

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. Christoph Thomssen

**Immunhistochemische und proteinbiochemische  
Untersuchungen zur Expression des  
Ets-Transkriptionsfaktors Elf-1 im  
invasiven Mammakarzinom**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Alice Antoinette Gerloff  
geboren am 02. Juni 1981 in Magdeburg

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer  
2. Prof. Dr. med. Achim Rody (Lübeck)  
3. Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst (Jena)

01.03.2012

08.11.2012

## Referat

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle des Ets-Transkriptionsfaktors Elf-1 beim invasiven Mammakarzinom. Elf-1 kann die Kanzerogenese u. a. durch Regulation von mitotischer Aktivität, Tumorzellmigration und Tumorangiogenese beeinflussen. Seine Expression wurde bei einigen Malignomen bereits nachgewiesen.

Ein Patientenkollektiv von 125 invasiven Mammakarzinomen wurde immunhistochemisch auf die Expression von Elf-1 untersucht. Bei einem weiteren Kollektiv von 90 invasiven Mammakarzinomen erfolgte die Beurteilung mittels Westernblotuntersuchung. Beide Methoden konnten das Vorkommen von Elf-1 nachweisen.

Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Elf-1 Expression und der Expression der etablierten Prognosefaktoren uPA und PAI-1 sowie mit der Expression des tumorrelevanten Faktors ARHGDIB. Diese werden mit vermehrter Invasivität in Zusammenhang gebracht. Entsprechend ließ sich in der Westernblotuntersuchung in größeren Tumoren eine höhere Elf-1-Expression nachweisen. Dagegen widerspricht der in der immunhistochemischen Untersuchung gesehene Zusammenhang zwischen Elf-1-Expression und guter Differenzierung des Tumors sowie dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen dieser Annahme. Ein Einfluss auf die Tumormetastasierung und Mortalität ließ sich nicht nachweisen. Die Ergebnisse der Untersuchung deuten auf eine komplexe Einflussnahme des Ets-Transkriptionsfaktors Elf-1 auf die Tumorprogression beim invasiven Mammakarzinom hin.

Gerloff, Alice Antoinette: Immunhistochemische und proteinbiochemische Untersuchungen zur Expression des Ets-Transkriptionsfaktors Elf-1 im invasiven Mammakarzinom  
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 54 Seiten, 2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
1.1	Das invasive Mammakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms	1
1.1.3	Histologische Klassifikation und Grading	3
1.1.4	Klinik, Therapie und prognostische sowie prädiktive Faktoren	4
1.2.	Elf-1 – ein Ets-Transkriptionsfaktor	7
1.3.	Weitere prognostische und prädiktive Faktoren	9
1.4.	Zielstellung	12
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden:</b>	<b>13</b>
2.1	Untersuchungsgut (Kollektiv 1 und 2)	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Immunhistochemische Untersuchung	13
2.2.2	Westernblotanalyse	17
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Zusammenstellung der klinisch-pathologischen Faktoren für die Patientenkollektive 1 und 2	22
3.1.1	Klinisch-pathologische Faktoren im Patientenkollektiv 1	22
3.1.2	Klinisch-pathologische Faktoren im Patientenkollektiv 2	22
3.1.3	Vergleich der klinisch-pathologischen Faktoren bei den Patientenkollektiven 1 und 2	23
3.2	Elf-1 Expression im Vergleich zu klinisch-pathologischen Faktoren	25
3.2.1	Elf-1 und klinisch-pathologische Faktoren im Patientenkollektiv 1	25
3.2.2	Elf-1 und klinisch-pathologische Faktoren im Patientenkollektiv 2	30
3.2.3	Elf-1 Expression und Überleben	35
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>37</b>
4.1	Elf-1 beim invasiven Mammakarzinom	37
4.1.1	Elf - 1 – Expression und klinisch-pathologische Prognosefaktoren	37
4.1.2	Elf - 1 – Expression und neuere Prognosefaktoren	41
4.1.3	Zusammenfassung	42
4.2	Schlussfolgerung	43
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>Thesen</b>	<b>54</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ARHGDI B:	Aplysia Ras homolog GDP dissociation inhibitor B (RHO-GDI-β)
BRCA:	breast cancer susceptibility gene
°C:	Grad Celsius
ChIP:	Chromatin-Immun-Präzipitation
CMF:	Chemotherapie-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluoruracil)
DCIS:	Duktales carcinoma in situ
ECM:	extracellular matrix
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF:	epidermal growth factor
EGFR:	epidermal growth factor receptor
ELF-1:	E74-like Factor 1
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ER:	Estrogenrezeptor
ERK:	extracellular-signal-regulated kinase
Ets1:	E26 transformation specific sequence
GDI:	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GTPase:	Guanosintriphosphatase
HCG:	human chorionic gonadotropin
Her2/neu:	human epidermal growth factor 2
HR:	Hormonrezeptor
hPgo2:	Human Pygopus 2
i. R.:	im Rahmen
IRS-Score:	immuno reactive score
kDa:	kilo Dalton
LCIS:	Lobuläres Carcinoma in situ
MCF-7:	Brustkrebszelllinie
MDA-MB-31:	Brustkrebszelllinie
mg:	Milligramm
MMPs:	Matrix-Metalloproteasen
mRNA:	messenger ribonucleic acid
μl:	Mikroliter
μm:	Mikrometer
NCHG:	Nottingham combined histological grade
neg.:	negative

nm:	Nanometer
p:	probability (Signifikanzwert)
p53:	Tumorsupressor p53
PAI-1:	plasminogen activator inhibitor 1
PBS:	phosphate buffered saline
PP:	Prozent positiv gefärbter Zellen i. R. IRS
PR:	Progesteronrezeptor
PKC:	Proteinkinase C
pos.:	positive
PVDF:	Polyvinylidenfluorid
Rb:	Retinoblastoma-protein
Rho:	Ras homologous
Rho-GDI:	Rho GDP dissociation inhibitor
RNA:	ribonucleic acid
RKI:	Robert Koch Institut
RT:	Raumtemperatur
SBLA-Syndrom:	sarcoma, breast, leukemia, and adrenal gland (SBLA) syndrome
SBR:	Scarff-Bloom-Richardson Classification
SI:	Signal (Färbe) – Intensität i. R. IRS
TCR $\zeta$ :	Zeta-Kette des T-Zell-Rezeptors
Tie2:	Angiopoetinrezeptor (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2)
u.a.:	unter anderem
uPA:	urokinase-type plasminogen activator
uPAR:	urokinase-type plasminogen activator receptor
vs.:	versus
WHO:	Weltgesundheitsorganisation
z.B.:	zum Beispiel
$\chi^2$ -Test:	Chi <sup>2</sup> -Test nach Pearsson

# **1. Einleitung und Zielstellung**

## **1.1 Das invasive Mammakarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

In Deutschland und anderen Industrieländern ist das Mammakarzinom das am häufigsten vorkommende und das am häufigsten zum Tode führende Malignom der Frau. Die Inzidenz epithelialer Tumoren der Mamma hatte in den vergangenen Jahren zunächst kontinuierlich zu- und zuletzt abgenommen. Sie liegt heute bei 100 von 100.000 Frauen. Somit ist hierzulande jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens von Brustkrebs betroffen, ca. 18.000 sterben jährlich an ihrem Tumor. Der Häufigkeitsgipfel des Mammakarzinoms liegt im Menopausenalter (Robert-Koch-Institut Hrsg., 2006).

### **1.1.2 Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms**

Es wird davon ausgegangen, dass bei der Entstehung benigner und maligner Tumoren umweltbedingte und endogene Faktoren bzw. nicht-genetische sowie genetische und epigenetische Faktoren zusammenspielen.

Als bedeutende tumorfördernde Faktoren beim Mammakarzinom gelten die Sexualhormone Östrogen und Progesteron. Diese sind in Serum und Urin von Patientinnen mit invasivem Karzinom der Mamma um bis zu 15% erhöht und greifen über eine Steigerung der mitotischen Aktivität in die Kanzerogenese ein (Trichopoulos et al., 1987; Wysowski et al., 1987). Die Bedeutung der Steroidhormonrezeptoren (Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor) als prognostische Faktoren beim Mammakarzinom wird im Abschnitt 1.1.3 erläutert.

Den Konzentrationen und Wirkungen der Sexualhormone wird es zugeschrieben, dass Frauen mit früher Menarche bzw. später Menopause, und damit einer hohen Anzahl an ovulatorischen Zyklen, ein erhöhtes Risiko haben, an Brustkrebs zu erkranken. Dagegen führt das Stillen, welches postpartal ovulatorische Zyklen mit regulärer Hormonausschüttung verzögert, zu einer Verringerung des Risikos (Newcomb et al., 1994). Auch der Zeitpunkt und die Anzahl ausgetragener Schwangerschaften beeinflussen das Erkrankungsrisiko. So ist das Risiko einer Nullipara deutlich erhöht gegenüber dem einer Multipara, wobei sich frühe Schwangerschaften deutlich günstiger als späte auswirken (Russo et al., 2005). Die Rolle exogener Sexualhormone, wie Kontrazeptiva und Hormonersatzpräparate, in der Kanzerogenese war ebenfalls Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. So erhöht eine über fünf Jahre andauernde perimenopausale Hormontherapie das Erkrankungsrisiko auf das 1,32-fache (Chen et al., 2002, Berclaz et al., 2004). Neueren Untersuchungen zufolge ist der aktuell zu beobachtende Abwärtstrend der Brustkrebsinzidenz in den Industrienationen

durch den reduzierten Einsatz von perimenopausalen Hormontherapien in den vergangenen Jahren bedingt (Banks and Canfell, 2010).

Etwa 10% aller Mammakarzinompatientinnen haben eine genetische Disposition. Beispielsweise kann es sich hierbei um Mutationen im BRCA-1 (*BR*east *C*ancer-*A*ssociated-1)- oder BRCA-2-Gen handeln, die sich auf Chromosom 17 bzw. 13 befinden (Rogozinska-Szczepka et al., 2004). Entscheidend ist, wie viele Familienmitglieder welchen Verwandtschaftsgrades betroffen sind und ob ein bi- oder unilateraler Befall vorliegt. Ist eine Verwandte ersten Grades von Brustkrebs betroffen, so steigt das Erkrankungsrisiko einer Frau auf das 2- bis 3-fache. Weiterhin bestehen komplexe Zusammenhänge zwischen familiärer Vererbung und Faktoren wie Alter und Menopause.

Häufig beschrieben werden auch syndromatische Zusammenhänge zwischen dem Auftreten des Mammakarzinoms und anderer Tumoren, z.B. dem Ovarialkarzinom oder Leukämien im Kindesalter (SBLA-Syndrom).

Die weltweiten Inzidenzunterschiede können aber nicht nur auf genetische Ursachen zurückgeführt werden. Dies zeigen gerade Migrationsstudien. Bedeutend ist auch der Einfluss von Ernährung und Körpergewicht. So besteht ein positiver Zusammenhang zwischen dem Prokopfverbrauch an pflanzlichen und tierischen Fetten und der Inzidenz des Mammakarzinoms und der Mammakarzinom-bedingten Mortalität. Patientinnen mit therapiertem Brustkrebs und einem Body-Mass-Index über 30 haben ein höheres Rezidivrisiko und ein höheres Risiko an ihrem Tumor zu versterben als normalgewichtige Patientinnen (Maehle et al., 2001; Berclaz et al., 2004; Carmichael, 2006). Das Risiko postmenopausal an einem Mammakarzinom zu erkranken, ist für übergewichtige Frauen höher als für normalgewichtige (Million women study, Reeves et al., 2007). Ursächlich für den Zusammenhang zwischen Übergewicht und Krebsrisiko sind erhöhte Serumspiegel und lokale Konzentrationen des Hormons Östrogen (Cleary und Grossmann, 2009). Dosisabhängig werden auch Nikotingenuss (Band et al., 2002) und regelmäßiger Alkoholgenuss mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht. Alkoholfuhr ab 20 g pro Tag erhöht das Brustkrebsrisiko um 28%, bei postmenopausaler Hormontherapie sogar auf das Doppelte (Chen et al., 2002).

Weiterhin werden physikalische Einflüsse, insbesondere Röntgenstrahlen (Heyes et al., 2009), für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko verantwortlich gemacht. Ob im Falle der nationalen Brustkrebs-Screening-Programme der diagnostische Nutzen gegenüber dem durch die Röntgenstrahlung verursachten Erkrankungsrisiko überwiegt, wird kontrovers diskutiert (Law et al., 2007, Veronesi et al., 2009).

### 1.1.3 Histologische Klassifikation und Grading

Es gibt verschiedene histologische Typen des Mammakarzinoms. Zu unterscheiden sind die präinvasiven Vorläuferläsionen DCIS (ductales carcinoma in situ) und LCIS (lobuläres carcinoma in situ) von dem invasiven Mammakarzinom. Als invasives Mammakarzinom wird eine Gruppe epithelialer Tumoren der Brust bezeichnet, die durch Invasion des Tumors in das stromale Kompartiment der Brustdrüse charakterisiert sind. Ein großer Teil der invasiven Mammakarzinome sind Adenokarzinome und gehen von der sogenannten terminalen ductulolobulären Einheit der Brustdrüse aus.

Man unterscheidet das invasive duktale Karzinom, welches mit 65% bis 80% am häufigsten vorkommt, mit verschiedenen Untertypen, das invasive lobuläre Karzinom (etwa 10% der Fälle) und weitere seltenere histologische Typen (Tab. 1). Weiterhin gibt es endokrine Tumoren, die Hormone wie HCG, Calcitonin oder Adrenalin produzieren.

Tab. 1: Histologische Klassifikation des invasiven Mammakarzinoms (nach WHO)

<b>Histologische Klassifikation des Mammakarzinoms (WHO)</b>
<b>Nichtinvasive Karzinome</b> Duktales Carcinoma in situ (DCIS) Lobuläres Carcinoma in situ (LCIS)
<b>Invasive Karzinome</b> Invasive duktale Karzinome Invasive duktale Karzinome mit dominanter intraduktaler Komponente Invasive lobuläre Karzinome Muzinöse Karzinome Medulläre Karzinome Papilläre Karzinome Tubuläre Karzinome Adenoid-zytische Karzinome Sekretorische Karzinome Apokrine Karzinome Karzinom mit Metaplasie Sonstige Typen
<b>Pagetkarzinom der Mamille</b>

Das histologische Grading des Mammakarzinoms lässt als wichtiger klinisch-pathologischer Parameter (siehe Abschnitt 1.1.3), eine Aussage über die Prognose des Krankheitsverlaufes zu (Roynance et al., 1999; Buerger et al., 2001; Reis-Filho et al., 2003). Hierzu werden zelluläre Differenzierung, Kernpolymorphismen und Zahl der Mitosen mit je maximal 3 Punkten bewertet (Scarff-Bloom-Richardson-Klassifikation, SBR). Die erreichte Punktzahl ergibt den histologischen Grad (Tab. 2). Die modifizierte SBR, auch als NCHG (Nottingham combined histologic grade) bezeichnet, berücksichtigt nicht den Differenzierungsgrad und besitzt 5 Kategorien (Fitzgibbons et al., 2000).

Tab. 2: Klassifikation des histologischen Grading nach Scarff-Bloom-Richardson

Grad	Differenzierung	Punkte
1	<b>Gut differenziert</b>	3-5
2	<b>Mäßig differenziert</b>	6-7
3	<b>Schlecht differenziert</b>	8-9

#### 1.1.4 Klinik, Therapie und prognostische sowie prädiktive Faktoren

Tumoren der Brust werden häufig von den Patientinnen selbst durch Tastbarkeit, Schmerzen, Hautveränderungen oder Sekretion bemerkt oder sie werden als Zufallsbefund bei der Vorsorgeuntersuchung beim Gynäkologen bzw. im Rahmen der Sonographie oder der Mammographie diagnostiziert. Zu etwa 60% sind sie im äußeren oberen Quadranten der Brust lokalisiert.

