche Fra-2 Überexpression bei den transfizierten Zellen (Fra-2-Bande bei ca. 45 kDa). B) Nach Überschichtung mit dem FLAG-Antikörper konnte der exogene Ursprung des Fra-2-Proteins nachgewiesen werden (FLAG-Bande bei ca. 45 kDa). C) Aktin als „Housekeeping-Gen“, etwa gleichstarke Aktin-Expression (Aktin-Bande bei ca. 43 kDa).

Im Weiteren wurden durch Vereinzelung drei Klone gewonnen: MCF-7-pFra-2/T5, MCF-7-pFra-2/T6 und MCF-7-pFra-2/T7. Die Fra-2 Überexpression wurde noch einmal überprüft und konnte bei allen Klonen und bei dem polyklonalen Zellgemisch MCF-7-pFra-2/pool erneut nachgewiesen werden (Abbildung 9).

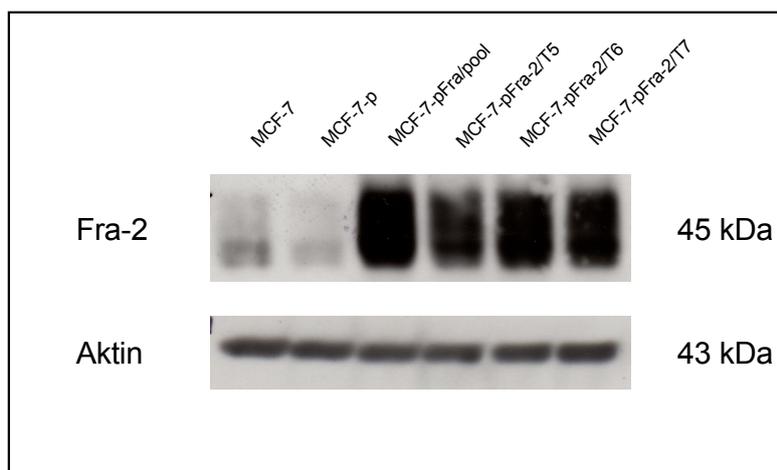


Abb. 9: Nachweis der Überexpression von exogenem Fra-2 nach Gewinnung von Klonen und dauerhafter Selektion mit Puromycin. Spur 1: MCF-7 (Ursprungszelllinie), Spur 2: MCF-7-p (Transfektion mit Leer-Vektor pIRES-P), Spur 3: MCF-7-pFra-2/pool (Transfektion mit Fra-2-FLAG-pIRES-P), Spur 4, 5 und 6: Klone MCF-7-pFra-2/T5, MCF-7-pFra-2/T6 und MCF-7-pFra-2/T7 (isolierte Klone aus MCF-7-pFra-2/pool), jeweils 20 µg aufgetragenes Protein. Nach Überschichtung mit dem Fra-2 Antikörper zeigte sich eine deutliche Fra-2 Überexpression bei den mit Fra-2-FLAG-pIRES-P transfizierten Zellen. Aktin wurde als „Housekeeping-Gen“ zur Pipettierkontrolle verwendet.

Wegen der deutlich gesteigerten und stabilen Fra-2 Expression wurde der Klon MCF-7-pFra-2/T6 zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht der Zellen, die in den weiteren Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden.

Tab. 12: Übersicht der Zellen, die in allen Versuchen verwendet wurden.

Zellart	Eigenschaften
MCF-7	ohne Transfektion
MCF-7-p	transfiziert mit dem Leervektor pIRES-P, keine Vereinzellung, Negativkontrolle (NK)
MCF-7-pFra-2/pool	transfiziert mit Fra-2-pIRES-P, keine Vereinzellung
MCF-7-pFra-2/T6	transfiziert mit Fra-2-pIRES-P, Abkömmlinge einer einzelnen Zelle

Für die funktionellen Tests wurden die MCF-7-p und nicht die nativen MCF-7-Zellen als Negativkontrolle verwendet, um Einflüsse durch den Vorgang der Transfektion und die dauerhafte Puromycin-Selektion nicht außer Acht zu lassen.

Die Expression von Fra-2 wurde im Verlauf der Arbeit zu verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot insgesamt fünf Mal überprüft, und es wurde immer eine Überexpression im Vergleich zu den MCF-7-p Zellen nachgewiesen.

3.2 Morphologische Veränderungen

Zellen der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 besitzen epithelartige Zellgestalt und wachsen als Monolayer auf den Flächen der Zellkulturgefäße. Um die Auswirkung der Fra-2-Überexpression auf die Morphologie der Zellen zu untersuchen, wurden diese auf Kammerobjektträgern kultiviert, fixiert, einer Hämalaun-Eosin-Färbung unterzogen und lichtmikroskopisch verglichen (siehe 2.2.1.4).

Die Fra-2-überexprimierenden Zellen wurden einerseits mit den nativen MCF-7-Zellen und andererseits mit den als Negativkontrolle dienenden MCF-7-p-Zellen verglichen, um eventuelle Effekte durch die Transfektion und durch Fra-2-Überexpression zu unterscheiden. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Morphologie der Negativkontrolle im Vergleich zu den untransfizierten MCF-7-Zellen.

Bei dem Vergleich der Fra-2-überexprimierenden Zellen (MCF-7-p-Fra-2/pool und MCF-7-pFra-2/T6-Klon) mit der Negativkontrolle zeigte sich, dass die Zellgestalt und die Zellgröße sich ähnlich waren, die Morphologie der Zellen MCF-7-pFra-7/pool und des Klons MCF-7-pFra-2/T6 entsprach weitgehend der Negativkontrolle und den nativen MCF-7-Zellen. In dieser Untersuchung zeigte sich also, dass Fra-2-Überexpression keinen lichtmikroskopisch nachweisbaren Einfluss auf die Morphologie der MCF-7-Zellen hat.

3.3 Proliferation

Der Einfluss einer Fra-2-Überexpression auf die Proliferationsfähigkeit der MCF-7-Zellen wurde mit Hilfe des MTT-Tests untersucht (siehe 2.2.1.5). Als Negativkontrolle (NK) dienten die mit dem Leervektor transfizierten Zellen MCF-7-p. Der 24h-Wert wurde für jede Zellart als 100% gesetzt.

Die Werte aus drei unabhängigen MTT-Versuchsreihen (jeweils mit Dreifachbestimmung, n=9) wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt (Abbildung 10).

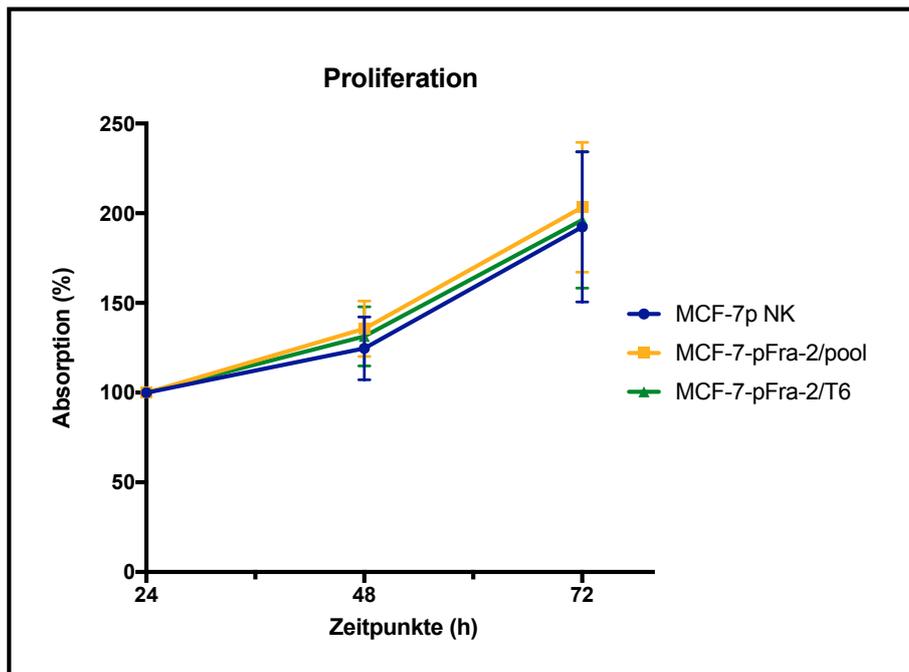


Abb. 10: Effekt von Fra-2 auf die Proliferation der MCF-7-Mammakarzinom-Zellen im MTT-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei Experimenten mit jeweils einer Dreifachbestimmung zu den drei angegebenen Zeitpunkten. Die Absorption stieg bei allen Zellen im Verlauf von 72h an. Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen der Negativkontrolle (NK), MCF-7-pFra-2/pool und MCF-7-pFra-2/T6.

Es wurde sowohl für die MCF-7-pFra-2/pool Zellen und als auch für den MCF-7-pFra-2/T6 Klon eine geringfügig erhöhte Proliferationsrate gegenüber der NK ermittelt, dabei verliefen die Proliferations-Kurven annähernd parallel. Für MCF-7-pFra-2/pool betrug die Absorptionssteigerung im Verlauf von 72h im Vergleich zu der NK 5,68 % und für MCF-7-pFra-2/T6 1,97 %.

Bei den MCF-7-pFra-2/pool Zellen zeigte sich dabei eine Steigerung zum Ausgangswert (24h-Wert) um das 2,03-fache und bei dem MCF-7-pFra-2/T6 Klon um das 1,96-fache. Bei der Negativkontrolle zeigte sich eine 1,92-fache Steigerung. Die Unterschiede im Proliferationsverhalten waren damit sehr gering. Statistisch waren sie nicht signifikant.

Demzufolge hatte die Fra-2-Überexpression keinen wesentlichen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der MCF-7-Zellen.