Die Histologie des Tumors kann per Feinnadelpunktion, Probeentnahme oder Stanzbiopsie geklärt werden. Sie trägt zusammen mit weiteren prognostischen und prädiktiven Faktoren (z.B. Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Hormonrezeptorstatus) zur Entscheidung für eine individuelle Therapie bei. Tumorgröße und -ausdehnung, Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung werden hierbei entsprechend der TNM-Klassifikation in der sogenannten Tumorformel zusammengefasst, welche den Schweregrad der Erkrankung beschreibt (Tab. 3).

Tab. 3: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

<b>T</b>		<b>N</b>		<b>M</b>	
T0	kein Primärtumor nachweisbar	N0	kein Lymphknotenbefall	M0	keine
Tis	Carcinoma in situ	N1	axillärer Lymphknotenbefall, verschieblich		Fernmetastasen
T1a-c	<0,1 – 2,0 cm	N2a/b	axillärer Lymphknotenbefall, nicht verschieblich/an der A. thoracica interna	M1	Fernmetastasen
T2	2,0 – 5,0 cm				
T3	> 5,0 cm				
T4a-d	Infiltration von Brustwand oder Haut	N3	supra- oder infraclaviculärer Lymphknotenbefall		

Die Therapie des Mammakarzinoms erfolgt häufig zunächst operativ. Es werden brusterhaltende Verfahren von der totalen Mastektomie unterschieden, ggf. mit Lymphadenektomie (Axilladisektion), wobei hier der vorangehenden Wächter-Lymphknoten-Biopsie eine besondere Rolle als Staging-Instrument zukommt.

Anschließend können eine Chemotherapie (z.B. 5-Fluorouracil, Methotrexat, Cyclophosphamid, Anthracycline) oder eine antihormonelle Therapie (z.B. Tamoxifen)

erfolgen. Möglich sind auch eine präoperative Bestrahlung oder eine neoadjuvante Chemo- bzw. antihormonelle Therapie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2008).

Die Prognose beim Mammakarzinom hängt von vielen Faktoren ab. Dazu gehören Tumorgöße, axillärer Lymphknotenstatus, histologische Abgrenzung des Tumors, Grading und Hormonrezeptorstatus. Als prognostische Faktoren bezeichnet man Tumormerkmale, welche den Krankheitsverlauf unabhängig von der Therapie beeinflussen. Prädiktive Faktoren hingegen sind Merkmale einer Tumorerkrankung, welche helfen können, den Erfolg einer Therapie abzuschätzen und somit zur Auswahl der effektivsten Therapie beitragen.

Ein wichtiger prognostischer Faktor ist die Tumorgöße. Das Rezidivrisiko steigt mit zunehmendem Tumordurchmesser an (Rosen et al., 1989). Als noch aussagekräftiger bezüglich des Rezidivrisikos und somit als wichtiger prognostischer Faktor gilt der Lymphknotenstatus. Bei Lymphknoten-negativen Karzinomen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 80%, während sie bei Lymphknoten-positiven nur etwa 20% beträgt (Hilsenbeck et al., 1998, Harris et al., 2004).

Auch histologische Merkmale geben Hinweise auf den Krankheitsverlauf. Ein hohes Grading korreliert mit einem ungünstigen klinischen Verlauf bzw. einer hohen Metastasierungsrate und ist somit ebenfalls ein bedeutender prognostischer Faktor (Dawson et al., 1991, Henson et al., 1991, Simpson et al., 2000). Weiterhin sind bestimmte histologische Typen, wie z. B. das inflammatorische Mammakarzinom, mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Harris et al., 2004).

Auf das Vorhandensein der Steroidhormonrezeptoren Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) werden Mammakarzinome bereits seit Jahren routinemäßig immunhistochemisch untersucht. Diese spielen eine Rolle als prädiktive Marker für die Effizienz einer antihormonellen Therapie, wobei hier die Rolle des PR als eigenständiger Faktor kontrovers diskutiert wird (Clark et al., 1984; Stierer et al., 1995). Weiterhin werden beide Rezeptoren mit einer geringeren Proliferationsrate in Zusammenhang gebracht (Harris et al., 2004). Vor allem in Kurzzeitanalysen zeigte sich für ER-positive Tumoren ein deutlich reduziertes Rezidivrisiko im Vergleich zu ER-negativen Tumoren (Hilsenbeck et al., 1998; Crowe et al., 1991), jedoch verringert sich dieser Unterschied in Langzeitanalysen (Schmitt et al., 1997).

Der durch das Gen erbB2- kodierte Her2/neu-Rezeptor gehört zur Her (human epidermal growth factor receptor)-Familie, einer Gruppe von Transmembran-Rezeptortyrosinkinasen. Seine Überexpression wird mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht (Gullick et al., 1991, Andrulis et al., 1998). Als prädiktiver Faktor gibt er Hinweise für das gute Ansprechen auf eine Therapie mit Trastuzumab, einem humanisierten Antikörper gegen das Her2-Protein (Slamon et al., 2001), bzw.

das schlechte Ansprechen auf Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil und Methotrexat (Gusterson et al., 1992).

Ebenfalls zur Her-Familie gehört der Her-1/EGF-Rezeptor, welcher mit einem signifikant geringeren Überleben korreliert (Fox, 1994). Der EGF-Rezeptor gewinnt zunehmend auch als prädiktiver Faktor an Bedeutung. Spezifische EGF-Rezeptorinhibitoren und EGF-spezifische Antikörper werden bereits klinisch eingesetzt.

Neben den o. g. Faktoren existieren noch weitere prognostische/prädiktive Faktoren, z. B. mitotischer Index, S-Phasen-Fraktion und andere Proliferationsmarker, welche hier nicht in aller Ausführlichkeit behandelt werden können.

Das Mammakarzinom umfasst eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren, die durch molekulare Subtypisierung noch komplexer geworden ist (Prat and Perou, 2009). Aufgrund dieser Heterogenität existieren zu vielen aktuell untersuchten möglichen prognostischen und prädiktiven Faktoren Untersuchungen mit kontroversen Ergebnissen.

Microarray-Analysen haben gezeigt, dass die morphologisch heterogenen Brusttumoren mit Hilfe des RNA-Expressionsprofils (Transkriptom) systematisch klassifiziert werden können. Anhand ihres Genexpressionsprofils lassen sich die Karzinome in mindestens 4 Subtypen einteilen (Abb. 1). Diese unterscheiden sich in ihrer Prognose und im Ansprechen auf bestimmte Therapieformen.

Molekularer Subtyp	Hormonrezeptorstatus	Geeignete Therapieform	Prognose
<i>Basal</i>	<i>triple negative</i>		<i>schlecht</i>
<i>Her2</i>	<i>Her-2 +</i>		
<i>Luminal B</i>		<i>Chemo- therapie</i>	
<i>Luminal A</i>	<i>ER/PR +</i>	<i>Endokrine Therapie</i>	<i>gut</i>

Abb. 1: Brustkrebsklassifizierung nach molekularen Subtypen (modifiziert nach Prat and Perou, 2009).

Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate des Mammakarzinoms ist in Deutschland aufgrund immer besserer diagnostischer und therapeutischer Methoden

auf ca. 78% gestiegen (Robert-Koch-Institut, 2005) und liegt damit deutlich über der 5-Jahres-Überlebensrate anderer häufiger epithelialer Tumoren.

## 1.2 Elf-1 – ein Ets-Transkriptionsfaktor

Elf-1 ist ein Protein der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren und erhielt seinen Namen aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Drosophila Protein E74: **E74-like-factor** (Thompson et al. 1992). Ets-Transkriptionsfaktoren (Abb. 2) besitzen eine sogenannte Ets-Domäne, ein 85 Aminosäuren umfassendes winged-Helix-Turn-Helix-Motiv, welches an purinreiche DNA-Elemente mit dem Kernmotiv GGAA/T bindet (Dittmer et al., 1998, Sherrocks et al., 1997, Graves et al., 1998).

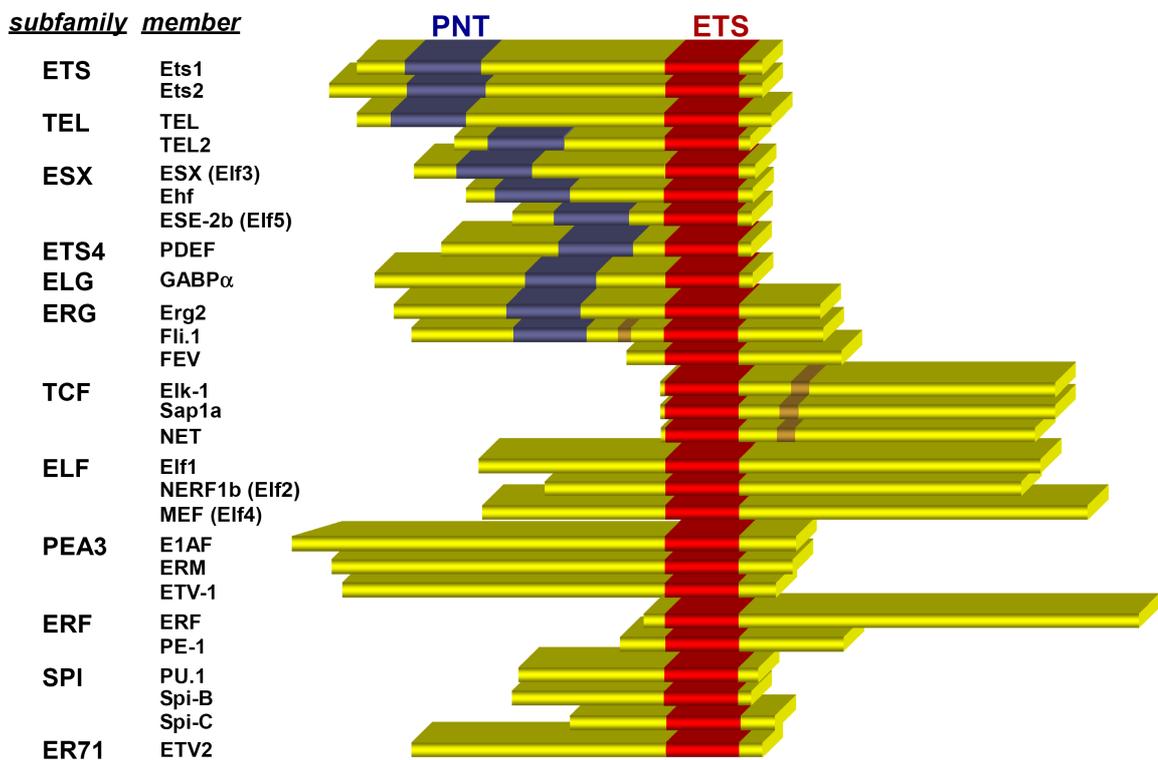


Abb. 2: Die Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren mit der gemeinsamen Ets-Domäne, PNT = Pointed domain (eine Proteininteraktionsdomäne genannt nach dem Drosophila-Ets-Protein Pointed), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. Dittmer.

Diese Sequenz befindet sich in den Promotoren vieler Gene, die für Matrix-Metalloproteinasen, Integrine, Cadherine, Selektine und Cathepsin B kodieren (Abb. 5). Die Transkription dieser Zielgene kann Elf-1 unabhängig von extrazellulären Mitosesignalen stimulieren (Bredemeier-Ernst et al., 1997).

Elf-1 besitzt wichtige Funktionen in der Regulation der Hämatopoese. So induziert es die Transkription zahlreicher immunologisch bedeutender Gene, u. a. solcher, die für Oberflächenproteine und Zytokine (z. B. Interleukine) kodieren (Wurster et al. 1994, Serdobova et al., 1997, Rellahan et al., 1998).

Die 1857 Basen umfassende Elf-1 – mRNA wird in ein Protein mit 619 Aminosäuren translatiert, woraus sich ein Molekulargewicht von ca. 68 kDa für das Protein berechnen lässt.

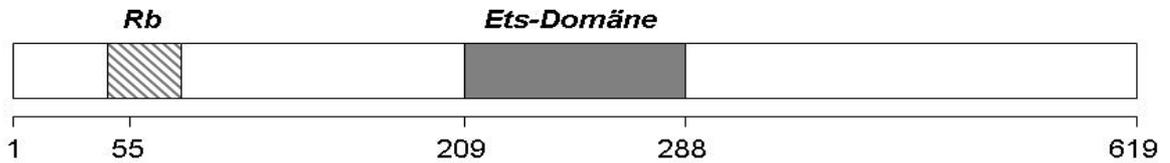


Abb. 3: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Elf-1, *Rb* bezeichnet die Bindungsstelle des Retinoblastoma-Proteins.

In der Proteinelektrophorese läuft das Elf-1 Protein jedoch als ein Protein mit einem „scheinbaren“ Molekulargewicht von 80 kDa (Oettgen et al., 1996). Eine weitere Erhöhung des „scheinbaren“ Molekulargewichtes von 80 auf 98 kDa wird posttranslationalen Modifikationen des Proteins zugeschrieben. Elf-1 kann sowohl phosphoryliert, z.B. durch Proteinkinase C, als auch O-glycosyliert (Anbindung von O-N-Acetylglucosamin) werden. Ob weitere posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Azetylierungen, erfolgen, ist bisher nicht bekannt. Die Modifikationen verändern Funktion und Lokalisation des Elf-1 Proteins. Die O-glycosylierte 98kD-Form von Elf-1 ist vorwiegend im Kern vorzufinden, während die 80kD-Form in erster Linie zytoplasmatisch lokalisiert ist (Juang et al., 2002). Im Kern bindet die 98kD-Form von Elf-1 an den Promoter der Zeta-Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR $\zeta$ ) und aktiviert dieses Gen (Juang et al., 2002). Eine reduzierte Expression der 98kD-Form kann zu systemischem Lupus Erythematosus und zu verringerter Expression von TCR $\zeta$  führen. Die 98 kD-Form kann auch inhibitorische Wirkung besitzen. So wird die O-Glykosylierung von Elf-1 für eine defekte Interaktion zwischen Elf-1 und dem Transkriptionsfaktor Sp1 verantwortlich gemacht (Lim et al., 2009). Elf-1 interagiert auch mit der unphosphorylierten Form des Zellzyklusregulatorproteins Rb (Retinoblastoma-protein) in T-Zellen (Wang et al., 1993). Bei T-Zellaktivierung und damit verbundener Phosphorylierung von Rb wird Elf-1 vom Rb/Elf-1 Komplex freigesetzt und induziert Genexpression. Die O-Glykosylierung von Elf-1 führt ebenso zur Freisetzung von Elf-1 aus diesem Komplex (Juang et al., 2002).

Durch Regulation der Transkription kann Elf-1 in die Kanzerogenese eingreifen und zum Beispiel mitotische Aktivität, Tumorzellmigration, Intra- und Extravasion beeinflussen (Blumenthal, 2001; Takai et al., 2003). Die Tumorangio-genese beeinflusst Elf-1 durch Modulation der Expression von Tie2, einem Angiopoetinrezeptor (Huang et al., 2006).

Ein für die Entwicklung des Mammakarzinoms bedeutsames Zielgen von Elf-1 ist HER2 (Scott et al., 1994, 2000; Chang et al., 1997). Weiterhin reguliert Elf-1 die Transkription des BRCA2-Gens (Davis et al., 1999), welches ebenfalls an der Entstehung des Mammakarzinoms beteiligt sein kann. Auch bei anderen malignen Tumoren, zum Beispiel dem Prostatakarzinom, Osteosarkom, Ovarialkarzinom und dem Endometriumkarzinom, ist eine Überexpression von Elf-1 nachweisbar. Beim Ovarial- und Endometriumkarzinom konnten Zusammenhänge zwischen Elf-1 Expression und Invasivität, schlechter Differenzierung, Tumorstadium sowie ungünstiger Prognose hergestellt werden (Takai et al., 2002; 2003).