3.4 Invasivität

Voraussetzung für ein invasives Wachstum ist die Fähigkeit, die Basalmembran zu durchdringen. Um die Fragestellung beantworten zu können, ob gesteigerte Fra-2 Expression die geringe Invasivität der MCF-7-Zellen beeinflusst, wurde das Matrigel™-Invasionsassay verwendet. Dabei können invasive Zellen eine der Basalmembran ähnelnde Schicht, die auf eine poröse Membran aufgetragen ist, überwinden. Die Anzahl dieser invasiven Zellen wurde bestimmt und statistisch ausgewertet (siehe 2.2.1.6).

Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt mit jeweils einer Dreifachbestimmung (n=9). Daraus wurden Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 11 dargestellt.

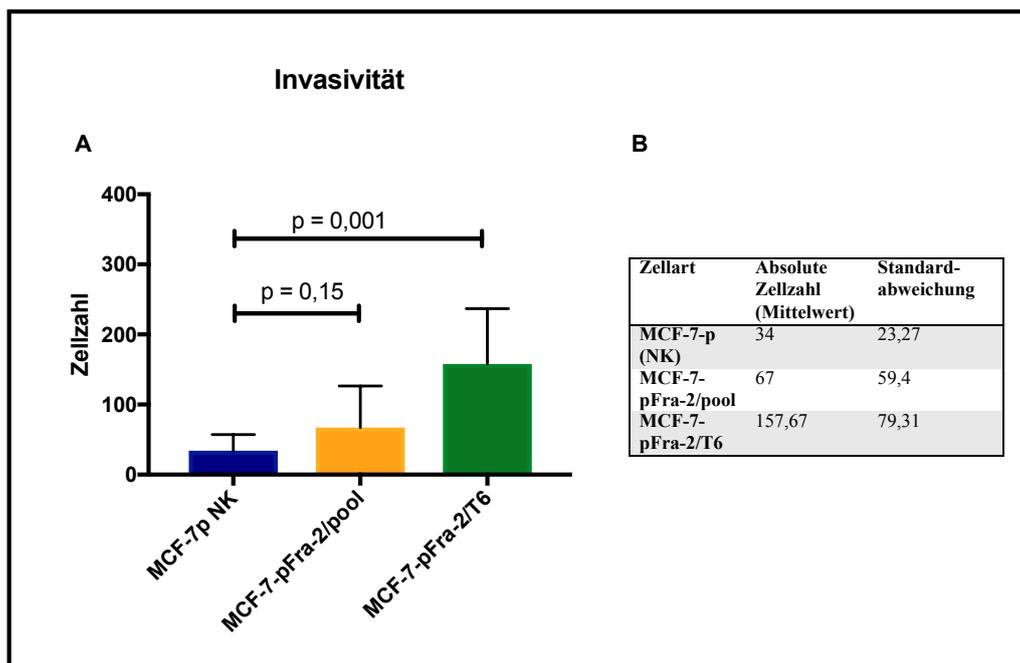


Abb. 11: Effekt der Fra-2 Überexpression auf die Invasivität der MCF-7-Zellen im Invasionsassay. Vergleich der Negativkontrolle (NK) MCF-7p mit den Fra-2 überexprimierenden MCF-7-pFra-2/pool und MCF-7-pFra-2/T6. A) graphische Darstellung der Ergebnisse mit Signifikanzniveau. B) tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Versuchen mit einer Dreifachbestimmung (n=9).

Es zeigte sich eine erhöhte Invasivität gegenüber der Negativkontrolle sowohl bei den MCF-7-pFra-2/pool Zellen als auch bei dem Klon MCF-7-pFra-2/T6. Gegenüber den NK-Zellen zeigte sich für die MCF-7-pFra-2/pool Zellen eine Steigerung um das 1,97-fache, für den MCF-7-pFra-2/T6 Klon um das 4,64-fache. Diese Steigerung war für den MCF-7-pFra-2/T6 Klon statistisch signifikant.

3.5 Migration

Um die Fähigkeit zur Migration der Fra-2-überexprimierenden Zellen zu untersuchen, wurde ein dem Invasionsassay analoger Versuchsaufbau gewählt. Statt Matrigel-Inserts™ wurden dabei Control-Inserts™ verwendet, deren Boden nur aus einer porösen PET-Membran ohne Beschichtung besteht. Es wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die durch die Poren (Größe 8µm) migrieren konnten (siehe 2.2.1.6).

Es wurden drei unabhängige Versuche mit jeweils einer Dreifachbestimmung durchgeführt (n=9), daraus wurden Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 dargestellt.

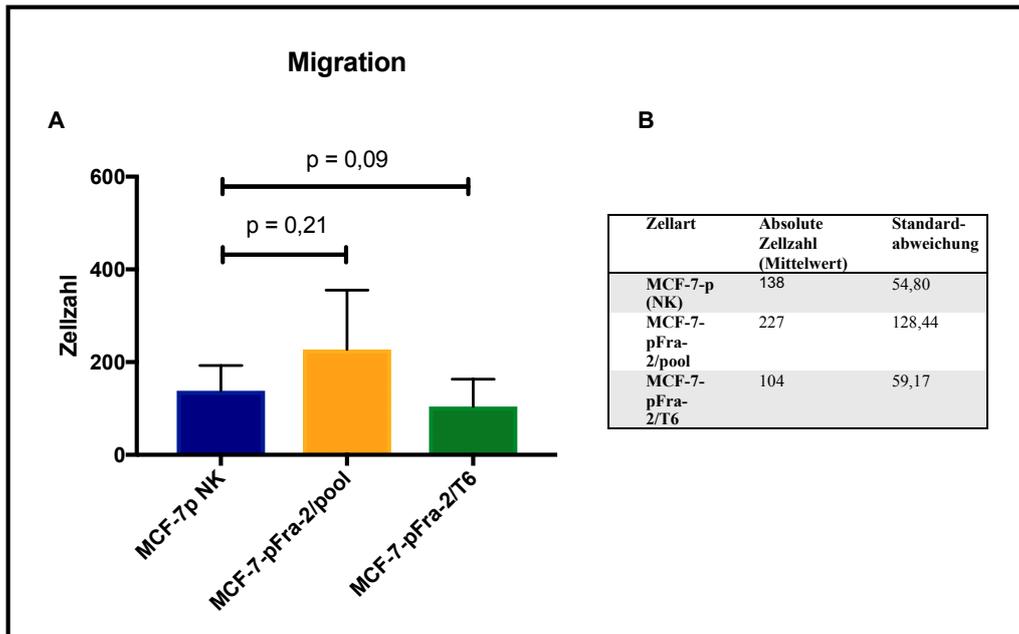


Abb. 12: Effekt der Fra-2-Überexpression auf die Migration der MCF-7-Zellen im Migrations-Assay mit Control-Inserts. Vergleich der Negativkontrolle (NK) MCF-7p mit den Fra-2 überexprimierenden MCF-7-pFra-2/pool und MCF-7-pFra-2/T6. A) graphische Darstellung der Ergebnisse mit Signifikanzniveau. B) tabellarische Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung aus drei Versuchen mit einer Dreifachbestimmung (n=9).

Es zeigte sich ein widersprüchliches Ergebnis bei der Migrationsfähigkeit der Fra-2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Während bei den nicht vereinzelteten MCF-7-pFra-2/pool Zellen eine Steigerung zu verzeichnen war, zeigte sich bei dem Klon MCF-7-pFra-2/T6 eine Reduktion der Motilität. Beim prozentualen Vergleich mit der Negativkontrolle (Negativkontrolle-Wert als 100% gesetzt, graphisch nicht dargestellt) zeigte sich bei den MCF-7-pFra-2/pool Zellen eine 2,01-fache Steigerung, bei dem Klon MCF-7-pFra-2/T6 war die Migrationsfähigkeit auf das 0,53-fache erniedrigt. Beide Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant.

3.6 Expression von Zielgenen von Fra-2

Um die Expression bestimmter Zielgene in Fra-2-überexprimierenden MCF-7-Zellen zu untersuchen, wurden die Proteine aus Zelllysaten in Western Blot-Analysen elektrophoretisch aufgetrennt und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert (siehe 2.2.2). Es wurden dabei ausgewählte Mitglieder

der AP-1-Familie, ausgewählte Regulatoren des Zellzyklus und ausgewählte Regulatoren der Invasivität untersucht. Die Ergebnisse sind Durchschnittswerte aus drei bis fünf Versuchen, wobei immer die Werte für die Negativkontrolle MCF-7-p als 100% gesetzt wurden. Die Signifikanz der Werte wurde mit Hilfe des t -Tests ermittelt.

3.6.1 AP-1 Faktoren

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Fra-2-Überexpression auf die AP-Faktoren der Fos- (FosB, c-Fos, Fra-1) und der Jun-Subfamilie (JunB, c-Jun, JunD) untersucht. Sie enthalten in ihren Promotoren AP-1-Bindungsstellen (TREs) und unterliegen damit selbst einer Regulation durch AP-1-Komplexe.

Bei c-Jun konnten mit einem Antikörper gegen Gesamt-c-Jun keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden. Aus diesem Grund wurde ein Antikörper gegen die an Serin 63 phosphorylierte, aktive Form von c-Jun (p-c-Jun) verwendet.

Der Effekt auf die Expression der ausgewählten Mitglieder der AP-Familie ist zusammenfassend in der Abbildung 13 dargestellt.