Funktionelle Ets-Bindungsstellen sind in den Promotoren vieler tumorrelevanter Gene nachgewiesen worden (Sementchenko et al., 2000). In den wenigsten Fällen konnte eine eindeutige Zuordnung eines Ets-responsiven Genes mit einem spezifischen Ets-Faktor erbracht werden. Ein Gen, für das die Transkriptionsegregation durch Elf-1 in vitro und in vivo gezeigt werden konnte, ist hPygo2 (Human Pygopus 2). hPygo2 ist Teil des T-Zell-Faktor/ $\beta$ -Catherinrezeptors, reguliert zahlreiche intrazelluläre Prozesse und ist in verschiedenen malignen Tumoren überexprimiert (Andrews et al., 2008).

In einer CHIP (chromatin immunoprecipitation)-CHIP-Analyse an T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Promotoren, an die das Proto-Onkoprotein Ets1 bindet, auch häufig von Elf-1 okkupiert werden (Dittmer, 2003; Hollenhorst et al., 2007). Es wäre daher denkbar, dass Ets1 und Elf-1 zumindestens z.T. auch dieselben Gene in Brustkrebszellen regulieren. Ets1 und Elf-1 könnten dabei auch antagonistisch auf diese Gene wirken. Die durch PKC $\epsilon$  (Proteinkinase C $\epsilon$ )-regulierte Expression des PTHrP (parathyroid hormone-related protein)-Genes wird in MCF-7 Brustkrebszellen durch Ets1 unterstützt und durch Elf-1 inhibiert (Lindemann et al., 2003). Zu den wichtigen Ets1-regulierten Genen in Brustkrebszellen gehören uPA (urokinase-type Plasminogen-Aktivator), PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1) und Rho-GDI- $\beta$  (ARGHDIB) (Yang et al., 1996; Nakatsuka et al., 2006; Schunke et al., 2007). Auf diese könnte auch Elf-1 Einfluss nehmen.

Schlussfolgernd könnte Elf-1, ähnlich wie Ets1 (Span et al., 2002), eine prognostische Relevanz beim invasiven Mammakarzinom haben.

### **1.3 Weitere prognostische und prädiktive Faktoren**

Neuere Prognosefaktoren beim Brustkrebs sind die Serinprotease uPA (urokinase-type plasminogen activator) und deren Inhibitor PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1). uPA spielt eine bedeutende Rolle bei der Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) und aktiviert Matrix-Metalloproteasen (MMPs) (Abb. 4; Minisini et al., 2007; Schmitt et

al., 2008; Harbeck et al., 2008). Die Degradation der ECM erleichtert die Expansion eines soliden Tumors in benachbartes Gewebe. Somit fördert uPA die Invasivität von Tumoren. Auch PAI-1 hat trotz seines inhibitorischen Effektes auf uPA tumorfördernde Eigenschaften. Die Expressionslevel von uPA und PAI-1 sind in malignem Gewebe erhöht (Dellas et al., 2005) und korrelieren mit höherer Rezidivhäufigkeit und Mortalität (Look et al., 2002). uPA und PAI-1 sind offenbar auch als prädiktive Faktoren geeignet. Hohe uPA oder PAI-1 Level stehen mit einem besserem Ansprechen auf Chemotherapie im Zusammenhang (Harbeck et al., 2002). uPA und PAI-1 wurden als prädiktive Faktoren bereits 2007 in die Therapieleitlinien der ASCO (Amerikanische Gesellschaft für klinische Onkologie) aufgenommen. Synthetische uPA-Inhibitoren (MESUPRON®) befinden sich aktuell in den Phasen I und II der klinischen Erprobung. Es sei darauf hingewiesen, dass uPA, PAI-1 sowie einige MMPs, wie MMP1, 3, 7 und 9, durch Ets-Proteine reguliert werden können (Abb. 5).

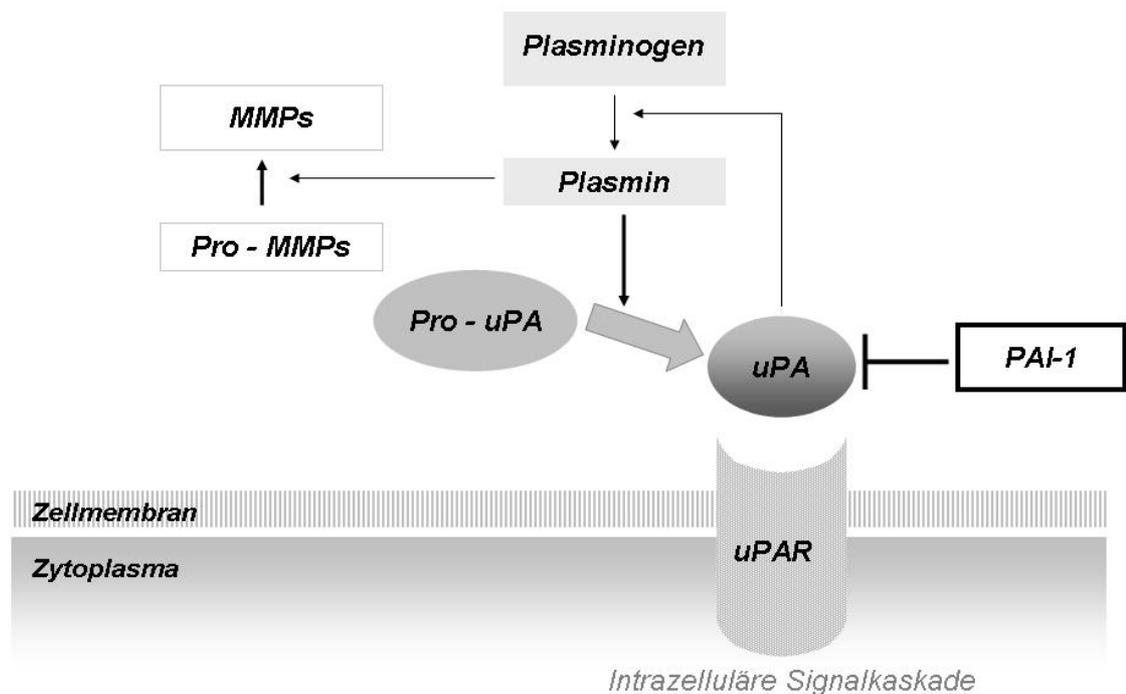


Abb. 4: Funktion und molekulare Interaktion von uPA und PAI-1, nach Minisini et al., 2007 (uPA: urokinase-type plasminogen activator, PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1, MMP: Matrixmetalloproteinase, uPAR: membranständiger uPA-Rezeptor CD 87).

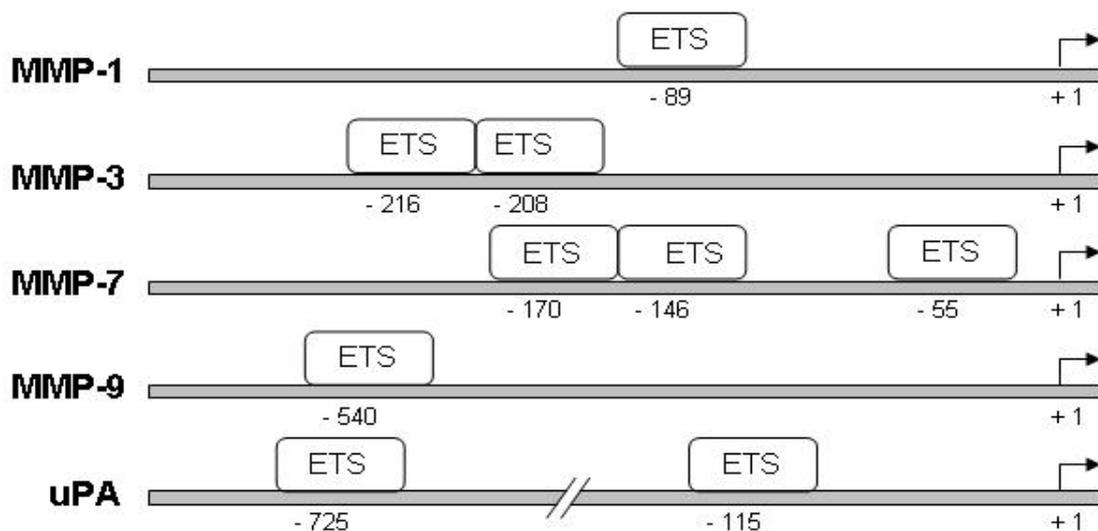


Abb. 5: Schematische Darstellung der Ets-Bindungsstellen in Promotorregionen tumorrelevanter Zielgene.

Gegenstand aktueller Untersuchungen des Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie des halleschen Universitätsklinikums sind unter anderem auch Rho-GTPasen. Rho-GTPasen sind GTP-bindende Proteine mit intrinsischer GTPase-Aktivität, welche eine Schlüsselrolle bei der Zellmigration sowie bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen spielen. In der Kanzerogenese regulieren sie Zell-Zell-Interaktionen, die Zellmotilität, den Zellzyklus sowie die Apoptose und werden so mit Invasion und Metastasierung in Zusammenhang gebracht. Die Aktivität von Rho-GTPasen wird durch eine Reihe von regulatorischen Proteinen kontrolliert. Zu diesen Regulatorproteinen gehören die Rho-GDI (Rho GDP dissociation inhibitor) Proteine, zu denen auch RHO-GDI- $\beta$  (ARHGDI $\beta$ ) gehört. Dieses Protein wurde in zahlreichen invasiven Tumoren und Tumorzelllinien in erhöhter Konzentration nachgewiesen und mit Tumorprogression (Ovarial- und Magenkarzinom) in Zusammenhang gebracht. Beim Harnblasenkarzinom hingegen korrelieren hohe ARGHDIB-Proteinkonzentrationen mit einem besseren klinischen Verlauf (Cho et al., 2010). Beim Mammakarzinom ist ein Zusammenhang zwischen der RHO-GDI- $\beta$  Expression und der Malignität umstritten (Zhang et al., 2006; Schunke et al., 2007) Prothymosin  $\alpha$  ist ein saures Protein (109 Aminosäuren, 12,5 kDa), das sich weit verbreitet in menschlichen Geweben befindet. Eine vermehrte Expression beim Mammakarzinom korreliert mit einer größeren Anzahl an Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie einer höheren Rezidivrate und Mortalität (Magdalena et al., 2000). Prothymosin  $\alpha$  wird in dieser Arbeit als Kontrollprotein für die immunhistochemischen Färbungen verwendet.

#### **1.4 Zielstellung**

Das Mammakarzinom nimmt als Krebstodesursache der Frau eine bedeutende Rolle ein. Um Aussagen über die Prognose eines Tumors zu stellen, können die bisher verwendeten prognostischen und prädiktiven Faktoren durch neue unterstützt werden und so bei der Auswahl der effektivsten Therapie helfen. Elf-1 beeinflusst nach aktuellem Wissenstand die Entstehung und den Verlauf maligner Brusttumoren und kann eine solche Rolle einnehmen.

Ziel dieser Arbeit war es, invasive Mammakarzinome immunhistochemisch auf die Expression von Elf-1 zu untersuchen. Diese sollte dann mit bereits etablierten prädiktiven und prognostischen Markern, z.B. Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Grading und Hormonrezeptorstatus verglichen werden. Ein weiteres Ziel war es, die Expressionsdaten mit Überlebensdaten dieses Patientenkollektivs zu vergleichen.

Zusätzlich sollte mittels Westernblotanalyse an Tumorproben eines weiteren Patientenkollektivs überprüft werden, ob beim invasiven Mammakarzinom die 80 kDa- oder die 98 kDa – Form des Transkriptionsfaktors Elf-1 dominiert. Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Expression des Transkriptionsfaktors Elf-1 mit der Expression der potenziellen Zielgene uPA, PAI-1 und Rho-GDI- $\beta$  korreliert.

## **2. Material und Methoden:**

### **Artikel I. 2.1 Untersuchungsgut (Kollektiv 1 und 2):**

Das Brustkrebsgewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen entstammt Patientinnen der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Halle. Bei allen Patientinnen wurde 1999 erstmals ein invasives Mammakarzinom nachgewiesen. Ziel war es zunächst, alle 153 Patientinnen mit Erstdiagnose im genannten Jahr in die Studie aufzunehmen. 125 Proben standen aufgrund der Vorschriften zur Archivierung von Resttumorgewebe letztlich für die Untersuchung zur Verfügung (Kollektiv 1). Für die Westernblotanalysen wurden Tumorextrakte von 100 Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom (Kollektiv 2) verwendet. Die Extrakte waren mir vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt worden.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Immunhistochemische Untersuchung**

##### **Chemikalien und Antikörper:**

- Polyklonaler Anti-Elf-1 Antikörper (C 20): cat# sc-631 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)
- Monoklonaler Antikörper gegen Prothymosin  $\alpha$  (NT) (2F11) (Alexis Biochemicals, Grünberg)
- ZytoChemPlus HRP (horse radish peroxidase)-Kit (enthält u.a. ein Blockierungsagens, einen biotinylierten sekundären Antikörper und einen Streptavidin-Peroxidase-Komplex) (Zytomed, Berlin)
- ChemMate Citratpuffer (DakoCytomation, Dänemark), pH 6,0
- PBS (phosphate buffered saline) (PromoCell, Heidelberg)
- Aminoethyl-Carbazol-Substrat-Kit (Substratpuffer, Chromogen, Wasserstoffperoxid) (Zymed, USA)
- Aqueous Mount (Zytomed, Berlin)
- Xylol (Merck, Darmstadt)
- Phosphatstabilisierte Wasserstoffperoxidlösung (Unversitätsapotheker Halle)
- Ethanol 96% MEK-vergällt (BIOMEL GmbH, Dessau)
- Ethanol 70% (BIOMEL GmbH, Dessau)
- Ethanol absolut (Riedel-de Haen, Seelze)
- Aqua dest.
- Antikörper-Verdünnungslösung (Zymed, USA)

- Hämatoxylin Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim)

#### Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Wasserbad temperiert (GFL, Burgwedel)
- Coverplates (Thermo Shandon, Frankfurt) und Sequenzerkassette
- Deckgläser (Marienfeld, Lauda - Königshofen)
- Superfrost-Objektträger (Novoglas, Schweiz)
- Mikrotom (Reichert-Jung, Nussloch)
- Pipetten und Pipettenspitzen (Eppendorf, Köln)
- Reaktionsgefäße (Eppendorf, Köln)
- Inkubator Innova 4230 (Brunswick Scientific, Nürtingen)
- Glasküvetten mit Deckel (Roth GmbH, Karlsruhe)
- Glashalterung für Objektträger
- Pipettierhilfe Pipetus akku (Hirschmann, Eberstadt) mit Pipetten
- Spritzflaschen (Roth GmbH, Karlsruhe)
- Abzug und Sicherheitswerkbank (Hera safe, Kendro Laboratory, USA)
- Waage (Scaltec, Göttingen)
- Handschuhe (Kimberly Clark, USA)
- Kurzzeitmesser (Roth GmbH, Karlsruhe)
- Mikroskop (Zeiss, Jena)
- Trockenofen (FA. Binder, Tuttlingen)

#### Methode:

Die Immunhistochemie eignet sich zum mikroskopischen Nachweis einzelner Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper. Das in Paraffinblöcke eingebettete Tumorgewebe wurde nach Vorkühlen von einer erfahrenen Mitarbeiterin des Institutes für Pathologie mit dem Mikrotom 2-4 µm dick geschnitten, zum Glätten in warmes Wasser gelegt, auf Objektträger aufgezogen und schließlich im Ofen bei 75 °C getrocknet.

Die Entparaffinierung erfolgte nach dem Tauchbadprinzip mit einer absteigenden Alkoholreihe. Die Objektträger wurden zunächst 2 x 10 min in Xylol, danach je 2 x 5 min in Ethanol absolut und Ethanol 96% und anschließend 5 min in Ethanol 70% getaucht. Im letzten Tauchbad mit 70% Ethanol/ 10% Wasserstoffperoxid verblieben die Präparate weitere 5 Minuten zur Hemmung der gewebsständigen Peroxidasen. Schließlich wurde diese Reaktion im Tauchbad mit Aqua dest. abgestoppt (5 min). Im Anschluß daran erfolgte die immunhistochemische Analyse nach der Streptavidin-Biotin-Methode (Abb. 6).

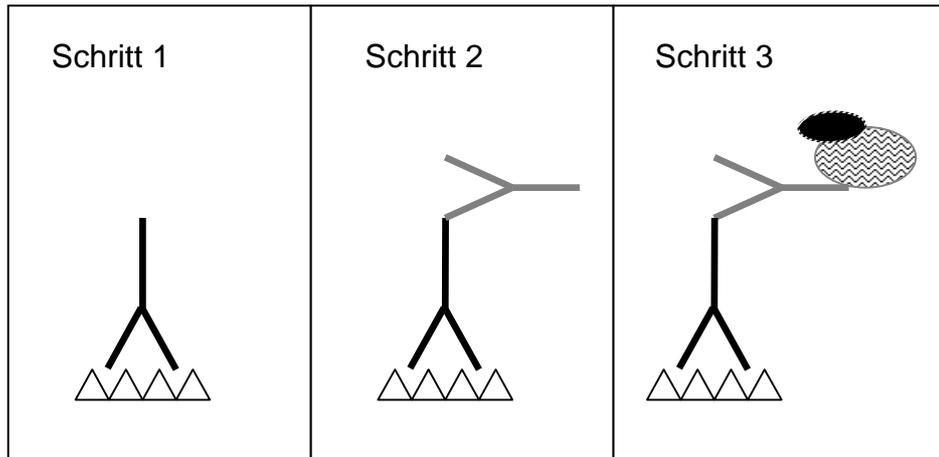


Abb. 6: Die *Streptavidin – Biotin – Methode*:

Zunächst bindet der Primärantikörper an das Zielantigen (Schritt 1), anschließend ein biotinylierter Sekundärantikörper (Schritt 2) an den primären Antikörper und schließlich enzymmarkiertes Streptavidin an das Biotin (Schritt 3). Im letzten Schritt erfolgt der enzymatische Nachweis mit Hilfe eines Substrates, das zu einem gefärbten Fällungsprodukt umgesetzt wird.

Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger zunächst für 45 Minuten in Citratpuffer bei 94 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 20 Minuten lang bei Raumtemperatur abgekühlt. (Cattoretti et al., 1994). Danach erfolgten die Spülung mit Aqua dest., das luftblasenfreie Auflegen auf die Coverplates und Einspannen in eine Inkubationskassette. Während dieser Zeit wurde darauf geachtet, dass der Gewebeschnitt auf dem Objektträger stets durch die Pufferlösung bedeckt war.

Das Auftragen der Reagenzien erfolgte dann in folgender Reihenfolge: 5 min Spülen in 1 ml PBS bei RT, 5 min Inkubation in 4 Tropfen Superblock-Lösung bei RT, 45 min Inkubation in 100 µl Lösung mit dem primären Antikörper (anti-Elf-1, Verdünnung 1:200, Prothymosin, Verdünnung 1:300) im Inkubator bei 37 °C, 5 min Spülen in 1 ml PBS bei RT, 10 min Inkubation in 4 Tropfen Lösung mit biotinyliertem Antikörper bei RT, 5 min Inkubation in 1 ml PBS, 10 min Inkubation in 4 Tropfen Streptavidin-Peroxidase-Lösung (RT).

Anschließend wurden die Objektträger aus den Coverplates herausgenommen und auf eine ebene Fläche gelegt. Dort wurde dann die Substrat-AEC/Chromogen-Lösung direkt aufgetropft, 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen und die Färbereaktion schließlich mit Aqua dest. abgestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte für 3 Minuten mit Hämatoxylin und abschließender gründlicher Spülung mit Leitungswasser.

Zur Konservierung wurden dann je nach Größe des Präparates 1 bis 2 Tropfen Aqueous Mount aufgetragen und ein Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt.

Die Beurteilung der Färberesultate wurde am Lichtmikroskop bei Lupen- und 40-facher Vergrößerung am Mitbeobachter-Mikroskop mit Hilfe eines erfahrenen Pathologen

(Prof. Dr. H.-J. Holzhausen) durchgeführt. Die Bewertung erfolgte nach dem IRS-Score (Remmele u. Stegner, 1987; Thomas, 2005). Der Bewertung der SI lag ein 4-stufiger Score zugrunde (0 = keine, 1 = schwache, 2 = mäßige, 3 = starke Färbereaktion), der des PP ein 5-stufiger Score (0= keine positive Zellen, 1 = < 10% positive Zellen, 2 = 10 – 50% positive Zellen, 3 = 51 – 80% positive Zellen, 4 = > 80% positive Zellen). Durch Multiplikation von Färbintensität und Prozentsatz positiver Zellen ergab sich ein Gesamtscore mit einer Skala von 0 bis 12.

Als Positivkontrolle für Elf-1 dienten die Lymphozyten im Präparat. Die Kontrollfärbungen wurden mit Prothymosin  $\alpha$  durchgeführt.

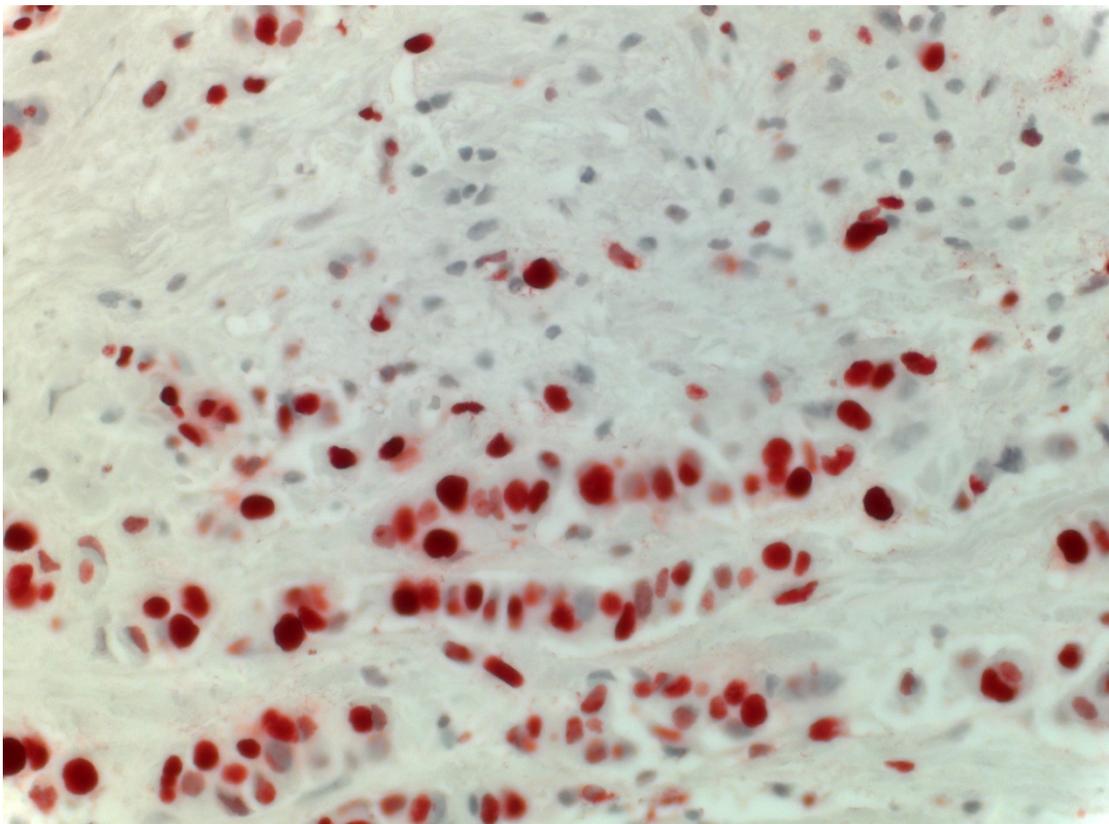


Abb. 7: Immunhistochemische Färbung mit der *Streptavidin – Biotin – Methode*, hier beispielhaft ein mit Prothymosin  $\alpha$  - Antikörper gefärbtes lobuläres Mammakarzinom. Die Kerne sind stark angefärbt.

Die statistische Auswertung der Färberegebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 11.5. Die Untersuchungsergebnisse wurden in Kreuztabellen und gruppierten Balkendiagrammen dargestellt. Zur Überprüfung des statistischen Zusammenhanges diente der  $\chi^2$  nach Pearson. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von < 0,05 angesehen. Für die Untersuchung im Zusammenhang mit Überlebensdaten wurden Kaplan-Meier-Analysen (Log Rank) verwendet.

Die klinisch-pathologischen Daten wurden von Frau Nadja Massanek im Rahmen ihrer Dissertation erhoben und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### **2.2.2 Westernblotanalyse**

#### **Chemikalien und Antikörper:**

- Polyklonaler Anti-Elf-1 Antikörper (C 20): cat# sc-631 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)
- Polyklonaler Anti-ERK 1/2 (p42/44 Kinase)-Antikörper (Cell Signaling)
- Polyklonaler Anti-D4-GDI (ARHGDI) (BD Biosciences, Cat. No.: 556498)
- Anti-Kaninchen-Peroxidase-HRP-Konjugat (Cell Signaling) als Sekundärantikörper
- PBS (PromoCell, Heidelberg)
- Xylol (Merck, Darmstadt)
- Protein Assay (Bio Rad, Bradford, USA)
- Aqua dest.
- Protein Sample Buffer (1,75 ml Wasser, 1,25 ml 1M TrisHCl, 2,3 ml 0,3% Bromphenolblau, 2 ml Glycerin, 0,5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, 4 ml 10% SDS, Applichem Darmstadt)
- Molekulargewichtsmarker Dual Color (Bio Rad, USA)
- Trenngel (5 ml Wasser, 2,5 ml Tris-HCl mit SDS, 2,5 ml Acrylamid-Lösung 40%, 7,5  $\mu$ l TEMED, 50  $\mu$ l Ammoniumpersulfat 10%; Applichem Darmstadt)
- Stacking Gel (2 ml Wasser, 2,5 ml TrisHCl mit SDS, 0,5 ml Acrylamid-Lösung 40%; 5  $\mu$ l TEMED, Applichem Darmstadt)
- Elektrodenpuffer (144 g Glycin, 30 g Tris-Base; Applichem, Darmstadt)
- Trenngelpuffer (16,95 g Tris in 90 ml Wasser, pH 8,8 mit HCl, 4 ml 10% SDS ; Applichem Darmstadt)
- ComassieBlue-Färbelösung (Applichem, Darmstadt)
- Waschpuffer (5,8 g NaCl, 10 ml 1M TrisHCl, 2 ml 0,5M EDTA, 0,5 ml Tween 20 ; Applichem Darmstadt)
- Magermilchpulver (Applichem, Darmstadt)
- Methanol (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
- Substratlösung (Meerettich Peroxidase, HRP ; Zymed, USA)
- Detection System : Amersham ECL Western Blot detection system (GE Healthcare, USA)
- Zellkulturmedium (RPMI 1640+GlutaMAX, Gibco, Invitrogen)
- Zelllinie : MDA – MB-231

#### Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Wasserbad temperierbar (GFL, Burgwedel)
- PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, USA)
- Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Health Care)
- ECL Plus Western blotting reagent (GE Health Care)
- Pipetten und Pipettenspitzen (Eppendorf, Köln)
- Reaktionsgefäße (Eppendorf, Köln)
- Petrischalen (Roth GmbH, Karlsruhe)
- Photometer (Ultrospec 1000, GE Healthcare, Fairfield (USA)) mit Referenzlösung
- Zentrifuge (Multifuge 3-S-R, Heraeus, Newport Pagnell, UK)
- Gießgestell
- Zellkulturflaschen (TTP, Schweiz)
- Elektrophoresekammer Mini Protean (Bio Rad, USA)
- Transferkammer (BioRad, USA)
- Filterpapier
- Eimalspritze mit Kanüle
- 50 ml Zentrifugenröhrchen (TTP, Schweiz)
- Waage (Scaltec, Göttingen)
- Water purificator (Millipore, Milli – Q-Plus, Eschborn)
- Rotator (G. Kisker RS 24, Steinfurt)
- Schüttelapparat (GFL 3005, Burgwedel)
- Handschuhe (Kimberly Clark, USA)
- Kurzzeitmesser (Roth, Karlsruhe)
- Trockenofen (FA. Binder, Tuttlingen)
- Entwicklungsmaschine (in Dunkelkammer, AGFA)
- Abzug und Sicherheitswerkbank (Hera safe, Kendro Laboratory, USA)

#### Methode:

Die Westernblotanalyse ist eine Methode, um Proteine spezifisch semiquantitativ nachzuweisen.

#### Herstellen der Proteinextrakte

Die Tumorextrakte wurden mir von der Frauenklinik der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Die Extrakte wurden aus Mammakarzinomgewebe

gewonnen, in der Weise, wie sie für die Bestimmung der Prognosemarker uPA/PAI-1 erfolgte. Entsprechend wurde das Gewebe (100-300 mg) im gefrorenen Zustand (flüssiger Stickstoff) mittels Mikro-Dismembrator pulverisiert und anschließend aus dem Gewebepulver und 2 ml Triton X Lösung (0,2 ml 10% Triton X 100 in 1,8 ml Tris-gepufferter Salzlösung, pH 8,5) eine Suspension hergestellt. Durch Zentrifugieren der Suspension wurden Lipidreste und Zelltrümmer entfernt. Der Überstand wurde in 100 µl Portionen aliquotiert und aus einem Aliquot mit dem BCA-Test die Gesamtproteinkonzentration des Gewebeextraktes bestimmt. Der zytosolische Extrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### Proteingelelektrophorese

Nach Auftauen der Proteinextrakte bei 37°C wurden unlösliche zelluläre Bestandteile abzentrifugiert. Die photometrische Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit dem BCA-Test (Biuret-Reaktion), anschließend die Messung im Photometer bei 595 nm und Berechnung der erforderlichen Auftragsmenge.

Die Proteinlösung wurde mit Protein-Probenpuffer versetzt und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach dem Gießen der Polyacrylamidgele erfolgte das Einspannen dieser in die Elektrophoresekammer, welche anschließend luftblasenfrei mit Elektrodenpuffer aufgefüllt wurde. Proben und Marker wurden anschließend bei 99°C für 3 Minuten erhitzt, 10 Sekunden zentrifugiert und in die Geltaschen überführt. Nun erfolgte die Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld (60 Minuten, 150 Volt).

Der Transfer auf die PVDF (Polyvinylidenfluorid, Millipore)-Membran erfolgte nach der Sandwichmethode durch Einlegen des Gels in eine Transferkammer (120 Volt, 60 Minuten). Nach dem Transfer wurde die Membran mit Magermilch (2%ige Lösung) inkubiert (15 min), um unspezifische Reaktionen zu verhindern. Zur Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran in einem 50 ml Röhrchen, in dem 5 ml der Antikörperlösung (Verdünnung 1:2000) eingefüllt waren, überführt und im Rotator 60 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:5000) wie oben beschrieben. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit dem Substrat (ECL-Plus) inkubiert und die Chemilumineszenz mit Hilfe eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht (Abb. 11, S. 30). Nach geeigneter Belichtung wurde die Membran getrocknet und archiviert.

Der fertig entwickelte Film wurde zur Auswertung eingescannt, im Grafikprogramm (Canvas 8.0.5) vorbereitet und zuletzt mit der Software AIDA (Advanced Image Data Analyzer Version 3.5.1) die Intensität der Bande semiquantitativ zur relativen

Proteinmengenbestimmung gemessen, wobei als Vergleichswert die Intensität der ERK1/2-spezifischen Banden verwendet wurde (Dittmer et al. 2006). Um die verschiedenen Blots untereinander vergleichbar zu machen, wurden auf jedes Gel auch zytosolische Extrakte aus MDA-MB-231-Brustkrebszelllinien mit 1-facher und 0,5-facher Proteinmenge mit aufgetragen.