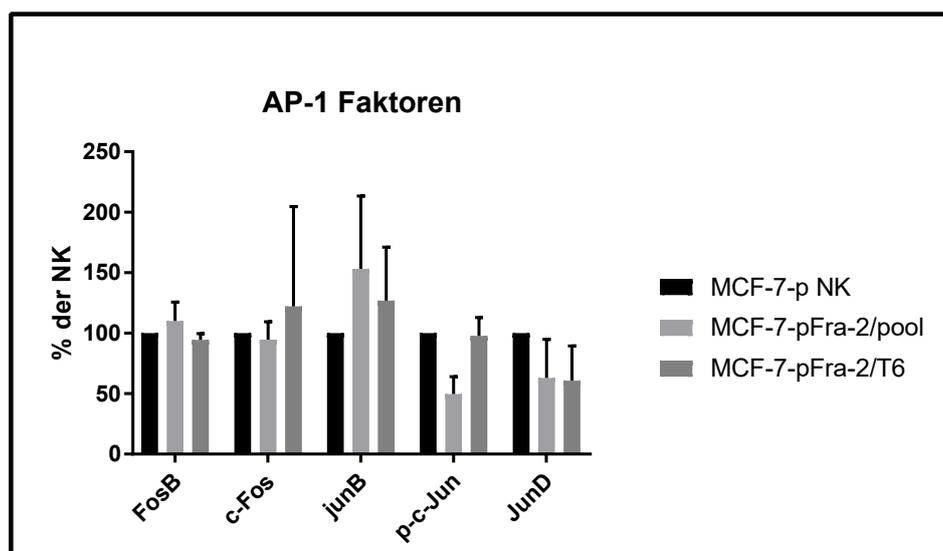


Abb. 13: Effekt der Fra-2-Überexpression auf die Expression ausgewählter Mitglieder der AP-1-Familie. Der Wert der Negativkontrolle (NK) wurde als 100% definiert. Die Durchschnittswerte für MCF-7-pFra-2/pool und für MCF-7-pFra-2/T6 sind dazu in Verhältnis gesetzt, die Standardabweichungen sind abgebildet.

Es zeigten sich teilweise gleichsinnige (JunB, p-c-Jun, JunD) und teilweise gegensätzliche Veränderungen (FosB, c-Fos) bei den MCF-7-pFra-2/pool Zellen und bei dem MCF-7-pFra-2/T6 Klon. Das Ausmaß der Veränderung war mitunter deutlich unterschiedlich. Aufgrund der großen Streubreite der einzelnen Werte konnten die Ergebnisse nicht als signifikant gewertet werden, bis auf das Ergebnis für MCF-7-pFra-2/pool für p-c-Jun. Die Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die prozentualen Veränderungen und den p-Wert im Einzelnen wieder.

Tab. 13: Durchschnittliche prozentuale Veränderung der AP-1-Proteine in Vergleich mit der Negativkontrolle (NK) und Signifikanzniveau der Ergebnisse.

AP-1 Faktor	Zellart	durchschnittliche Veränderung zu NK	p-Wert
FosB	pFra-2/pool	+ 10 %	0,53
	pFra-2/T6	- 6 %	0,37
c-Fos	pFra-2/pool	- 5 %	0,53
	pFra-2/T6	+ 22 %	0,63
Jun B	pFra-2/pool	+ 53%	0,23
	pFra-2/T6	+ 27%	0,4
p-c-Jun	pFra-2/pool	- 50%	0,03
	pFra-2/T6	- 2%	0,83
Jun D	pFra-2/pool	- 37%	0,35
	pFra-2/T6	- 39%	0,3

Die MCF-7-Zellen exprimieren kein Fra-1. Um eine eventuell neu aufgetretene Fra-1-Bande im Western-Blot eindeutig zu identifizieren, wurde eine Positivkontrolle verwendet. Hierzu wurden Proteine aus Zelllysaten der Fra-1 exprimierenden MDA-MB231-Zellen genutzt. Die Abbildung 14 zeigt als Beispiel eines von zwei Experimenten. Dabei konnte in den Fra-2-überexprimierenden Zellen keine Fra-1-Expression gezeigt werden.

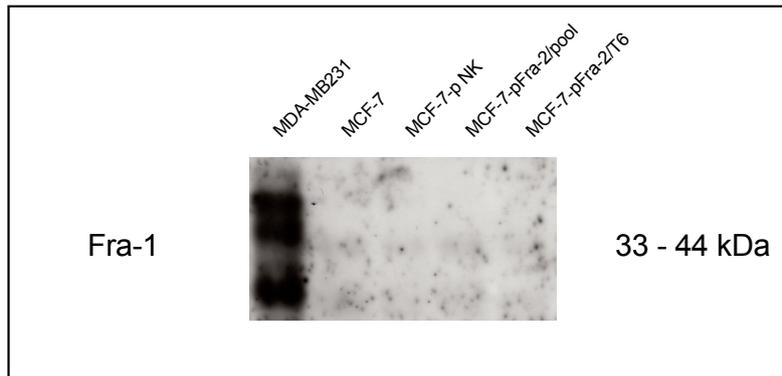


Abb. 14: Effekt von Fra-2-Überexpression auf die Fra-1-Expression im Western Blot. Jeweils 20 µg aufgetragenes Protein, Spur 1: MDA-MB231 (Positivkontrolle, Fra-1-Bande bei 33-44 kDa), Spur 2: MCF-7 (keine Fra-1 Expression), Spur 3, 4, und 5: die stabil transfizierten Zellen zeigen keine neu aufgetretene Expression von Fra-1.

3.6.2 Regulatoren des Zellzyklus

Von den an der Stimulation des Zellzyklus beteiligten Faktoren wurden die Cycline A, B, D1 und E untersucht, von den Inhibitoren des Zellzyklus das Retinoblastom-Tumorsuppressor-Protein Rb und das ihm nah verwandte Rb2.

Die Abbildung 15 zeigt die ermittelten Ergebnisse, wobei der Mittelwert der Negativkontrolle als 100% gesetzt wurde.

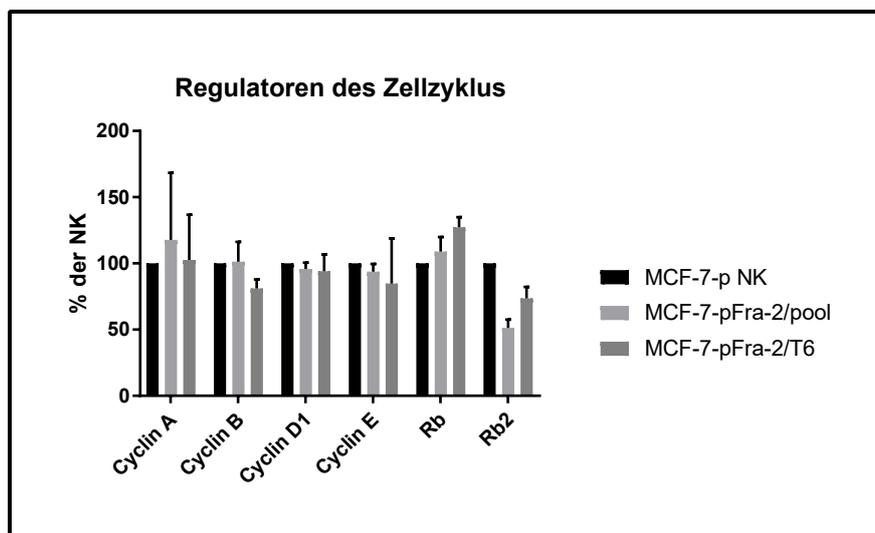


Abb. 15: Einfluss der Fra-2-Überexpression auf die Expression von Regulatoren des Zellzyklus. Der Wert der Negativkontrolle (NK) wurde als 100% definiert. Die Durchschnittswerte für MCF-7-pFra-2/pool und für MCF-7-pFra-2/T6 sind in Verhältnis dazu gesetzt.

Bei den MCF-7-pFra-2/pool-Zellen und bei dem Klon MCF-7-pFra-2/T6 zeigten sich meist gleichsinnige Veränderungen (Anstieg oder Abfall), nur bei Cyclin B war die Veränderung gegensätzlich. Eine Erhöhung der Expression zeigte sich bei beiden Zellarten bei Cyclin A und Rb, eine Verminderung bei Cyclin D1, Cyclin E und Rb2.

Die Tabelle 14 zeigt die ermittelten Werte mit dem jeweiligen Signifikanz-Niveau. Als signifikant erwiesen sich die Ergebnisse für Cyclin B, Rb und Rb2 für den Klon MCF-7-pFra-2/T6 und für Rb2 für die MCF-7-pFra-2/pool-Zellen.

Tab.14: Durchschnittliche prozentuale Veränderung der Regulatoren des Zellzyklus im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) und Signifikanzniveau der Ergebnisse.

Zellzyklus-Regulator	Zellart	durchschnittliche Veränderung zu NK	p-Wert
Cyclin A	pFra-2/pool	+ 18 %	0,61
	pFra-2/T6	+ 3 %	0,91
Cyclin B	pFra-2/pool	+ 1 %	0,9
	pFra-2/T6	- 19 %	0,04
Cyclin D1	pFra-2/pool	- 4 %	0,43
	pFra-2/T6	- 6 %	0,63
Cyclin E	pFra-2/pool	- 6 %	0,37
	pFra-2/T6	- 15 %	0,64
Rb	pFra-2/pool	+ 9 %	0,29
	pFra-2/T6	+ 27 %	0,03
Rb2	pFra-2/pool	- 49 %	0,006
	pFra-2/T6	- 26 %	0,04

3.6.3 Regulatoren der Invasivität

Um den Einfluss von Fra-2-Überexpression auf Regulatoren der Invasivität in den MCF-7-Zellen zu analysieren, wurden ausgewählte Mitglieder wichtiger tumorassoziiertes Protease-Systeme untersucht. Aus dem uPA -System wurden PAI-1 und uPAR und aus der Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) MMP-1 und MMP-3 untersucht.

Die Abbildung 16 stellt die Ergebnisse im Vergleich zu dem Mittelwert der Negativkontrolle dar, der als 100% definiert wurde.