Anschließend erfolgte die Berechnung der Elf-1-Bandenintensitäten in den Tumorproben unter Berücksichtigung der gemessenen Bandenintensität für die MDA-Zellextrakte und der ERK $\frac{1}{2}$ -Bandenintensitäten. Aus dem Verhältnis von Elf-1 zu ERK  $\frac{1}{2}$  wurde dann die relative Elf-1-Expression bestimmt. Zur Auswertung dienten der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test, da bei einer Westernblotuntersuchung die semiquantitativ erhobenen Werte nicht als linear angesehen werden können. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  angesehen.

Die Westernblotuntersuchung für die relative ARHGDIB-Proteinexpression erfolgte analog nach der oben beschriebenen Methode. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde als Referenzbande die ARHGDIB-Bande der ARHGDIB-positiven MDA-MB-231 Zellen herangezogen. Da ARGHDIB in den Tumorproben entweder stark oder gar nicht exprimiert war, wurden nur solche Tumoren als ARHGDIB-positiv angesehen, die eine ARHGDIB-Bandenintensität aufwiesen, die mindestens der MDA-ARHGDIB-Bande entsprachen (Schunke et al., 2007, Abb.: 15).

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 11.5. Die Werte wurden in Balkendiagrammen und Boxplots dargestellt. Als statistische Tests wurden der Mann-Whitney-U-Test und der student t-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  angesehen.

Die übrigen zur statistischen Beurteilung der Korrelation von Elf-1 mit etablierten Prognosefaktoren herangezogenen Daten wurden Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf erhoben und mir freundlicherweise von PD Dr. Volkmar Müller zur Verfügung gestellt. Die angegebenen Konzentrationen von uPA und PAI-1 im Tumorgewebe wurden im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf mit dem ELISA Verfahren (enzyme-linked immunosorbent assay) erhoben und mir ebenfalls zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden Microtiterstreifen (FEMTELLE<sup>TM</sup>, American Diagnostica GmbH) mit je 100  $\mu$ l der Gewebextrakt Proben und Referenzlösungen bestückt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde nacheinander jeweils 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Detektionsantikörper, Enzymkonjugat und Substratlösung inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure erfolgte innerhalb von 30 min die Messung bei 450 nm Meßwellenlänge. Zur Berechnung der

Proteinkonzentrationen wurden die Mittelwerte der gemessenen Extinktionswerte jedes Standards gegen die entsprechende uPA-Konzentration bzw. PAI-1 – Konzentration aufgetragen und so eine Standardkurve erstellt. Aus dieser konnten dann die Proteinkonzentrationen der Proben anhand der gemessenen Extinktionswerte abgelesen werden. Für die mittels ELISA erhobenen (linearen) uPA- und PAI-1 Konzentrationen wurde der student t-Test angewendet. Hierfür wurden die Proben am Median der relativen Elf-1 - Expression in zwei Gruppen unterteilt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Zusammenstellung der klinisch-pathologischen Faktoren für die Patientenkollektive 1 und 2**

##### **3.1.1 Klinisch-pathologische Faktoren im Patientenkollektiv 1**

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden 125 formalinfixierte paraffineingebettete invasive Karzinome der Mamma verwendet. Davon waren 97 (77,6%) histologisch als invasiv duktal und 6 (4,8%) als invasiv lobulär klassifiziert worden, 13 Fälle (10,4%) waren den o. g. selteneren histologischen Formen zugeordnet worden. Das Alter der untersuchten Patientinnen lag bei der Primärdiagnose zwischen 24 und 86 Jahren mit einem Mittelwert von 58,08 Jahren.

Die Größe des Primärtumors betrug 0,4 bis 7,0 cm, im Mittel 2,12 cm. Tumoren mit einem Durchmesser unter 2 cm fanden sich in 59 Fällen (47,2%). Dies entspricht dem Tumorstadium T1. 54 Fälle (43,2%) wurden dem Tumorstadium T2, entsprechend einem Durchmesser zwischen 2 cm und 5 cm, zugeordnet. Tumoren, welche bereits größer als 5 cm, jedoch streng auf die Brust beschränkt waren (Tumorstadium T3), sowie Tumoren mit Infiltration der Brustwand und/oder der Haut (Tumorstadium T4) lagen in 8,8% der Fälle vor. In 49 von 125 Fällen (39,2%) waren zum Zeitpunkt der Primärdiagnose bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden. Fernmetastasen fanden sich bei vier Patientinnen (3,2%).

Entsprechend den oben beschriebenen Modalitäten des histologischen Gradings waren 3 Fälle (2,4%) als G1, somit gut differenziert, 56,8% (n=71) als G2, somit mäßig differenziert, und 40,8% (n=51) als G3, somit schlecht differenziert, klassifiziert worden.

75 der 120 auf den Hormonrezeptorstatus untersuchten Proben (60%) waren östrogenrezeptorpositiv, 53 (42,4%) progesteronrezeptorpositiv. Eine Überexpression von Her2/neu lag in 32 der 50 diesbezüglich untersuchten Proben (64,0%) vor.

##### **3.1.2 Klinisch-pathologische Faktoren im Patientenkollektiv 2**

Für die Westernblotanalysen wurden Extrakte aus 100 invasiven Karzinomen der Mamma verwendet, von denen in 98 Fällen klinisch-pathologische Daten dokumentiert waren. Das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung betrug zwischen 37 und 79 Jahren, im Mittel 59,6 Jahre. Die Größe des Tumors lag zwischen 2 und 45 mm, im Mittel bei 20,5 mm. 57 (59,4%) Fälle konnten dem Tumorstadium T1, 39 (40,6%) Fälle dem Tumorstadium T2 zugeordnet werden. In 24% der Fälle lagen zum Zeitpunkt der

Diagnose Lymphknotenmetastasen vor. Über das Vorkommen von Fernmetastasen und über die Histologie gibt es leider keine Informationen.

Entsprechend den oben beschriebenen Modalitäten des histologischen Gradings waren 12 Fälle (12,4%) als G1, somit gut differenziert, 46 (47,4%) als G2, somit mäßig differenziert, und 39 (40,2 %) als G3, somit schlecht differenziert, klassifiziert worden.

83 Proben (85,6%) waren östrogenrezeptorpositiv, 61 (63,5%) waren progesteronrezeptorpositiv. Die Gewebekonzentration von uPA lag in 37 Fällen (38,1%) oberhalb des Schwellenwertes von 3 ng/ml, die von PAI-1 in 25 Fällen (25,8%) oberhalb des Schwellenwertes von 14 ng/ml. Diese Schwellenwerte wurden nach prognostischen Gesichtspunkten festgelegt (Jänicke et al., 2001).

### 3.1.3 Vergleich der klinisch-pathologischen Faktoren bei den Patientenkollektiven

#### 1 und 2

Das Patientenkollektiv für die immunhistochemische Untersuchung (Patientenkollektiv 1) und das Patientenkollektiv für die Westernblotuntersuchung (Patientenkollektiv 2) zeigen eine vergleichbare Altersverteilung bei Diagnosestellung. Auch für den Parameter Grading liegen mit überwiegender Zahl der G2-Tumoren und geringem Anteil G1-Tumoren vergleichbare Werte vor.

Bezüglich der prognostisch bedeutsamen Parameter Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung unterscheiden sich die Kollektive hingegen. Im Patientenkollektiv 2 finden sich keine T3- und T4-Tumoren. Der Anteil nodalnegativer Karzinome ist in dieser Gruppe deutlich höher als im Patientenkollektiv 1, ebenso wie der Anteil hormonrezeptorpositiver Tumoren.

Tab. 4: Vergleich der untersuchten Patientenkollektive

<i>Klinisch-pathologischer Parameter</i>	<i>Patientenkollektiv für die immun-histochemische Untersuchung n=125</i>		<i>Patientenkollektiv für die Westernblotuntersuchung N=90</i>	
Histologie	77,6%	duktal	keine Werte vorliegend	
	4,8%	lobulär		
	10,4%	andere		
Alter bei Diagnosestellung	Mittelwert: 58,08 Jahre (min: 24, max: 86)		Mittelwert: 59,6 Jahre (min: 37, max: 79)	
	< 50	27,2%	< 50	16,9%
	> 50	72,8%	> 50	83,1%
Tumorstadium	T1	47,2%	T1	59,4%
	T2	43,2%	T2	40,6%
	T3/T4	8,8%	T3/T4	0%
Fernmetastasen	M0	96,8%	keine Werte vorliegend	
	M1	3,2%		
Lymphknotenstatus	N0	60,8%	N0	76,0%
	N1	39,2%	N1	24,0%
Grading	G1	2,4%	G1	12,4%
	G2	56,8%	G2	47,4%
	G3	40,8%	G3	40,2%
Hormonrezeptorstatus	ER+	60,0%	ER+	85,6%
	PR+	42,4%	PR+	63,5%
Her2/neu - Rezeptorstatus	Her2/neu+	64,0%	Her2/neu+	keine Werte
uPA > 3 ng/ml	keine Werte vorliegend		25,8%	
PAI-1 > 14 ng/ml			38,1%	

### 3.2 Elf-1 Expression im Vergleich zu klinisch-pathologischen Faktoren

#### 3.2.1 Elf-1 und klinisch-pathologische Faktoren im Patientenkollektiv 1

Tumormaterial von 125 untersuchten Patientinnen des Kollektivs 1 wurde immunhistochemisch auf die Expression von Elf-1 untersucht. In 45 Fällen (36%) wurde die Färbung als negativ, in 80 Fällen (64%) als positiv bewertet, wobei ein IRS von 0 und 1 Punkten als negatives und ein IRS von 2 bis 12 Punkten als positives Färbergebnis gewertet wurde. Zur statistischen Auswertung wurde der  $\chi^2$  nach Pearson angewendet.

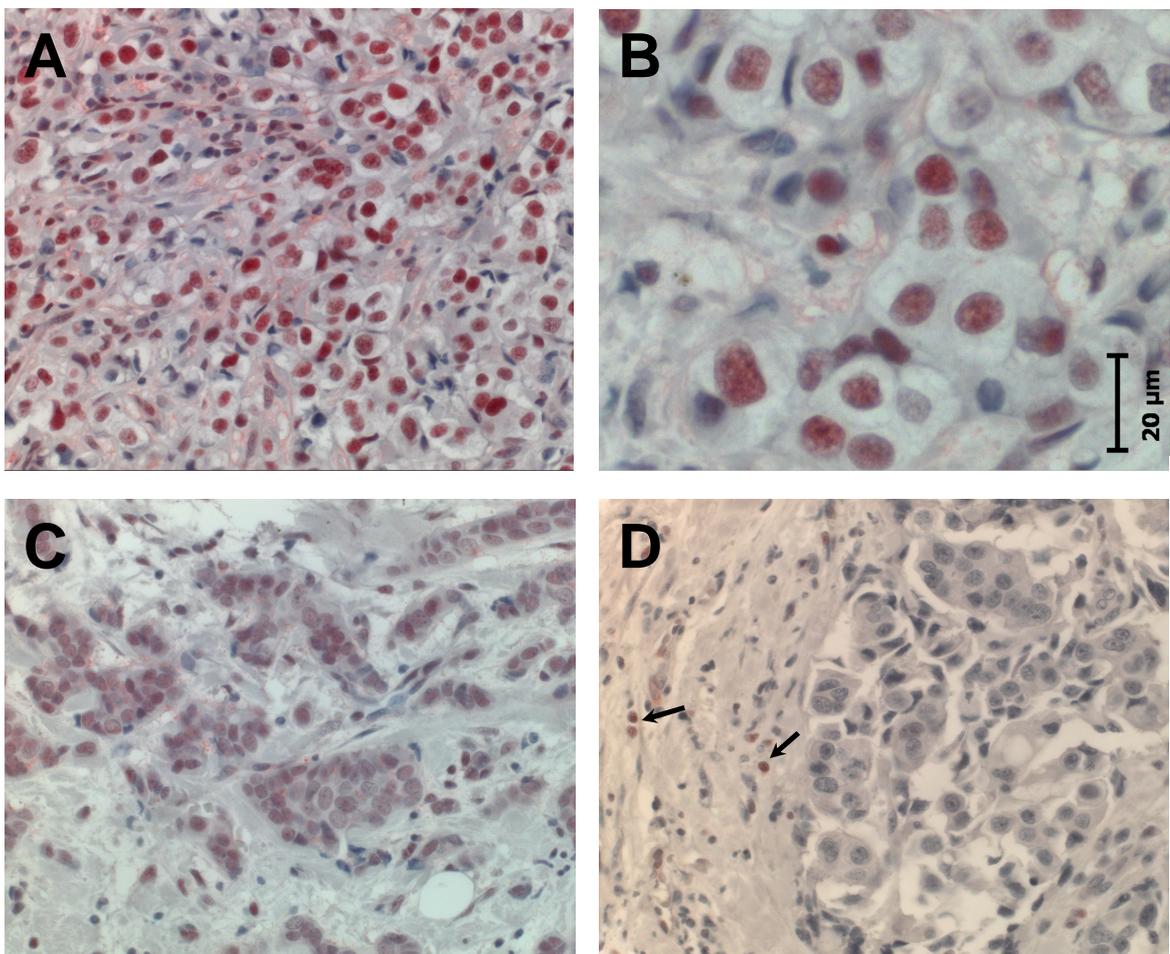


Abb. 8: Die immunhistochemische Färbung zeigte bei 64 % der Proben ein positives Färbergebnis für Elf-1 (A: IRS 9, C: IRS 2) mit typischer Kernfärbung (B: vergrößerter Bildausschnitt). Die Lymphozyten (Pfeile) im Präparat dienten als Positivkontrolle (D: IRS 0). Alle 4 Bilder zeigen ein duktales Mammakarzinom.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Elf-1 und dem Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus konnte nicht festgestellt werden. 24 der östrogenrezeptorpositiven Fälle (58,5%) sind Elf-1 - negativ, 50 (64,1%) Elf-1 - positiv.

Von den progesteronrezeptorpositiven Fällen sind 19 (46,3%) Elf-1 - negativ, 34 (43,6%) Elf-1 – positiv .

Eine Her2/neu-Überexpression weisen 9 (56,2%) der diesbezüglich untersuchten Elf-1 – negativen und 23 (67,6%) der diesbezüglich untersuchten Elf-1 – positiven Fälle auf.

Von den 45 bzgl. der Expression von Elf-1 als negativ gewerteten Fällen, waren 16 als T1, 23 als T2 und 6 als T3/T4 klassifiziert worden (Einteilung der Tumorstadien siehe Kapitel 3.1). In der Gruppe der Elf-1 – positiven finden sich 43 als T1, 31 als T2 und 6 als T3/T4 klassifizierte Tumoren ( $p=0,13$ ).

22 der insgesamt 76 Fälle, welche als N0 klassifiziert worden waren, sind Elf-1 – negativ, 54 Elf-1 positiv. Von den 49 Tumoren, welche zum Zeitpunkt der Primärdiagnose bereits Lymphknotenmetastasen aufwiesen (N1) sind 23 Elf-1 - positiv und 26 Elf-1 – negativ ( $p=0,04$ ). In der histologischen Subgruppe der duktaalen Karzinome sind 66,7% der N0-Tumoren und 55,6% der N1-Tumoren Elf-1 positiv. Fernmetastasen fanden sich bei Diagnosestellung in 3 Elf-1 – negativen Fällen und einem Elf-1 – positiven Fall ( $p=0,09$ ).

Von den insgesamt 97 duktaalen Karzinomen ist das immunhistochemische Färbeergebnis für Elf-1 in 37 Fällen negativ und in 60 Fällen positiv. Alle 6 lobulären Karzinome sind Elf-1 positiv. Auf die selteneren Formen entfallen 2 negative und 11 positive Färbungen ( $p = 0,053$ ).

Eine Korrelation der Expression von Elf-1 mit Tumorstadium und Auftreten von Fernmetastasen, wie sie von Takai und Mitarbeitern (2003) für das Ovarial- und Endometriumkarzinom beschrieben wurde, war nicht feststellen. Im Gegenteil, das Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert signifikant ( $p=0,04$ ) mit einer geringen Expression von Elf-1 (Abb. 10).

Weiterhin kann ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Elf-1 und einer guten Differenzierung des Karzinoms nachgewiesen werden ( $p=0,002$ ). So sind 100% der als G1 (gut differenziert) eingestuften Karzinome ( $n=3$ ), 75,7% der als G2 (mäßig differenziert) eingestuften Karzinome ( $n=53$ ) und 47,1% der als G3 (schlecht differenziert) eingestuften Karzinome ( $n=24$ ) Elf-1-positiv (Abb. 9).

Auch in der Subgruppe der duktaalen Mammakarzinome sind 100% ( $n=3$ ) der G1-Tumoren Elf-1 - positiv; dagegen 73,5% der G2- und nur 47,7% der G3-Karzinome ( $p=0,015$ ).

Ein Einfluss des Patientenalters bei Diagnosestellung auf die Elf-1-Expression ließ sich nicht feststellen. Alle Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung mit dem Elf-1 Antikörper sind in den Tabellen 5 und 6 aufgelistet. Die Abbildung 8 zeigt exemplarisch immunhistochemische Färbungen mit dem Elf-1 Antikörper an Proben des Kollektivs.

Tab. 5:  
 Elf-1 Expression (immunohistochemischer Schwellenwert IRS  $\geq$  2) im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren bei allen untersuchten Tumoren

<b>Merkmal</b>	<b>N=125<sup>b</sup></b>	<b>Elf-1 positiv (N)</b>	<b>Elf-1 positiv (%)</b>	<b>p</b>
<i>Alter (in Jahren)</i>				
< 50	34	20	58,8	0,46 <sup>a</sup>
> 50	91	60	65,9	
<i>Lymphknotenstatus</i>				
N0	76	54	71,1	0,04 <sup>a</sup>
N1	49	26	53,1	
<i>TumorgroÙe</i>				
pT1	59	43	72,9	0,13 <sup>a</sup>
pT2	54	31	57,4	
pT3/4	12	6	50,0	
<i>Metastasierung</i>				
M0	121	79	65,3	0,09 <sup>a</sup>
M1	4	1	25,0	
<i>Histologisches Grading</i>				
G1	3	3	100,0	0,002 <sup>a</sup>
G2	70	53	75,7	
G3	51	24	47,1	
<i>Östrogenrezeptorstatus</i>				
negativ	45	28	62,2	0,55 <sup>a</sup>
positiv	74	50	67,6	
<i>Progesteronrezeptorstatus</i>				
negativ	66	44	66,6	0,77 <sup>a</sup>
positiv	53	34	64,1	
<i>Her2/neu</i>				
negativ	33	23	69,7	0,72 <sup>a</sup>
positiv	17	11	64,7	
<i>Histologie</i>				
duktal	96	60	62,5	0,038 <sup>a</sup>
lobulär	6	6	100,0	
andere	14	11	78,6	
nicht bekannt	9	3	33,3	

<sup>a</sup>: p nach  $\chi^2$ -Test (Pearson)

<sup>b</sup>: Aufgrund fehlender Werte konnten in einigen Berechnungen nicht alle Fälle eingeschlossen werden.

Tab. 6:  
 Elf-1 Expression (immunhistochemischer Schwellenwert IRS  $\geq$  2) im Vergleich mit klinisch-pathologischen Faktoren in der Gruppe der duktaalen Karzinome.

<b>Merkmal</b>	<b>N=96</b>	<b>Elf-1 positiv (N)</b>	<b>Elf-1 positiv (%)</b>	<b>p</b>
<i>Alter in Jahren</i>				
< 50	26	16	61,5	0,91
> 50	70	44	62,9	
<i>Lymphknotenstatus</i>				
N0	60	40	66,7	0,28
N1	36	20	55,6	
<i>TumorgroÙe</i>				
pT1	43	31	72,1	0,20
pT2	43	24	55,8	
pT3/4	10	5	50,0	
<i>Histologisches Grading</i>				
G1	3	3	100,0	0,015
G2	49	36	73,5	
G3	44	21	47,7	
G3				
<i>Östrogenrezeptorstatus<sup>b</sup></i>				
negativ	37	22	59,5	0,67
positiv	58	37	63,8	
<i>Progesteronrezeptorstatus<sup>b</sup></i>				
negativ	54	36	66,7	0,29
positiv	41	23	56,1	
<i>Her2/neu<sup>b</sup></i>				
negativ	27	18	66,7	0,78
positiv	16	10	62,5	

<sup>a</sup> : p nach  $\chi^2$ -Test (Pearson)

<sup>b</sup> : Aufgrund fehlender Werte konnten in einige Berechnungen nicht alle Fälle eingeschlossen werden.

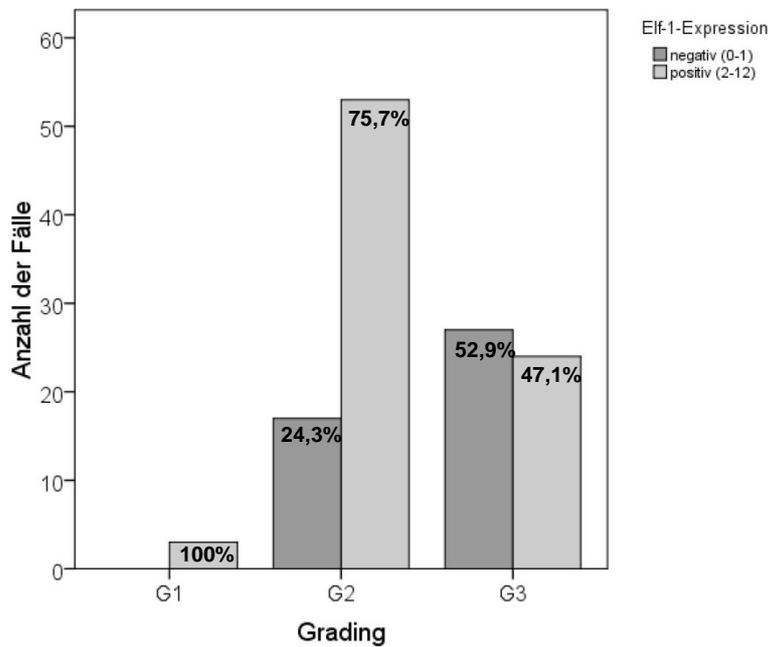


Abb. 9: Häufigkeitsverteilung von Elf-1 positiven und Elf-1 negativen Tumoren in Relation zum Grading. Schlecht differenzierte Mamma-karzinome weisen häufiger eine geringe Expression von Elf-1 auf. (p=0,002)

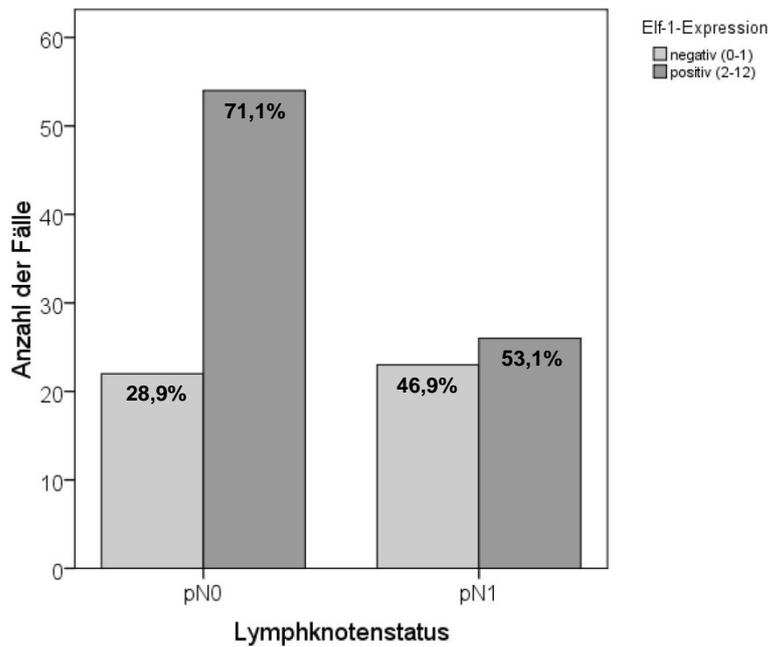


Abb. 10: Häufigkeitsverteilung von Elf-1 positiven und Elf-1 negativen Tumoren in Relation zum Nodalstatus. Karzinome mit lymphonodaler Metastasierung weisen eine geringere Expression von Elf-1 auf. (p=0,04)

### 3.2.1 Elf-1 und klinisch-pathologische Faktoren im Patientenkollektiv 2

Extrakte von 100 Tumorproben invasiver Mammakarzinome wurden mittels Westernblotanalyse auf die Expression von Elf-1 untersucht und der Elf-1-Proteinlevel semiquantitativ bestimmt. Davon gingen 90 Proben in die im Folgenden aufgeführten Untersuchungsergebnisse ein. Die übrigen Proben wurden aufgrund der fraglichen Auswertbarkeit bei schlechter Blotqualität bzw. aufgrund des Fehlens der klinisch-pathologischen Daten nicht für die Berechnungen herangezogen.

In allen untersuchten Proben ließ sich jeweils nur eine Elf-1 – Bande mit einem Molekulargewicht von 80 kDa darstellen (Abb. 11). Die relative Elf-1 Bandenintensität beträgt im Mittel 0,99 (Minimum: 0,72; Maximum: 1,18, Median 0,82).

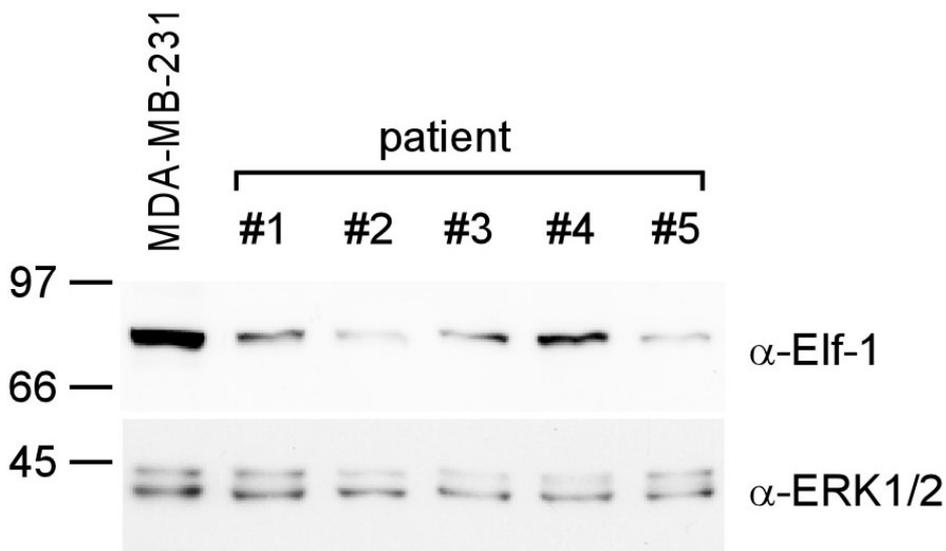


Abb. 11: Nachweis von Elf-1 in Extrakten aus Brustkrebsgewebe und MDA-MB-231 Zellen mit Hilfe der Westernblotanalyse. Wie hier am Beispiel von 5 Brustkrebsgewebsextrakten gezeigt, war nur die 80 kDa-Elf-1 Isoform nachweisbar. Anti-ERK1/2 diente zur Überprüfung der Proteinbeladung des Gels.

Alle Ergebnisse der Westernblotuntersuchungen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Elf-1 Bandenintensität wurde mit klinisch-pathologischen Daten, der Expression der Prognosefaktoren uPA und PAI-1, die mittels ELISA gemessen wurden, und den Westernblotdaten für das tumorrelevante Protein ARHGDI B (Schunke et al., 2007) verglichen. Bei uPA und PAI-1 wurden die Daten in zwei Gruppen bezüglich ihres klinisch-relevanten Schwellenwertes (für uPA) = 3 ng/mg Protein, für PAI-1 = 14 ng/mg Protein) eingeteilt (Jänicke et al., 2001).

Tab. 7:  
Relative Elf-1 Expression (Westernblot) im Vergleich zu klinisch-pathologischen Faktoren

<b>Merkmal</b>	<b>N=90<sup>c</sup></b>	<b>Median (relative Elf-1 Expression)</b>	<b>p</b>
<i>Alter (in Jahren)</i>			
< 50	15	0,66	0,71 <sup>a</sup>
> 50	74	0,74	
<i>Lymphknotenstatus</i>			
N0	66	0,82	0,12 <sup>a</sup>
N1	23	0,53	
<i>TumorgroÙe</i>			
pT1	53	0,54	0,02 <sup>a</sup>
pT2	36	0,96	
<i>Histologisches Grading</i>			
G1	11	0,51	0,31 <sup>b</sup>
G2	41	0,54	
G3	38	0,85	
<i>Östrogenrezeptorstatus</i>			
negativ	13	0,80	0,99 <sup>a</sup>
positiv	77	0,71	
<i>Progesteronrezeptorstatus</i>			
negativ	33	0,74	0,94 <sup>a</sup>
positiv	56	0,72	
<i>ARGHDIB</i>			
low or none	43	0,52	0,005 <sup>a</sup>
high	42	0,94	
<i>uPA</i>			
< 3 ng/mg	57	0,54	0,04 <sup>a</sup>
> 3 ng/mg	31	0,99	
<i>PAI-1</i>			
< 14 ng/mg	65	0,54	0,01 <sup>a</sup>
> 14 ng/mg	24	1,11	

<sup>a</sup>: p nach Mann-Whitney-U-Test <sup>b</sup>: p nach Kruskal-Wallis-Test

<sup>c</sup>: Aufgrund fehlender Werte konnten in einige Berechnungen nicht alle Fälle eingeschlossen werden.

Die mediane relative Elf-1 Expression beträgt für Patientinnen, die jünger als 50 Jahre alt waren 0,66, in der Altersgruppe > 50 Jahre 0,74. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und der Elf-1 Expression besteht somit nicht ( $p=0,71$ ). Bei den Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen liegt die mediane Elf-1 Expression mit 0,82 höher als mit 0,53 bei den Patientinnen mit Befall der Lymphknoten ( $p=0,12$ , Abb. 12A). Demnach wird Elf-1 tendenziell weniger im Brustkrebs exprimiert, wenn der Tumor nicht nodal metastasiert ist. Ein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,02$ ) besteht zwischen der Elf-1 Expression und dem Tumorstadium (Abb. 12B). Die mediane Elf-1-Expression beträgt in der Gruppe der T1 – Tumoren 0,54 im Vergleich zu 0,96 in der Gruppe der T2 – Tumoren. Hingegen ist kein Zusammenhang zwischen der Elf-1 Expression und dem histologischen Grading nachzuweisen ( $p=0,31$ ). Auch gibt es keine Assoziation zwischen der Elf-1-Expression und der Expression der Steroidhormonrezeptoren ER und PR (ER:  $p=0,99$ , PR:  $p=0,94$ ).