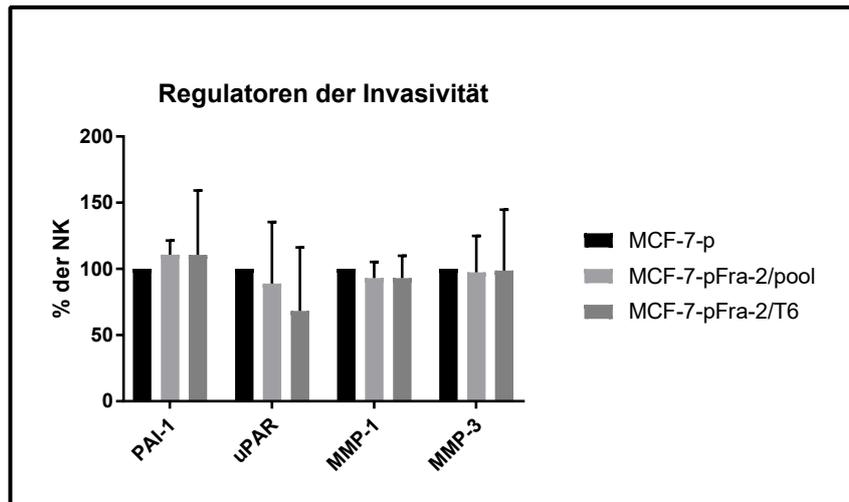


Abb. 16: Einfluss der Fra-2-Überexpression auf die Expression von Regulatoren der Invasivität. Der Wert der Negativkontrolle (NK) MCF-7-p wurde als 100% definiert. Die Durchschnittswerte für MCF-7-pFra-2/pool und für MCF-7-pFra-2/T6 sind dazu in Relation gesetzt.

Es zeigten sich bei allen untersuchten Regulatoren der Invasivität gleichsinnige Veränderungen, deren Ausmaß bei den beiden untersuchten Zellarten aber teilweise unterschiedlich war. Eine Erhöhung ergab sich bei PAI-1, eine Verminderung bei uPAR, MMP-1 und MMP-3. Alle Werte erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Die Tabelle 15 zeigt die Veränderung der Expression der untersuchten Faktoren und das ermittelte Signifikanzniveau.

Tab. 15: Durchschnittliche prozentuale Veränderung der Regulatoren der Invasivität im Vergleich mit der Negativkontrolle (NK) und Signifikanzniveau der Ergebnisse.

Regulator der Invasivität	Zellart	durchschnittliche	
		Veränderung zu NK	p-Wert
PAI-1	pFra-2/pool	+ 11 %	0,23
	pFra-2/T6	+ 11 %	0,74
uPAR	pFra-2/pool	- 11%	0,67
	pFra-2/T6	- 32%	0,28
MMP-1	pFra-2/pool	- 7 %	0,34
	pFra-2/T6	- 7 %	0,47
MMP-3	pFra-2/pool	- 3 %	0,8
	pFra-2/T6	- 1 %	0,9

4 Diskussion

Laut der International Agency for Research on Cancer (IARC) ist das Mammakarzinom weltweit die häufigste Tumorerkrankung beim weiblichen Geschlecht (Schnitt et. al 2014). Trotz des wissenschaftlichen Fortschritts und der heutigen Therapiemöglichkeiten gilt das Mammakarzinom bei fortgeschrittener Erkrankung mit Vorhandensein von Fernmetastasen als nicht heilbar (Gätje et al. 2015, Harbeck und Liedtke 2016). Frauen mit einer Erkrankung in diesem fortgeschrittenen Stadium haben eine statistische 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 22% (American Cancer Society 2017), was erklärlich macht, warum weitere Forschung notwendig ist, um die molekularen Grundlagen dieser heterogenen Erkrankung zu beleuchten und bessere und gezieltere Therapiemethoden zu entwickeln.

Viele experimentelle Untersuchungen, aber auch Studien an Tumormaterial deuten darauf hin, dass der AP-1-Transkriptionsfaktor Fra-2 eine Rolle bei der Progression und Invasion vom Mammakarzinom spielt. In dieser Arbeit wurden anhand der humanen, wenig invasiven, hoch-differenzierten, Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 einige Wirkungen einer Fra-2-Überexpression untersucht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich hier um ein experimentelles Modell handelt, welches viele Faktoren, die in vivo einen Einfluss haben könnten, nicht berücksichtigen kann. Dennoch konnten Erkenntnisse gewonnen werden, die die Rolle von Fra-2 im Prozess der Tumorprogression etwas näher beleuchten.

4.1 Etablierung von stabil transfizierten Zellen mit Überexpression von Fra-2

Um die gewünschte Überexpression von Fra-2 in den MCF-7-Zellen zu erzeugen, wurden mehrere Transkriptionsversuche durchgeführt, initial mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1+ (Invitrogen, Karlsruhe), in dem die Fra-2-cDNA-Sequenz einkloniert war (Milde-Langosch et al. 2008). Um die Zellen danach zu selektieren und nur überexprimierende Zellen zu erhalten, besaß das Plasmid eine Sequenz, die für eine Geneticin-Resistenz kodierte. Diese wurde nicht über den gleichen Promotor wie die Fra-2-Expression reguliert. Die Zellen wurden mit Geneticin selektiert, danach die Selektion gestoppt und die Expression immunocytochemisch untersucht. Es zeigte sich eine Überexpression bei nur etwa 20% der Zellen, deswegen wurde ein weiterer Vektor ausgesucht und ein anderes Protokoll erarbeitet, um bei 100% der Zellen eine Überexpression zu erreichen. Hierzu wurde der bicistronische pIRES-P Expressionsvektor (Genbank Nr. Z75185) ausgewählt, und in diesen wurde die vollständige kodierende Sequenz für Fra-2 mit einem C-terminalen FLAG-Epitop einkloniert und durch Sequenzierung bestätigt (Milde-Langosch et al. 2008). Bei diesem Vektor wird die Puromycin-Resistenz über den gleichen CMV-Promotor wie die Fra-2-Expression reguliert. Daher sollten Puromycin-resistente Zellen auch das einklonierte Fra-2 exprimieren. Nach dem ersten Versuch mit diesem Plasmid stellte sich eine Puromycin-Konzentration im Medium von 7µg/ml als zytotoxisch für alle Transfektanten heraus, deswegen wurde beim zweiten Versuch eine Konzentration von initial 2µg/ml verwendet, die im Verlauf auf 1µg/ml reduziert wurde. Damit sicher war, dass die Zellen, die das Plasmid nicht in ihrem Genom integriert haben absterben, wurde solange kultiviert, bis alle Zellen einer Kontrolle aus der Ursprungszelllinie ausgestorben waren. Um eine dauerhafte Fra-2-Überexpression zu erreichen, wurden nach der Selektion die Zellen dauerhaft in Puromycin-haltigem Medium in einer Konzentration von 1µg/ml kultiviert. So gelang die Etablierung der gewünschten Fra-2-überexprimierenden Transfektanten.

Nach Selektion und Klon-Gewinnung wurden in den verschiedenen Experimenten die Negativkontrolle-Zellen MCF-7-p (mit Leervektor transfiziert) mit dem Zellgemisch MCF-7-pFra-2/pool und dem Klon MCF-7-pFra-2/T6 verglichen. Damit sollten Effekte durch den Prozess der Transfektion und die dauerhafte Antibiotikum-Wirkung ausgeschaltet werden, die beim Vergleich mit dem Wildtyp-MCF-7 vorhanden wären. Der Fakt, dass bei dem Zellgemisch MCF-7-pFra-2/pool der Expressionsvektor an ganz verschiedenen Stellen im Genom der Zellen integriert sein könnte und damit unterschiedliche Wirkung zeigen könnte, könnte die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse für MCF-7-pFra-2/pool und für MCF-7-pFra-2/T6 erklären. Um sicher zu stellen, dass nicht nur der Expressionsvektor ins Genom integriert wurde, sondern auch tatsächlich Fra-2-Protein produziert wurde, wurden Western Blot-Kontrollen nicht nur mit einem Fra-2-Antikörper, sondern auch mit FLAG-Antikörper durchgeführt. So konnte nachgewiesen werden, dass es sich um „transfiziertes“ Fra-2 handelt.

Nach der Beendigung dieser Arbeit wurden die im Rahmen dieser Arbeit generierten stabil transfizierten Zellen in weiteren Untersuchungen verwendet. Dabei zeigten sich weitere interessante Erkenntnisse, die in den folgenden Abschnitten auch thematisiert werden.

4.2 Einfluss der Fra-2-Überexpression auf die Expression der anderen AP-1-Transkriptionsfaktoren (Fos- und Jun-Proteine)

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Fra-2-Überexpression auf die Expression der AP-1-Faktoren der Fos- (FosB, c-Fos, Fra-1) und der Jun-Subfamilie (JunB, c-Jun, JunD) auf Proteinebene untersucht. Diese Faktoren enthalten in ihren Promotoren AP-1-Bindungsstellen (TREs) und können damit selbst einer Regulation durch AP-1-Komplexe unterliegen.

Die MCF-7-Zellen haben keine nachweisbare Fra-1-Expression, was sich auch bei Fra-2-Überexpression nicht änderte. Ob bei einer endogenen Fra-1-Expression sogar eine Suppression durch Fra-2 erfolgen würde, konnte in diesem Modell nicht beantwortet werden. Ein solcher Effekt von Fra-2 wurde in einem Parallelversuch in unserer Arbeitsgruppe gefunden, in dem nach Ausschaltung von Fra-2 mit Fra-2-siRNA in MDA-MB231-Zellen reproduzierbar eine erhöhte Proteinmenge von Fra-1 detektiert wurde (Milde-Langosch et al. 2008, Wagner 2008). Schröder fand, dass sich in stabil transfizierten Fra-2-überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinien (MDA-MB231) eine niedrige DNA-Bindungsaktivität von Fra-1 zeigt, was auch darauf hindeutet, dass Fra-2-Überexpression die Fra-1-Expression bei dieser Zelllinie unterdrückt (Schröder 2009).

Bei den anderen Fos-Proteinen FosB und c-Fos ließ sich kein eindeutiger Effekt der Fra-2-Überexpression detektieren, wie auch bei den Jun-Proteinen JunB und JunD. Die Ergebnisse hatten eine große Streubreite und variierten zwischen MCF-7-pFra-2/pool und MCF-7-pFra-2/T6.

Bei dem dritten Vertreter der Jun-Subfamilie c-Jun konnten mit einem Antikörper gegen Gesamt-c-Jun keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden. Aus diesem Grund wurde ein Antikörper gegen die an Serin 63 phosphorylierte, aktive Form von c-Jun (p-c-Jun) verwendet. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion von p-c-Jun in den MCF-7-pFra-2/pool-Zellen, bei dem MCF-7-pFra-2/T6 war diese Reduktion auch vorhanden, aber nicht signifikant. Die Kinasen, die c-Jun phosphorylieren, sind nicht AP-1-abhängig, so dass die erniedrigte Expression von p-c-Jun wahrscheinlich auf eine erniedrigte c-Jun-Transkription und somit Proteinexpression zurückzuführen ist. Bei dem bereits erwähnten Parallelversuch zeigte sich nach der Transfektion mit Fra-2-siRNA in MDA-MB231-Zellen eine signifikante Erhöhung der p-c-Jun-Expression (Milde-Langosch et al. 2008, Wagner 2008), was auch für eine Hemmung der c-Jun-Expression durch Fra-2 spricht. Bei vorherigen Untersuchungen mit transienten Transfektionen in MCF-7- und MDA-MB231-Zellen mit Fra-2-Vektoren fanden Milde-Langosch et al. ein gegenteiliges Ergebnis, d.h. die Proteinmengen von c-Jun waren erhöht (Milde-Langosch et al. 2004). Da bei transienten Transfektionen jedoch nur

ein Teil der Zellen den Fra-2-Vektor in ihrem Genom integriert hat, ist dieses Ergebnis weniger aussagekräftig.

Ein überraschendes Ergebnis zeigte sich in Folgeuntersuchungen bei der Suche nach Zielgenen von Fra-2: In der microarray-Analyse zeigte sich keine erhöhte Fra-2-mRNA-Expression in den stabil transfizierten MCF-7-Zellen. Dieses Ergebnis wurde durch RT-PCR bestätigt. Auf Proteinebene wurde dabei trotzdem dauerhaft eine Fra-2-Überexpression gemessen (Milde-Langosch et al. 2008). Da Fra-2 im Vergleich zu den anderen AP-1-Faktoren ein sehr stabiles Protein ist (Acquaviva et al. 2001), ist eine mögliche Erklärung hierfür, dass das in den Zellen kumulierte Fra-2-Protein durch einen Rückkopplungsmechanismus zu einer Inhibition seiner eigenen Transkription geführt hat, da sowohl der natürliche Fra-2-Promotor, als auch der CMV-Promotor, der in dem pIRES-Vektor genutzt wurde, AP-1-Bindungsstellen aufweist (Milde-Langosch et al. 2008).

4.3 Einfluss der Fra-2-Überexpression auf die Morphologie von MCF-7-Zellen

Veränderungen in der Morphologie der Zellen können eine Folge von maligner Transformation sein. Bei der so genannten epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) werden epitheliale Marker (z.B. E-Cadherin) herunterreguliert und mesenchymale Marker (z.B. Vimentin und glattmuskuläres Aktin) hochreguliert. Dadurch verlieren die Tumorzellen die Adhärenz untereinander und ihre Zellgestalt ändert sich, sie zeigen einen mesenchymalen spindelförmigen Phänotyp. Diese Veränderung verleiht ihnen bessere Migrationseigenschaften und erlaubt ihnen auch, die Blutgefäße zu invadieren (Böcker et al. 2012). Eine solche Entdifferenzierung als Effekt einer Fra-2-Überexpression auf die gut differenzierten epithelial wachsenden MCF-7 war nicht zu detektieren, die Morphologie der stabilen Transfektanten zeigte sich ähnlich wie die der Negativkontrolle. Keinen Einfluss auf die Zellmorphologie fanden auch Tkach und Kollegen nach Ausschaltung von Fra-2 in fibroblastoiden L929-Zellen. Die Autoren fanden außerdem, dass

Änderungen der Zellmorphologie mit Veränderungen in der Motilität der Zellen korrelierten (Tkach et al. 2003). Dieses Ergebnis könnte auch auf diese Arbeit übertragen werden: Die Morphologie der Fra-2-Transfektanten war unverändert, und es zeigte sich keine signifikante Änderung der Migrationseigenschaften der MCF-7-Zellen (s.u.). Daher kann man schlussfolgern, dass eine Fra-2-Überexpression keine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der MCF-7-Zellen verursacht. Keine Veränderung der Morphologie der MCF-7- und der MDA-MB23-Zellen durch Fra-2-Überexpression fanden sich auch bei transienten Transfektionen unserer Arbeitsgruppe (Milde-Langosch et al. 2004). Auch bei siRNA-Experimenten an MDA-MB231-Zellen fand sich kein Einfluss auf die Morphologie (Milde-Langosch et al. 2008, Wagner 2008).

4.4 Einfluss von Fra-2 auf die Proliferation und die Expression von Zellzyklus-Regulatoren

Während der Einfluss der anderen Fos-Faktoren auf die Proliferation von Zellen besser erforscht ist, liegen nur wenige Daten über die Wirkung von Fra-2 auf die Proliferation vor.

Grundsätzlich ist Proliferation nur möglich, wenn die Zellen den normalen Zellzyklus durchlaufen. Es ist bekannt, dass einige Zellzyklus-Regulatoren TREs in ihren Promotorregionen besitzen, an denen AP-1-Dimere binden und so ihre Expression beeinflussen können. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Fra-2-Überexpression eine Wirkung auf die für das Voranschreiten des Zellzyklus verantwortlichen Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D1, Cyclin E sowie die den Zellzyklus hemmenden Faktoren Rb und Rb2 hat. Außerdem wurde im Proliferationsassay das Wachstum der Fra-2-überexprimierenden MCF-7-Zellen direkt untersucht.

Im Vergleich zu transienten Transfektionen war es durch die Etablierung stabil transfizierter Zellen mit dauerhafter Fra-2-Überexpression möglich, die Zellproliferation im Zeitverlauf (nach 24, 48 und 72 Stunden) zu untersuchen.

Dabei zeigte sich sowohl bei den polyklonalen MCF-7-pFra-2/pool als auch bei dem Klon MCF-7-pFra-2/T6 eine minimale Erhöhung der Proliferationsrate im Vergleich mit der Negativkontrolle MCF-7-p, die nicht signifikant war. Dies spricht dafür, dass die Fra-2-Überexpression keinen Einfluss auf die Proliferation der MCF-7-Zellen hat. Auch Schröder fand bei Fra-2-überexprimierenden stabilen Transfektanten der MCF-7- und der MDA-MB 231-Mammakarzinom-Zelllinien keinen Einfluss auf die Proliferation (Schröder 2009). Im Gegensatz dazu beobachteten Nakayama et al. bei Untersuchungen über die adulte T-Zell-Leukämie (ATL), dass es in der nicht malignen T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat nach Fra-2-Transfektion (wie auch bei Jun D-Transfektion) es zu einer Proliferationssteigerung kam. Außerdem fanden sie nach Fra-2-Ausschaltung durch siRNA in den Lymphom-Zelllinien HUT102 und ST1 eine signifikant reduzierte Proliferation der Zellen, was auch für einen Proliferation-steigernden Effekt von Fra-2 spricht (Nakayama et al. 2008). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach Fra-2-Silencing in MDA-MB231-Mammakarzinomzellen, wobei die Proliferation schwach, aber signifikant erniedrigt war (Milde-Langosch et al. 2008, Wagner 2008).

Bei der Untersuchung der Wirkung von Fra-2-Überexpression auf die Zellzyklus-Aktivatoren zeigten sich für Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D1 und Cyclin E keine eindeutigen Änderungen in den polyklonalen MCF-7-pFra-2/pool-Zellen und dem Klon MCF-7-pFra-2/T6. Anders als in dieser Arbeit fanden Milde-Langosch et al. in einer Studie an Tumormaterial von Mammakarzinomen Korrelationen von hoher Fra-2-Expression und der Expression von Cyclin D1 und Cyclin E (Milde-Langosch et al. 2000). Die gleiche Arbeitsgruppe fand in Endometrium-Karzinomen auch eine Korrelation von Fra-2 und Cyclin B1 (Bamberger et al. 2001).

Die in diesem Abschnitt diskutierten unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Autoren sowohl beim Proliferationsassay als auch bei der Expression von Regulatoren des Zellzyklus als Zielgene von Fra-2 deuten darauf hin, dass die Wirkung von Fra-2 zell- und gewebsspezifisch und sogar bei verschiedenen Tumorsubtypen unterschiedlich sein kann.

Für den Inhibitor des Zellzyklus Rb zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein

eindeutiges Ergebnis, während für das ihm verwandte Rb2 eine signifikante Reduktion sowohl für die polyklonalen MCF-7-pFra-2/pool-Zellen (um 49%) als auch für den Klon MCF-7-pFra-2/T6 (um 26%) festzustellen war. Die drei Mitglieder der Retinoblasoma-Gen-Familie Rb(p105), Rb2(p130) und RBL1(p107) gelten als Tumorsuppressor-Gene. Sie sind bei der Kontrolle der Zellzyklusprogression entscheidend, sind aber auch bei der Differenzierung, Apoptose und Angiogenese beteiligt (Scambia et al. 2006). Sie hemmen das Voranschreiten des Zellzyklus und damit die Zellproliferation durch Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren. Die genaue Rolle von Rb2 bei malignen Tumoren ist nicht eindeutig geklärt, es wurde aber eine Herabregulation oder eine Mutation bei vielen menschlichen Tumoren gefunden (Paggi und Giordano 2001). Milde-Langosch et al. fanden im klinischen Tumormaterial bei Endometriumkarzinomen und in geringerem Prozentsatz auch bei Mammakarzinomen eine niedrige Rb2-Expression. In dieser Studie zeigten die Autoren außerdem, dass Rb2 besonders bei entdifferenzierten, ER-negativen Mammakarzinomen herabreguliert wird (Milde-Langosch et al. 2001). Farman et al. fanden dreifach reduzierte Rb2-Expression in Mammakarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe (Farman et al. 2018). Auch bei verschiedenen Entitäten von Lungenkarzinomen wurde eine Herabregulation von Rb2 beobachtet, wobei die genaue Rolle von Rb2 noch diskutiert wird (Xue Jun et al. 2003, Fiorentino et al. 2011). Über eine Beeinflussung von Rb2 durch den AP-1-Faktor Fra-2 fanden sich in der Literatur keine Hinweise.