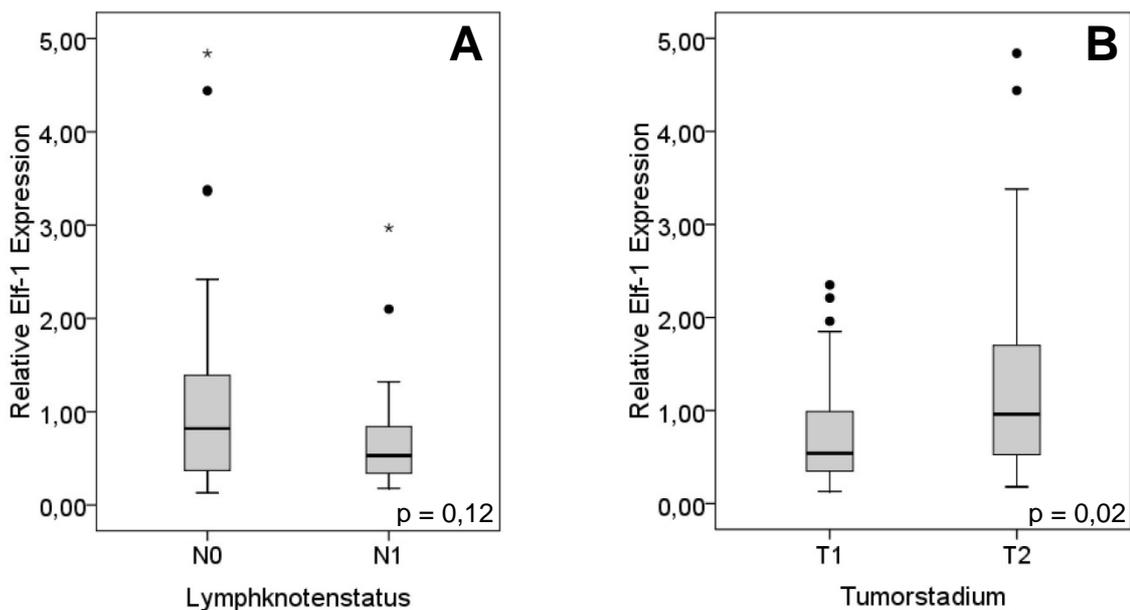


Abb. 12 : Elf-1 Expression bei unterschiedlichem Nodalstatus (A) und Tumorstadium (B) Die Boxplot-Darstellungen zeigen, dass bei lymphonodaler Metastasierung die mediane relative Elf-1 Expression (Westernblotanalyse) tendenziell reduziert ist ( $p=0,12$ ), während die mediane Elf-1 Expression mit der Tumorstadium wächst ( $p=0,02$ ).

Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Elf-1 Expression und der Expression der Ets-Targetgene uPA und PAI-1, welche als bedeutende prognostische und prädiktive Faktoren für das Mammakarzinom etabliert sind (Harbeck et al., 2002), wurde untersucht. Die mittels ELISA von der Universitätsfrauenklinik Hamburg Eppendorf am selben Kollektiv erhobenen uPA und PAI-1 Konzentrationen wurden aufgrund der Prognose-relevanten Schwellenwerte (3 ng/ml für uPA, 14 ng/ml für PAI-

1, Jänicke et al., 2001) in jeweils zwei Subgruppen unterteilt. Diese Subgruppen unterscheiden sich signifikant in ihrer medianen relativen Elf-1 Expression. Diese beträgt 0,54 für die Subgruppe mit uPA – Konzentrationen unterhalb des Schwellenwertes und 0,99 bei der Subgruppe mit uPA-Werten oberhalb des Schwellenwertes ( $p=0,04$ ). Ähnlich verhält es sich mit den beiden PAI-1-Subgruppen (mediane relative Elf-1 Expression 0,54 im Vergleich zu 1,01,  $p=0,01$ ). Somit korrelieren die uPA und PAI-1 Expression signifikant mit der Elf-1 Expression (Abb. 13A, 13B).

Wird die Berechnung invers durchgeführt, indem man die Tumoren in zwei Gruppen mit hoher und niedriger Elf-1 Expression (Schwellenwert: Elf-1-Median = 0,72, berechnet unter Berücksichtigung aller Tumoren) aufteilt, so bestätigt sich der Zusammenhang zwischen der Elf-1- und der uPA- bzw. PAI-1-Expression (uPA:  $p=0,03$ , PAI-1  $p=0,02$ ). Für die Karzinome der Gruppe mit geringer relativer Elf-1 Expression beträgt die Konzentration von uPA im Mittel 2,3 ng/mg und die von PAI-1 7,5 ng/mg (Abb. 14). Bei hoher Elf-1 Expression liegen die mittleren Proteinkonzentrationen bei 3,8 ng/mg für uPA und 17,5 ng/mg für PAI-1.

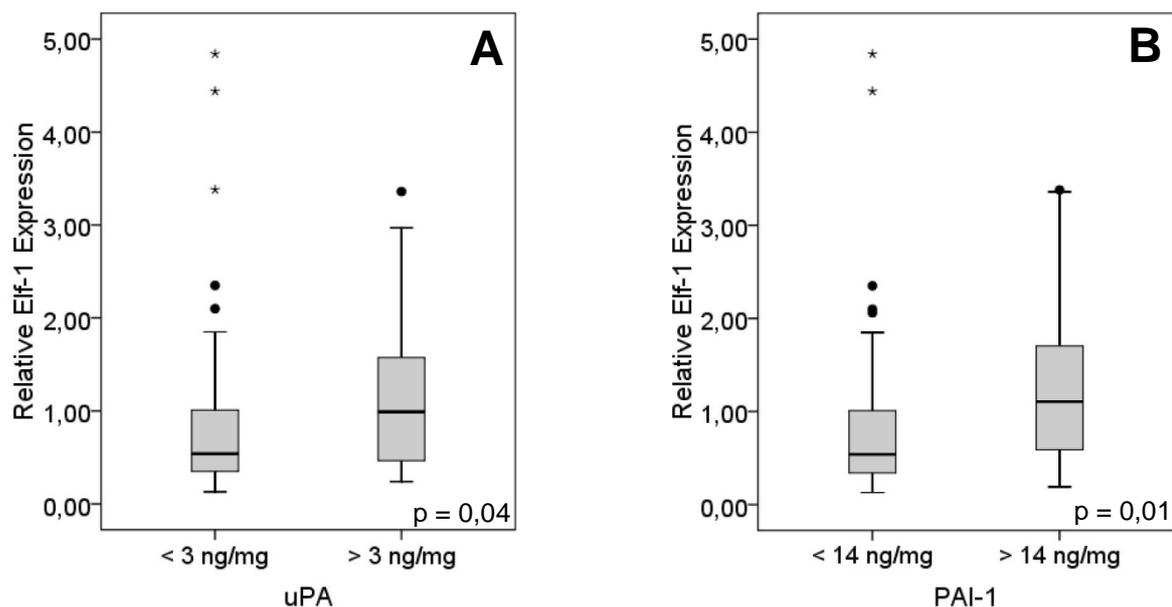


Abb. 13: Elf-1 Expression bei unterschiedlichen uPA und PAI-1 Konzentrationen  
Die Boxplot-Darstellungen zeigen, dass die mediane relative Elf-1 Expression (Westernblotanalyse) bei uPA und PAI-1 Konzentrationen oberhalb ihres Prognose-relevanten Schwellenwertes, signifikant höher ist als unterhalb dieses Wertes.

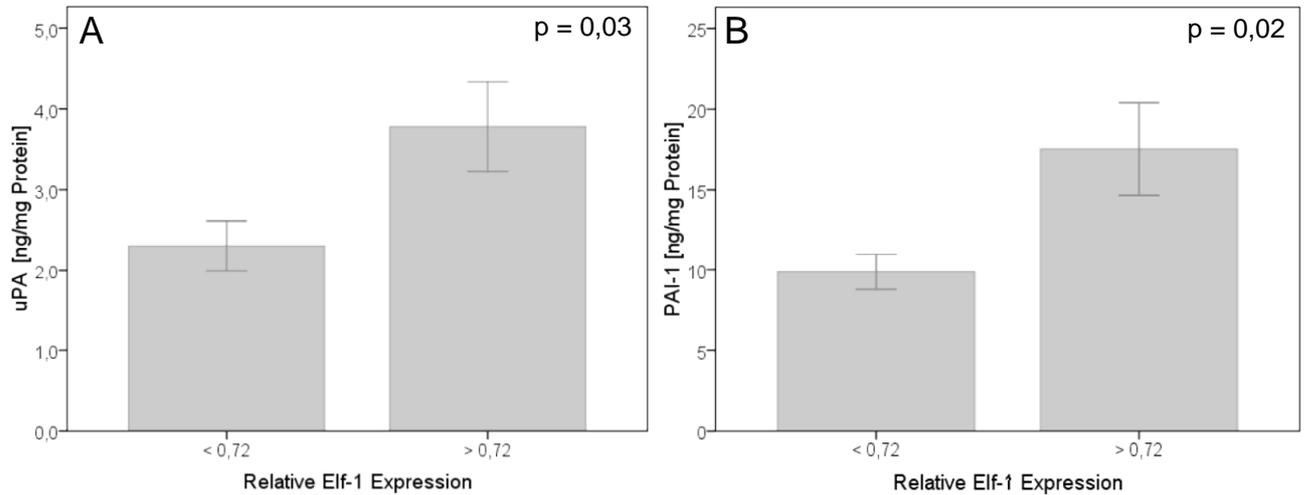


Abb. 14: PAI-1 und uPA Expression bei niedriger und hoher Elf-1 Expression  
Die mittleren Konzentrationen von uPA (A) und PAI-1 (B) sind bei hoher relativer Elf-1 Expression (Westernblotanalyse) signifikant höher als bei geringer relativer Elf-1 Expression. (Balken: arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung)

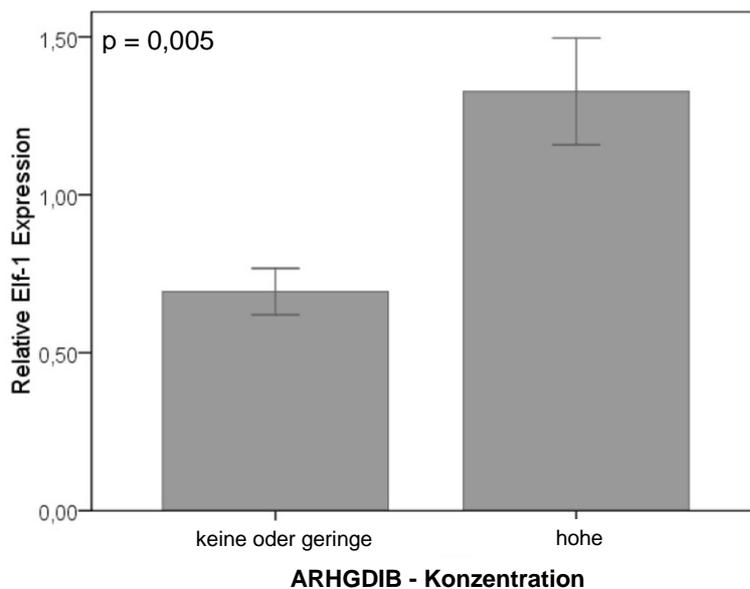


Abb. 15: Elf-1 Expression bei unterschiedlicher ARHGDI B Expression  
Die mittlere relative Elf-1 Expression ist bei hoher Konzentration von ARHGDI B im Tumorextrakt signifikant höher als bei geringer bzw. fehlender Expression von ARHGDI B (Balken: arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung)

Bringt man die relative Elf-1 Konzentration mit einem weiteren Targetgen des Transkriptionsfaktors, ARHGDI B in Zusammenhang, so zeigt sich ebenfalls eine signifikante Korrelation. Die mediane relative Elf-1 Expression für Proben mit geringer oder ohne ARHGDI B-Expression beträgt 0,52 im Vergleich zu 0,94 bei hoher ARHGDI B-Expression ( $p=0,005$ , Abb. 15).

### **3.3 Elf-1 Expression und Überleben**

Die Patientinnen des Kollektivs 1, welches immunhistochemisch untersucht wurde, wurden von der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe in regelmäßigen Intervallen klinisch kontrolliert, so dass zusätzlich zu den o. g. Untersuchungen auch Analysen bezüglich des Einflusses der Elf-1 - Expression auf das Überleben der Patientinnen durchgeführt werden konnten. Für das Patientenkollektiv 2 lagen mir keine Überlebensdaten vor.

Zum Zeitpunkt des Untersuchungsabschlusses (März 2006) waren 16 (12,8%) von den 125 untersuchten Patientinnen des Kollektiv 1 verstorben. Von diesen starben 14 (11,2%) an der Tumorerkrankung und 2 (1,6%) aufgrund anderer Ursachen. Die Überlebensdaten von 6 der 125 Patientinnen fehlten. So konnten für eine Überlebensanalyse nur 119 Patientinnen berücksichtigt werden. Die Überlebensanalyse für diese 119 Patientinnen wurde nach Kaplan-Meier durchgeführt. Sie ergab, dass die Elf-1-Expression im Tumor keinen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben der Brustkrebspatientinnen hatte (Abb. 16A). Auch eine subgruppenspezifische Analyse führte zu keiner Assoziation zwischen der Elf-1 Expression und der Prognose. Das galt für die Subgruppe mit ausschließlich duktalem Karzinomen (Abb. 16B) sowie für Subgruppen mit Patientinnen, die entweder nur mit dem Anti-Estrogen Tamoxifen behandelt worden waren (Abb. 16C) oder die in einer Kombinationstherapie CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Flouruacil) erhalten hatten (Abb. 16D)

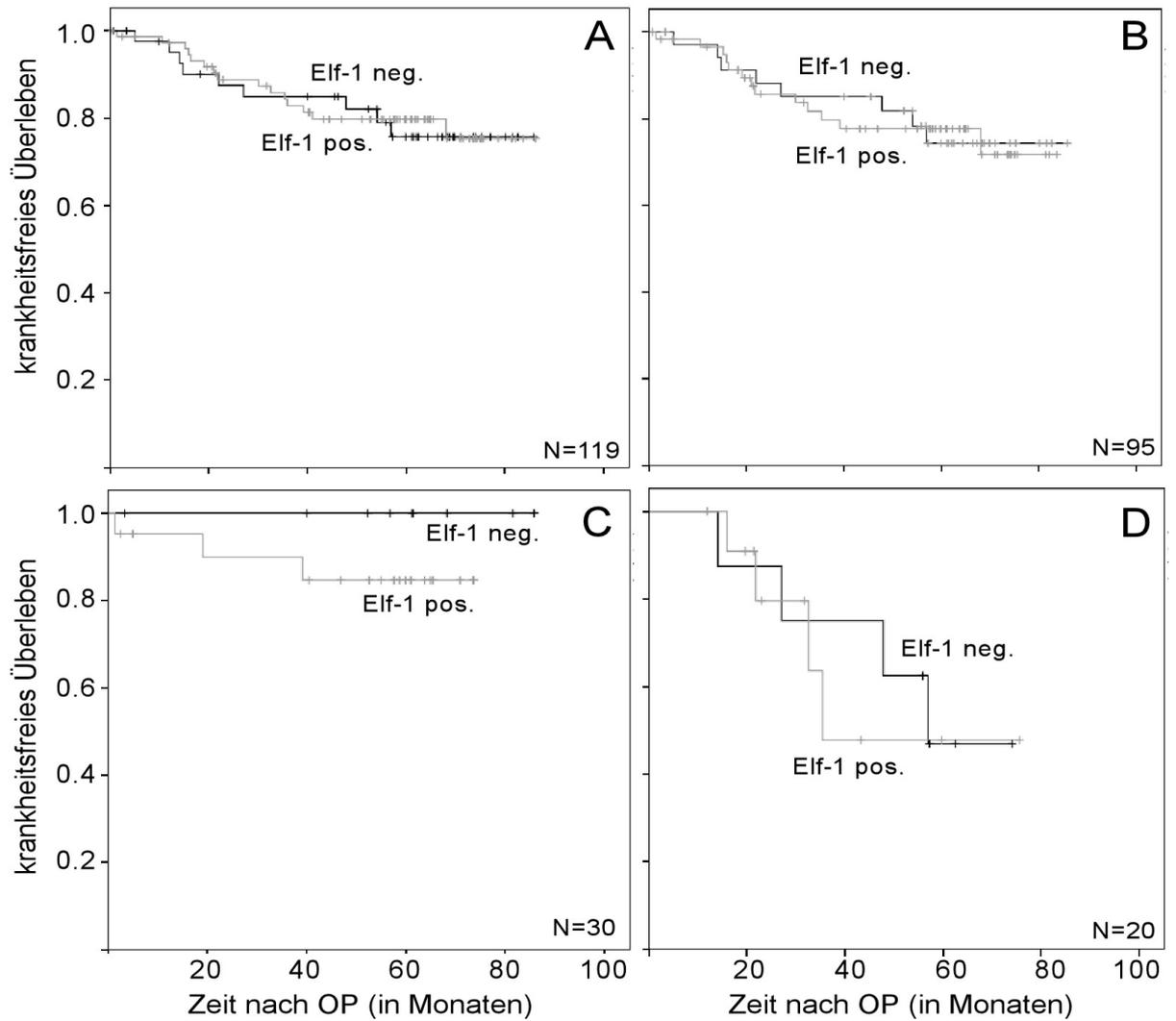


Abb. 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das Gesamtkollektiv und für Patientensubgruppen bei negativer und positiver tumoraler Elf-1 Expression. Die Einteilung in negative und positive Elf-1 Expression erfolgte nach immunohistochemischer Auswertung wie im Methodenteil beschrieben. Die Überlebensanalyse wurde durchgeführt für das gesamte Kollektiv (A), für die Patientengruppe mit nur duktalem Mammakarzinom (B) sowie für Patientengruppen, die entweder nur mit Tamoxifen (C) oder ausschließlich mit CMF behandelt wurden (D).