Man könnte vermuten, dass die Reduktion von Rb2-Protein in den MCF-7-Zellen zu einer Proliferationssteigerung führen würde, in der vorliegenden Untersuchung zeigte sich aber keine eindeutige Veränderung der Proliferation im MTT-Test. Dieser Fakt deutet darauf hin, dass Rb2-Herabregulation allein die Proliferation von der MCF-7-Mammakarzinom-Zellen nicht beeinflusst.

4.5 Einfluss von Fra-2 auf die Invasivität und die Migrationsfähigkeit der MCF-7-Zellen

Der Einfluss von AP-1-Faktoren auf die Invasivität wurde vielfach untersucht. Besonders für Fra-1 gibt es viele Studien, die eine Beeinflussung des invasiven Verhaltens und der Migrationsfähigkeit von Zellen belegen. Die Rolle von Fra-2 bei diesen Vorgängen in der Tumorprogression ist weniger gut beleuchtet.

Grundsätzlich müssen Karzinomzellen in der Lage sein, die Basalmembran zu durchdringen, um sich invasiv ausbreiten zu können. Diese Fähigkeit ist sowohl für die lokale Gewebeinvasion als auch für das Einwandern in das Gefäßsystem und damit für die Metastasierung notwendig. Um zu untersuchen, ob gesteigerte Fra-2-Expression die ursprünglich geringe Invasivität der MCF-7-Zellen beeinflusst, wurde das Matrigel™-Invasionsassay verwendet, in dem eine der Basalmembran ähnelnde Schicht auf einer porösen Membran aufgetragen ist. Die Anzahl der Zellen, die in der Lage waren, diese Schicht zu durchdringen und durch die Poren zu wandern, wurde bestimmt und ausgewertet. Der gleiche Versuchsaufbau wurde zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit genutzt, wobei die Zellen statt der Matrigel-Schicht nur die poröse Membran durchwandern mussten (siehe 2.2.1.6). Dabei zeigte sich eine reproduzierbare Steigerung der Invasivität sowohl bei den MCF-7-pFra-2/pool Zellen (1,97-fach) als auch bei dem Klon MCF-7-pFra-2/T6 (4,64-fach) im Vergleich mit der Negativkontrolle MCF-7-p (Abbildung 11). Für den MCF-7-pFra-2/T6-Klon war diese Änderung signifikant. Die Migrationsfähigkeit der Zellen war dagegen nicht reproduzierbar beeinflusst.

Bei dem Parallelversuch mit Fra-2-Ausschaltung durch siRNA in MDA-MB231-Mammakarzinomzellen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Invasivität, was zu den Ergebnissen dieser Arbeit passt. Bei der Zellmigration zeigte sich aber ein anderes Ergebnis, eine signifikante Reduktion der Zellmigration (Milde-Langosch et al. 2008, Wagner 2008).

In der Arbeit von Schröder et al. fanden sich bezüglich der Invasivität und des Migrationspotentials Ergebnisse, die zu der hier vorliegenden Arbeit passen. Fra-2-transfizierte MCF-7- und MDA-MB231-Zellen zeigten auch dort eine Steigerung der Invasivität und keine gesteigerte Motilität (Schröder 2009, Schröder et al. 2009).

In einer ausführlichen Untersuchung der Wirkung von Fos-Proteinen auf die Zellbeweglichkeit fanden Tkach et al. nach Transfektion mit Fra-2 keine verstärkte Motilität der wenig beweglichen murinen Adenokarzinomzellen CSML0, wie es im Gegensatz nach Fra-1- und c-Fos-Transfektion der Fall war. Umgekehrt zeigte sich bei den sehr beweglichen fibroblastoiden L929-Zellen nach Ausschaltung von Fra-2, Fra-1 und c-Fos durch Antisense-Plasmide eine stark reduzierte Motilität der Zellen, was für einen positiven Einfluss von Fra-2 auf die Motilität unter bestimmten Umständen hindeutet. Die Autoren folgerten, dass Fos-Proteine unterschiedliche Rollen bei der Regulierung der Zellmotilität in verschiedenen Zelllinien spielen, vermutlich durch Dimerisierung mit verschiedenen Partnern und dadurch Bindung an unterschiedliche Enhancer-Regionen von Zielgenen (Tkach et al. 2003).

4.6 Einfluss von Fra-2 auf die Expression an der Invasion beteiligter und anderer Zielgene

Um invasiv wachsen zu können, müssen Tumorzellen in der Lage sein, Komponenten der ECM wie zum Beispiel die Basalmembran zu degradieren. In diesem Prozess sind verschiedene Proteinasen involviert, unter anderem die Mitglieder des uPA/uPAR/PAI-1-Proteinasesystems und die Matrix-Metalloproteinasen. In den Promotorregionen der entsprechenden Gene sind TREs (TPA response elements) vorhanden, die eine Regulierung durch AP-1-Mitglieder ermöglichen (Dang et al. 1999, Nerlov et al. 1991, Westermarck und Kähäri 1999). Unter diesem Aspekt wurde hier nach einem Einfluss der Fra-2-Überexpression auf die Expression ausgewählter Mitglieder der Proteinase-Systeme (MMP-1, MMP-3, uPAR und PAI-1) auf Proteinebene gesucht.

Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen in der Expression der o.g. Proteine, weder bei den polyklonalen MCF-7-pFra-2/pool-Zellen und noch bei dem Klon MCF-7-pFra-2/T6. Es fand sich zwar eine Tendenz zu einer erhöhten PAI-1-Expression bei beiden Zellarten, diese war jedoch nicht signifikant.

In der Studie von Andersen et al. konnte Fra-2 in der murinen Adenokarzinom-Zelllinie CSML0 nur sehr schwach uPAR- (und uPA-) Expression induzieren und hatte keinen Effekt auf die PAI-1-Expression (Andersen et al. 2002). Milde-Langosch et al. fanden nach transienten Transfektionen mit Fra-2 (und Fra-1) in MCF-7 eine starke Expression von PAI-1, während die MMP-1-Expression nicht beeinflusst war. In der gleichen Studie zeigte die Untersuchung vom klinischen Tumormaterial von 75 Mammakarzinomen positive Korrelationen zwischen Fra-2 und PAI-1, wie auch zwischen phosphoryliertem Fra-2 und MMP-1, es fand sich jedoch keine Korrelation mit der uPAR-Expression (Milde-Langosch et al. 2004). Über den Einfluss von Fra-2 auf MMP-3 fanden sich in der Literatur keine Hinweise.

Diese Erkenntnisse der verschiedenen Autoren sprechen dafür, dass die Expression der untersuchten, an der Invasion beteiligten Proteine nicht allein durch Fra-2 reguliert wird, sondern auch andere, zellspezifische Faktoren dabei eine Rolle spielen. Die Erhöhung der Invasivität nach Fra-2-Überexpression ist jedoch vermutlich auf andere, hier nicht untersuchte Proteasen zurück zu führen.

Interessante Ergebnisse zeigten sich, nachdem die in dieser Arbeit generierten stabil transfizierten Zellen in der Arbeitsgruppe weiter untersucht wurden. In cDNA-Microarray-Analysen wurde nach Zielgenen von Fra-2 gesucht. Es fanden sich mehr supprimierte als hochregulierte Gene, was einem inhibitorischen Effekt von Fra-2 auf TRE-enthaltende Promotoren in vitro entspricht. Viele dieser Gene sind involviert in Vorgänge wie die Zelladhäsion, Zellmotilität, Invasion, Proliferation oder Regulation der Transkription, z.B. ALCAM, ADAMTS1, TIMP2, Connexin 43, IL24 oder Id3 (Milde-Langosch et al. 2008).

In einer späteren Arbeit von Schröder et al. wurde die Rolle von Fra-2 eingehender untersucht und es wurde eine Schlüsselwirkung von Fra-2 gefunden. Es wurde in Fra-2-transfizierten Zellen mit Hilfe von cDNA-Microarray Chips nach Fra-2-Zielgenen gesucht, die an der Metastasierung beteiligt sind. Dabei fanden sich wenige Proteinasen, deren Expression durch Fra-2 beeinflusst war. Es zeigte sich aber für auffällig viele an der Adhäsion beteiligte Gene eine Beeinflussung durch Fra-2, z.B. für das Gap-Junction-Protein Connexin 43, ICAM1, L1-CAM, Integrin beta 2, Integrin beta 4 und Integrin alpha 6. In der gleichen Studie fand sich für Fra-2-transfizierte MCF-7- und MDA-MB231-Mammakarzinomzellen in Zellflusseexperimenten und Adhäsionsassays eine erhöhte Adhäsion an Komponenten von Endothel und ECM. So scheint die Wirkung von Fra-2 in der Tumorprogression und Metastasierung, zumindest beim Mammakarzinom, über eine Deregulation von Genen, die an der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt sind, zustande zu kommen (Schröder 2009, Schröder et al. 2009).

Die Zelladhäsion spielt eine entscheidende Rolle bei der Invasion und Migration der Tumorzellen und dadurch auch bei der Metastasierung. Im ersten Schritt muss sich die transformierte Zelle von Epithelverband lösen, dabei ist die Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion essentiell. Im nächsten Schritt haftet sie sich an die extrazelluläre Matrix. Danach wird die ECM am vorderen Zellpol durch Proteinase abgebaut. Beim dritten Schritt erfolgt die Migration des an ECM-Komponenten gehefteten Zellkörpers durch die abgebaute Matrix (Liotta 2016, Wagener und Müller 2010b, Yamaguchi und Condeelis 2007). Auch bei der Invasion in das Gefäßsystem und der Extravasation ist die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel und die ECM-Komponenten essentiell, somit ist die Adhäsion auch für die Fernmetastasierung von Bedeutung.

Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit fand sich in der o.g. Studie von Schröder et al. ein signifikant gesteigertes Invasionspotential der Fra-2-überexprimierenden Zellen, wobei die Proliferation und die Motilität nicht beeinflusst waren. Außerdem zeigte sich in Tumormaterial von 167 Patienten eine Korrelation von hoher Fra-2-Expression mit Lymphknotenbefall und reduziertem krankheitsfreien Überleben (Schröder 2009, Schröder et al.

2009). Einen solchen Zusammenhang hatten bereits Milde-Langosch et al. an einem Kollektiv von 75 Mammakarzinomen gefunden (Milde-Langosch et al. 2004).

Obwohl Fra-2 eine transaktivierende Domäne fehlt und dieser AP-1-Faktor nicht in der Lage ist, artifizielle Promotoren zu aktivieren (Tulchinsky 2000) wird er immer wieder im Zusammenhang mit der Tumorprogression beschrieben. Die Daten aus der vorliegenden Arbeit und der weiteren vorgestellten Studien deuten insgesamt darauf hin, dass Fra-2 einen bedeutenden Einfluss auf die Tumorprogression und Metastasierung ausübt. Dieser Einfluss ist beim Mammakarzinom vermutlich in Veränderungen der Invasivität sowie der Adhäsionseigenschaften der Zellen begründet. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass Fra-2-Überexpression auch andere Auswirkungen beim Mammakarzinom hat. Es werden auch weitere Studien vonnöten sein, um die Rolle von Fra-2 bei der Progression des Mammakarzinoms in vivo zu klären.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors Fra-2 in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 untersucht.

Durch stabile Transfektion mit einem die Fra-2-Sequenz enthaltenden Vektor wurden zuerst Fra-2-überexprimierende Zellen etabliert. Die Überexpression nach Antibiotikum-Selektion wurde auf Proteinebene im Western Blot bestätigt. Es wurden Klone isoliert, von denen einer (MCF-7-pFra-2/T6) wegen seiner hohen Fra-2-Expression ausgewählt und weiter untersucht wurde. Dieser Klon und ein polyklonales „Gemisch“ von Fra-2-transfizierten Zellen (MCF-7-pFra-2/pool) wurden in allen Versuchen mit einer Negativkontrolle verglichen, die nur mit dem Leervektor transfiziert war.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte keinen Effekt der erhöhten Fra-2-Expression auf die Morphologie der MCF-7-Zellen. Die Proliferation, untersucht im MTT-Test, war ebenfalls nicht durch Fra-2 beeinflusst. Bei der Expression an der Proliferation beteiligter Zielgene (Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D1, Cyclin E und Rb) fanden sich keine eindeutigen Veränderungen durch Fra-2-Überexpression. Eine signifikante Herabregulation zeigte sich beim Zellzyklusinhibitor und Tumorsuppressor Rb2, ohne dass eine Förderung der Zellproliferation dadurch zu beobachten war.

Eine deutliche Steigerung wurde bei der Invasivität der Fra-2-überexprimierenden Zellen im Invasionsassay beobachtet, diese war für den Klon MCF-7-pFra-2/T6 signifikant. Die Migrationsfähigkeit der MCF-7-Zellen im Migrationsassay war jedoch nicht eindeutig durch die Fra-2-Überexpression beeinflusst.

Bei der Untersuchung an der Invasivität beteiligter Faktoren als Zielgene von Fra-2 (PAI-1, uPAR, MMP-1 und MMP-3) wurden auf Proteinebene keine signifikanten Veränderungen festgestellt, so dass diese nicht ursächlich an der erhöhten Invasivität beteiligt sein können.

Schließlich wurde die Wirkung der Fra-2-Überexpression auf die Expression anderer Mitglieder der AP-1-Familie (Fra-1, FosB, c-Fos, JunB, p-c-Jun und JunD) auf Proteinebene untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten

Änderungen außer einer Reduktion der p-c-Jun-Expression in dem polyklonalen Zellgemisch MCF-7-pFra-2/pool, die jedoch im Klon MCF-7-pFra-2/T6 nicht nachweisbar war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Fra-2 eine Rolle bei der Regulation der Invasivität von MCF-7-Mammakarzinomzellen spielt, die Proliferation und die Migrationsfähigkeit werden dagegen nicht beeinflusst.

Summary

In the present work, the role of the transcription factor Fra-2 in the mammary carcinoma cell line MCF-7 was studied.

By stable transfection with a vector containing the Fra-2 sequence, Fra-2-overexpressing cells were first established. Overexpression after antibiotic selection was confirmed at the protein level in Western blot. Clones were isolated, one of which (MCF-7-pFra-2 / T6) was chosen for its high Fra-2 expression and further investigated. This clone and a polyclonal "batch" of Fra-2 transfected cells (MCF-7-pFra-2 /pool) were compared in all experiments with control cells transfected only with the empty vector.

Microscopic examination showed no effect of increased Fra-2 expression on the morphology of the MCF-7 cells. The proliferation examined in MTT assay was also unaffected by Fra-2. Expression of proliferation-related target genes (cyclin A, cyclin B, cyclin D1, cyclin E and Rb) did not reveal any clear changes due to Fra-2 overexpression. Significant downregulation was seen in the cell cycle inhibitor and tumor suppressor Rb2, without stimulating cell proliferation.

A marked increase was observed in the invasiveness of the Fra-2 overexpressing cells in the invasion assay, which was significant for the clone MCF-7-pFra-2 / T6. However, the migration ability of the MCF-7 cells in the migration assay was not clearly influenced by Fra-2 overexpression.

Investigations into factors involved in invasiveness as target genes of Fra-2 (PAI-1, uPAR, MMP-1 and MMP-3) revealed no significant changes at the

protein level, so that they could not be causally involved in the increased invasiveness.

Finally, the effect of Fra-2 overexpression on the expression of other members of the AP-1 family (Fra-1, FosB, c-Fos, JunB, p-c-Jun and JunD) was examined at the protein level. There were no significant changes except a reduction of p-c-Jun expression in the polyclonal cell batch MCF-7-pFra-2 / pool, which was not detectable in the clone MCF-7-pFra-2 / T6.

The results of this work show that Fra-2 plays a role in the regulation of the invasiveness of MCF-7 mammary carcinoma cells, but does not affect proliferation and migration ability.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFT	activating transcriptional factor
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AI	Aromatase-Inhibitoren
ALH	atypische lobuläre Hyperplasie
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	activating protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BRCA	Breast-Cancer-Gene
bZIP	basic leucine zipper
CAP	College of American Pathologists
CDK	cyclin dependent kinases, Zyklin-abhängige Kinasen
CDKI	CDK-Inhibitor
CMV	Cytomegalievirus
CRE	cAMP-responsive elements
DCIS	duktales Karzinom in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition

ER	Östrogenrezeptor
FCS	fetal calf serum
Fra	Fos related antigen
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
HER2 oder HER2/neu	human epidermal growth factor receptor, type 2
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HRP	horseradish peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer
IHC	Immunhistochemie
JDP	Jun dimerisation partner
LCIS	lobuläres Karzinom in situ
LDLR	Low-Density-Lipoproteinrezeptoren
MAPK	mitogen activated protein kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
NK	Negativkontrolle
NST	no special type
OFS	Ovarialfunktionssuppression
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	phosphate buffered saline
PET	Polyethylenterephthalat
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastoma-Protein
Rb2	Retinoblastoma-Protein 2
RBL1	Retinoblastoma like-Protein 1
RKI	Robert Koch-Institut
SDS	sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Tab. Tabelle

TEMED Tetramethylethyldiamin

TGF- β transformierender Wachstumsfaktor-beta

TIMP Tissue Inhibitor of Metalloproteases

TNM-Klassifikation Tumour-Node-Metastasis-Klassifikation

TPA 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat

TRE TPA responsive elements

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UICC Union Internationale Contre le Cancer

UKE Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf

uPA Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp

uPAR uPA-Rezeptor

WHO World Health Organisation

7 Literaturverzeichnis

Acquaviva C, Ferrara P, Bossis G, Brockly F, Salvat C, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M (2001) Degradation of cellular and viral Fos proteins. *Biochimie* 83: 357-362

AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie) 2017 Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs Herausgegeben von der Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2017-03/AGO_deutsch/PDF_Gesamtdatei_deutsch/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2017.pdf

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN (1987) A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells *Cancer Res* 15(12):3239-45

American Cancer Society 2017 <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html> (zuletzt abgerufen am 31.01.2017)

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*. 2002 Jul 18;21(31):4843-8

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

Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int. J. Cancer*, 72: 1–22. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970703)72:1<1::AID-IJC1>3.0.CO

Angel P, Hess J (2010) The Multi-Gene Family of Transcription Factor AP-1. In Handbook of Cell Signaling by Bradshaw RA and Dennis EA (Eds.) Second edition, Elsevier/Academic Press, Amsterdam/Boston 2010. 2059-2068

Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Volume 1072, Issue 2, Pages 129-157

Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A (2004) Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth Oncogene. 2004 Sep 9;23(41):6986-90

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*. 1999 Oct 22;84(5):533-8.

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*. 2001 Sep;127(9):545-50

Baum F (2014) Pathologie benigner und maligner Brustveränderungen In: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, Fischer U, Baum F (Hsg) Georg Thieme Verlag KG Stuttgart 18-22

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg) (2012) Pathologie, 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München 124-159

Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ & Panel Members (2015) Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 *Annals of Oncology* 26: 1533–1546, doi:10.1093/annonc/mdv221

DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M (2004) Proteases, Extracellular Matrix, and Cancer: A Workshop of the Path B Study Section. *The American Journal of Pathology*.

2004;164(4):1131-1139.

Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M (2014) uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Research : BCR*. 2014;16(4):428

El-Deiry WS 2016 p21(WAF1) mediates cell cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy. *Cancer research* 2016;76(18):5189-5191

Farman FU, Iqbal M, Azam M, Saeed M (2018) Nucleosomes positioning around transcriptional start site of tumor suppressor (Rb1/p130) gene in breast cancer *Mol Biol Rep*. 2018 Apr;45(2):185-194

Fedi P, Tronick S, Aaronson S (1997) Growth factors. In: *Cancer Medicine*, 4th ed. Holland J, Bast R, Morton D, Frei E, Kufe D, Weichselbaum R (eds.), Williams and Wilkins 1997, Baltimore

Fiorentino FP, Macaluso M, Miranda F, Montanari M, Russo A, Bagella L, Giordano A (2011) CTCF and BORIS regulate Rb2/p130 gene transcription: a novel mechanism and a new paradigm for understanding the biology of lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2011 Feb;9(2):225-33

Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of Cell Biology*. 2010;188(1):11-19.

Gätje R, Eberle C, Scholz C, Lübke M, Solbach C, Muschel K, Kissler S, Siedentorf F, Weißenbacher T, Debus G, Schumacher I, Lato K, Sängler N (2015) *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 275-302

Galderisi U, Jori FP, Giordano A (2003) Cell cycle regulation and neural differentiation *Oncogene* 2003 22, 5208–5219

Garbett EA, Reed MWR, Stephenson TJ, Brown NJ (2000) Proteolysis in human breast cancer. *Molecular Pathology*. 2000;53(2):99-106.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. 2013 Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology* 24(9):2206-2223

Goldhirsch A., Wood W. C., Coates A. S., Gelber R. D., Thurlimann B. & Senn H.-J (2011) Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 *Annals of Oncology* 8:1736-1747

Hai T, Curran T (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(9):3720-3724

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Harbeck N, Liedtke C (2016) Kapitel 4.1.1 Mammakarzinom, In: Molekulare Gynäkologie und Geburtshilfe für die Praxi, Rody A und Liedtke C (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG Stuttgart 163-140

Kharman-Biz A, Gao H, Ghiasvand R, Zhao C, Zendejdel K, Dahlman-Wright K. Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:441

Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996 Feb 29;351(1336):127-34

Karin M, Liu Zg, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Apr;9(2):240-6

Kwaan HC, Wang J, Svoboda K, Declerck PJ (2000) Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *British Journal of Cancer*. 2000;82(10):1702-1708

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ (eds) (2012) WHO Classification of Tumours of the Breast, WHO/IARC Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 4

Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988 Jun 24;240(4860):1759-64

Liotta LA (2016) Adhere, Degrade, and Move: the three-step model of invasion, *Cancer Res.* 2016 June 01; 76(11): 3115–3117.

Mechta F, Lallemand D, Pfarr CM, Yaniv M (1997) Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene.* 1997 Feb 20;14(7):837-47

Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer* 2005 Nov;41(16):2449-61. Epub 2005 Sep 30

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, 468–472

Milde-Langosch K, Goemann C, Methner C, Rieck G, Bamberger A-M, Löning T (2001) Expression of Rb2/p130 in breast and endometrial cancer: correlations with hormone receptor status. *British Journal of Cancer.* 2001;85(4):546-551

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): 337-347

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.* 2003 Feb;77(3):265-75

Milde-Langosch K, Röder H, Andritzky B, 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.* 2004 Jul;86(2):139-52

Moquet-Torcy G, Tolza C, Piechaczyk M, Jariel-Encontre I (2014) Transcriptional complexity and roles of Fra-1/AP-1 at the uPA/Plau locus in aggressive breast cancer. *Nucleic Acids Research* 2014;42(17):11011-11024

Müller M, Graeve L (2014) Proteine – Mechanismen ihres Abbaus In: Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2014

Nakayama T, Hieshima K, Arao T, Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Yamada Y, Fujii M, Oiso N, Kawada A, Nishio K, Yoshie O (2008) Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene*. 2008 May 22;27(23):3221-32. Epub 2007 Dec 10

Nerlov C, Rørth P, Blasi F, Johnsen M. (1991) Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene*. 1991 Sep;6(9):1583-92.

Netzker R (2016) Der Zellzyklus. In: Duale Reihe Biochemie, 4. Auflage, Rossow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (Hrsg.): Georg Thieme Verlag KG Stuttgart 528-532

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(9):3619-3623.

Ortiz AB, Garcia D, Vicente Y, Palka M, Bellas C, Martin P (2017) Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. Ahmad A, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(11):e0188068

Robert Koch-Institut / Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, *Kapitel Brustkrebs* 36-39

Robert Koch-Institut / Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2017) Krebs in Deutschland 2013/2014 *11.Ausgabe*: 16-23

Rüschoff J (2014) Pathologie benigner und maligner Brustveränderungen In: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, Fischer U, Baum F (Hrsg) Georg Thieme Verlag KG Stuttgart 23-46

Paggi MG, Giordano A (2001) Who is the boss in the retinoblastoma family? The point of view of Rb2/p130, the little brother *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4651-4

Paulsen F, Waschke J (2017) Sobotta, Atlas der Anatomie Band 1 (Aufl. 24) 153. <https://institut.elsevierelibrary.de/pdfreader/sobotta-atlas-der-anatomie-band-1-auf-24/153>

Perou CM, Sörlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey S, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ö, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406 747–752

Riede UN, Werner M (Hrsg) (2017) Allgemeine und spezielle Pathologie, 2. Auflage, Berlin, Springer 709-721

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*. 1991 Apr;6(4):533-42.

S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.0, 2017 AWMF Registernummer: 032-045OL, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):

<http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
(zuletzt abgerufen am:15.05.2018)

Scambia G, Lovergine S, Masciullo V (2006) RB family members as predictive and prognostic factors in human cancer. *Oncogene Aug 28;25(38):5302-8*

Schnitt S, Lakhani S, Anderson B, Mathew B, Rajkumar T, World Health Organization / International Agency for Research on Cancer (IARC) (2014) *World Cancer Report 2014, Chapter 5.2. Breast cancer: 362-373*

Schröder C (2009) Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors Fra-2 in der Invasivität und Progression des humanen Mammakarzinoms, Dissertation, Universität Hamburg

Schröder C, Schumacher U, Müller V, Wirtz RM, Streichert T, Richter U, Wicklein D, Milde-Langosch K (2010) The transcription factor Fra-2 promotes mammary tumour progression by changing the adhesive properties of breast cancer cells *Eur J Cancer*. 2010 Jun;46(9):1650-60

Shaulian E, Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival *Oncogene*. 2001 Apr 30;20(19):2390-400

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409-1416

Stewart BW, Wild CP (eds) (2014) World Health Organization / International Agency for Research on Cancer (IARC) *World Cancer Report 2014: 16-53*

Suzuki T, Okuno H, Yoshida T, Endo T, Nishina H, Iba H (1991) Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Research.* 1991;19(20):5537-5542.

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

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.* 2003 Aug 7;22(32):5045-54

Trop-Steinberg S, Azar Y (2017) AP-1 Expression and its Clinical Relevance in Immune Disorders and Cancer. *Am J Med Sci.* 2017 May;353(5):474-483. doi: 10.1016/j.amjms.2017.01.019. Epub 2017 Feb 1

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

(Verde P1, Casalino L, Talotta F, Yaniv M, Weitzman JB (2007) Deciphering AP-1 function in tumorigenesis: fra-ternizing on target promoters *Cell Cycle.* 2007 Nov 1;6(21):2633-9

Vihinen P, Kähäri VM (2002) Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer,* 99: 157–166. doi:10.1002/ijc.10329

Wagener C, Müller O (2010) a. Mechanismen der Tumorentstehung, In: *Molekulare Onkologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 106-110*

Wagener C, Müller O (2010) b. Maligne Progression: molekulare Grundlagen und klinische Bedeutung, In: *Molekulare Onkologie, Wagener C, Müller O, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 283-323*

Wagener C, Müller O (2010) c. Mechanismen der malignen Progression. In: Molekulare Onkologie, Wagener C, Müller O, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 324-384

Wagner I (2008) Untersuchungen zur Rolle der Transkriptionsfaktoren Fra1 und Fra2 in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231, Dissertation, Universität Hamburg

Westermarck J, Kähäri VM (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion *FASEB J.* 1999 May;13(8):781-92

Xue Jun H, Gemma A, Hosoya Y, Matsuda K, Nara M, Hosomi Y, Okano T, Kurimoto F, Seike M, Takenaka K, Yoshimura A, Toyota M, Kudoh S (2003) Reduced transcription of the RB2/p130 gene in human lung cancer *Mol Carcinog.* 2003 Nov;38(3):124-9

Yamaguchi H, Condeelis J (2007) Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et biophysica acta.* 2007;1773(5):642-652

Yoshida T, Sato H, Iba H (1991) Transcription of fra-2 mRNA and phosphorylation of Fra-2 protein are stimulated by serum. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Jan 31;174(2):934-9

Yoshida T, Suzuki T, Sato H, Nishina H, Iba H (1993) Analysis of fra-2 gene expression *Nucleic Acids Res.* 1993 Jun 11; 21(11): 2715–2721

Zhang W, Hart J, McLeod HL, Wang HL (2005) Differential expression of the AP-1 transcription factor family members in human colorectal epithelial and neuroendocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2005 Jul;124(1):11-19

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.* 2000 Aug 17;19(35):4011-21

8 Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Dr. rer. nat. habil. Karin Milde-Langosch für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und ihre exzellente wissenschaftliche und sehr herzliche Betreuung während der Durchführung und Auswertung der Arbeit. Weiterhin bedanke ich mich für ihre Geduld, diese Arbeit zu Ende zu begleiten.

Für die Einarbeitung in die Zellkultur und in die speziellen Labortechniken danke ich Gabrielle Rieck und Bianca Kelp, damals im Institut für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE).

Weiterhin danke ich Dr. rer. nat. Volker Aßmann aus dem Institut für Tumorbologie des UKE für die Bereitstellung des Plasmides pIRES-P.

Für die nette Atmosphäre im Labor bedanke ich mich bei meinen damaligen Mitdotorandinnen Ines Wagner, Dr. rer. nat. habil. Christine Stürken, Christin Johnsen, Marine Oberndörfer, Christine Tirok und Xitama Álvarez Díaz.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann und meiner Mutter, ohne ihre Unterstützung wäre die Beendigung des Projekts „Doktorarbeit“ nicht möglich gewesen.

9 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten

10 Eidesstattliche Erklärung

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Stanislava Thiele