## **4. Diskussion**

### **4.1 Elf - 1 beim invasiven Mammakarzinom**

Elf-1 ist ein Ets – Transkriptionsfaktor, der die Transkription zahlreicher tumorrelevanter Gene reguliert und dessen Expression und Bedeutung bei einigen Malignomen bereits untersucht worden ist. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass Elf-1 eine prognostische oder prädiktive Relevanz beim invasiven Mammakarzinom hat. Studien, die diese Fragestellung bearbeitet haben, sind meines Wissens bisher nicht durchgeführt worden. In meiner Arbeit habe ich zwei Patientenkollektive auf die Expression des Elf-1 Proteins hin untersucht, die Expression mit klinisch-pathologischen Faktoren verglichen und die prognostische Bedeutung der Elf-1 Präsenz erkundet. Beim Patientenkollektiv 1 wurde das Ets1-Protein immunhistochemisch, beim Patientenkollektiv 2 mittels Westernblotanalyse semiquantifiziert. In der immunhistochemischen Untersuchung wiesen 64% der untersuchten Karzinome eine Expression von Elf -1 auf. Im Rahmen der Westernblotanalyse ließ sich das Protein in allen untersuchten Tumorextrakten des Kollektivs nachweisen. Der Transkriptionsfaktor Elf-1 wird somit in invasiven Mammakarzinomen exprimiert.

#### **4.1.1 Elf - 1 – Expression und klinisch-pathologische Prognosefaktoren**

Zu den klassischen klinisch-pathologischen Prognosefaktoren gehören Tumorgroße, Lymphknotenmetastasen und Grading. Hohe Mortalität und hohes Rezidivrisiko korrelieren mit großem Tumordurchmesser, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und schlechter Differenzierung. Ein Vergleich der Ergebnisse zur Elf-1 Expression in Relation zu diesen klinisch-pathologischen Faktoren in den Kollektiven 1 und 2 ist in Tabelle 8 dargestellt. Einerseits gibt es Gemeinsamkeiten zwischen beiden Kollektiven, als keine Abhängigkeit der Elf-1 Expression vom Patientenalter und Hormonrezeptorstatus besteht und die Elf-1 Expression mit dem Nodalstatus abnimmt, wenn auch dieser Zusammenhang im Kollektiv 2 nicht signifikant ist. In der Westernblotanalyse (Kollektiv 2) zeigen Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen eine höhere relative Elf-1 - Expression als N1 – Tumoren (N0: 0,82; N1: 0,53;  $p = 0,12$ ). Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung (Kollektiv 1) ist mit 71,1% Elf-1 - positiven Tumoren in der N0 – Gruppe im Vergleich zu 63,1% in der N1 – Gruppe signifikant ( $p = 0,04$ ). Betrachtet man allein die Subgruppe der dukalen Mammakarzinome im Kollektiv 1 geht diese Signifikanz allerdings verloren. Tendenziell ist aber mit 66,7% Elf-1 - positiven Tumoren in der N0-Gruppe im Vergleich zu 55,6% Elf-1 - positiven Tumoren in der N1-Gruppe die Elf-1 Expression in

nodalnegativen Tumoren nach wie vor erhöht ( $p=0,28$ ). Es kann daher für beide Kollektive die Aussage getroffen werden, dass die Elf-1 Expression bei nodalmetastasierten Tumoren niedriger ist.

Auf der anderen Seite bestehen auch Unterschiede zwischen beiden Kollektiven. Insbesondere besteht im Kollektiv 1 ein signifikanter Zusammenhang zwischen Elf-1 Expression und Grading, der im Kollektiv 2 nicht auftritt. Im Kollektiv 1 war in der Gruppe der G 2-Tumoren (56,8%) der Anteil Elf-1 – positiver Färbungen signifikant größer als in der Gruppe der G 3-Tumoren (40,8%): G1: 100% Elf-1 positiv; G2: 75,7% Elf-1 positiv; G3: 47,1% Elf-1 positiv;  $p= 0,002$ . Auch in der Gruppe der duktal klassifizierten Karzinome zeigt sich mit G1: 100% Elf-1 positiv; G2: 73,5% Elf-1 positiv; G3: 47,7% Elf-1 positiv;  $p=0,002$  ein signifikanter Unterschied. Kein Zusammenhang zwischen Grading und Elf-1 Expression ließ sich hingegen im Kollektiv 2 anhand der Westernblotanalyse nachweisen. Bei der Bewertung des im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung gesehenen Zusammenhangs zwischen der Expression von Elf-1 und guter Differenzierung des Tumors muss der Effekt der Verteilung des Proteins im bei schlechter Differenzierung deutlich größeren Zellkern und somit visuell blasserem Färbeergebnis Beachtung finden. Dies kann bei der Beurteilung des Färbeergebnisses nach dem IRS-Score eine geringere Expression von Elf-1 im schlechter differenzierten Tumor vortäuschen. Parallel durchgeführte immunhistochemische Färbungen mit Prothymosin  $\alpha$ , einem nukleär lokalisierten, mit der Zellproliferation in Zusammenhang stehenden Protein, zeigten diesbezüglich jedoch keine Unterschiede. Da die Zahl der Mitosen in das Grading (SBR – Scarff-Bloom-Richardson-Klassifikation) einfließt und Elf-1 die Expression zellzyklusrelevanter Zielgene via Interaktion mit der unphosphorylierten Form des Rb (retinoblastoma protein) beeinflusst, sollte eine separate Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Elf-1 – Expression und der Zahl der Mitosen erfolgen, um diesbezüglich Klarheit zu schaffen.

Ebenso gibt es einen Unterschied zwischen den beiden Kollektiven im Bezug auf Tumorgröße und Elf-1 Expression. In den Westernblotuntersuchungen lässt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen höherer medianer Elf-1 Expression und größerem Tumorstadium nachweisen, während die immunhistochemische Analyse einen tendenziell, wenn auch nicht signifikanten, gegenteiligen Zusammenhang erkennen lässt. So zeigt die Westernblotuntersuchung bei T1-Tumoren eine signifikant geringere relative Elf-1 Expression als bei T2-Tumoren (T1: 0,54; T2: 0,96;  $p = 0,02$ ). In der immunhistochemischen Analyse hingegen ist der Anteil Elf-1 - positiver Tumoren in der Gruppe der T1-Karzinome tendenziell höher als bei größeren Tumoren (T1:

72,9%; T2: 57,4%; T3: 50,0%;  $p=0,13$ ). Die Verteilung der T1- und T2-Tumoren ist in beiden Gruppen vergleichbar.

Verschiedene Gründe können für die widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich sein. In der immunhistochemischen Analyse wird ausschließlich das Elf-1 – Protein in den Tumorzellkernen semiquantitativ und untersucherabhängig bestimmt. Hingegen fließen in das Ergebnis der Westernblotuntersuchungen auch die Elf-1 – Proteinmengen im Zytosol der Tumorzellen sowie in Immun-, Bindegewebs- und Endothelzellen ein. Stromale Zellen beeinflussen also die Ergebnisse der Westernblotuntersuchung. Somit kann durch die Expression von Elf-1 in stromalen Zellen der Elf-1 Proteinlevel bei der Westernblotanalyse höher ausfallen als bei dem immunhistochemischen Nachweis, bei dem nur die Elf-1 Expression in Tumorzellen berücksichtigt wurde. Hier sei besonders auf die Lymphozyten hingewiesen, die Elf-1 stark exprimieren und als Positivkontrolle in der immunhistochemischen Untersuchung von Elf-1 dienten. Ein weiterer Aspekt ist, dass in den Westernblots ausschließlich die zytosolische Form von Elf-1 (80 kDa) nachgewiesen wurde, während die nukleär lokalisierte 98 kDa-Form nicht nachweisbar war. In der Westernblotanalyse wurde also die 98 kDa-Form nicht mit berücksichtigt. Zusammenfassend könnten also sowohl die Mitberücksichtigung der stromalen Zellen als auch die Nichtberücksichtigung der 98 kDa Elf-1 Isoform bei der Westernblotanalyse die Ursache für die abweichenden Ergebnisse zu der immunhistochemischen Analyse sein.

Ein Einfluss auf die Tumorsterblichkeit ließ sich in der Überlebensanalyse nicht nachweisen. Diese konnte nur für das Kollektiv 1 durchgeführt werden, da für das Kollektiv 2 keine Überlebensdaten vorlagen. Es zeigte sich weder für das gesamte Kollektiv 1 noch für die Subgruppe der duktaalen Karzinome ein Einfluss auf das Überleben der Patientinnen; auch nicht in Abhängigkeit von der erfolgten Therapie (CMF bzw. Tamoxifen). Da im Kollektiv 1 die Expression von Elf-1 mit guter Differenzierung des Tumors und kleinem Tumorstadium korreliert, wäre ein positiver Effekt der Elf-1-Expression auf das Patientenüberleben zu erwarten gewesen. Hier seien jedoch erneut einschränkend die Untersucherabhängigkeit in der Bewertung des immunhistochemischen Färbeergebnisses und das Fehlen von Überlebensdaten einiger Fälle erwähnt.

Tab. 8:  
Klinisch-pathologische Parameter, die bei beiden Kollektiven bekannt sind, und Elf-1 Expression.

<b>Untersucher Parameter</b>	<b>Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung (n=125)<sup>d</sup></b> (% Elf-1 positiv in Subgruppe, IRS ≥ 2) Kollektiv 1	<b>p</b>	<b>Ergebnis der Westernblot-untersuchung (n=90)<sup>d</sup></b> (relative mediane Elf-1 Expression) Kollektiv 2	<b>p</b>
<i>Alter (in Jahren)</i>				
< 50	58,8%	0,46 <sup>a</sup>	0,66	0,71 <sup>b</sup>
> 50	65,9%		0,74	
<i>Tumorstadium</i>				
pT1	72,9%	↑	0,54	0,02 <sup>b</sup>
pT2	57,4%		0,96	
pT3/4	50,0%		-	
<i>Lymphknotenstatus</i>				
N0	71,1%	↑	0,82	0,12 <sup>b</sup>
N1	63,1%		0,53	
<i>Grading</i>				
G1	100,0%	↑	0,51	0,31 <sup>c</sup>
G2	75,7%		0,54	
G3	47,1%		0,85	
<i>Hormonrezeptoren</i>				
ER –	62,2%	0,55 <sup>a</sup>	0,80	0,99 <sup>b</sup>
ER +	67,6%		0,71	
PR –	66,6%	0,77 <sup>a</sup>	0,74	0,94 <sup>b</sup>
PR +	64,1%		0,72	

<sup>a</sup>:  $\chi^2$  nach Pearson <sup>b</sup>: p nach Mann-Whitney-U-Test <sup>c</sup>:p nach Kruskal-Wallis-Test

<sup>d</sup>: Aufgrund fehlender Werte konnten in einige Berechnungen nicht alle Fälle eingeschlossen werden.

↑ Richtung der Elf-1 Expressionszunahme

#### 4.1.2 Elf - 1 – Expression und neuere Prognosefaktoren

Viele tumorrelevante Gene besitzen Ets-Bindungsstellen, die eine Regulation durch Ets- Transkriptionsfaktoren ermöglichen. Die genaue Zuordnung eines Mitgliedes der Ets-Familie zu einem regulierten Gen gelang bisher nur in wenigen Fällen. Es ist davon auszugehen, dass die Bindungsstellen der Ets-regulierten Gene von mehreren Ets-Transkriptionsfaktoren besetzt werden können. Mittels CHIP-CHIP-Analyse ließ sich nachweisen, dass das Protooncogen Ets-1 und Elf-1 dieselben Gene regulieren können (Hollenhorst et al., 2007). Die Mitglieder der Ets-Familie können dabei sogar gegenteilige Effekte auf die Genexpression haben. Die oben genannten, für das Mammakarzinom prognostisch relevanten Faktoren uPA und PAI-1 (Harbeck et al., 2002) wurden am selben Kollektiv untersucht, an dem die Expression von Elf-1 mittels Westernblotuntersuchung analysiert wurde. uPA und PAI-1 beeinflussen die Degradation der extrazellulären Matrix und somit die Invasivität von Tumoren. Beim Mammakarzinom werden sie mit höherer Rezidivhäufigkeit und Mortalität in Zusammenhang gebracht (Look et al., 2002). Die Expression von uPA und PAI-1 wird durch Ets-Transkriptionsfaktoren reguliert (Sementchenko et al., 2000).

Im Kollektiv 2 (Westernblotanalyse) wurde die Elf-1 Expression auch mit der Expression von potenziellen Zielgenen (uPA, PAI-1, ARHGDIB) verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation der Proteinexpression von Elf-1 mit der Proteinkonzentration von uPA ( $p=0,04$ ) und PAI-1 ( $p=0,019$ ). Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass Elf-1 die Transkription Ets-regulierter Gene, hier uPA und PAI-1, im Brustkrebs regulieren kann. Die Konzentrationen von uPA und PAI-1 wurden in denselben Tumorextrakten gemessen, die auch für die Westernblotanalyse benutzt wurden. D.h. die uPA and PAI-1 Level der Stromalen Zellen wurden ebenfalls erfasst. Es ist daher unklar, ob die Korrelationen zwischen uPA/PAI-1 und Elf-1 Expression für die Tumorzellen oder die Stromalen Zellen gilt oder für beide Zelltypen.

Zu den Ets-regulierten Genen gehört auch ARGHDIB. Dieses zur Gruppe der Rho-GDIs gehörende Protein reguliert die Expression der Rho-Proteine. Die Rho-Proteine haben wichtige Funktionen in Zelladhäsion, Zellmotilität, Zellzykluskontrolle und Apoptose. Die Rho-GDIs wirken inhibitorisch auf diese Funktionen und galten daher als Tumorsuppressorgene. Für einige Malignome, u. a. das Ovarialkarzinom, konnte jedoch eine Überexpression von ARGHDIB (Rho-GDIß) in invasiven Zelllinien nachgewiesen werden (Tapper et al., 2001). Beim Mammakarzinom gibt es sowohl Hinweise auf eine progressionsfördernde, als auch progressionshemmende Wirkung von ARGHDIB (Schunke et al., 2007, Zhang et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit ließ sich für Tumoren mit hoher ARGHDIB-Expression auch eine signifikant höhere Elf-1 – Expression zeigen. Somit besteht ein Hinweis darauf, dass ARGHDIB als Ets-

Targetgen durch Elf-1 reguliert wird. Auch hier lässt sich zwischen Stromalen und Tumorzellen nicht unterscheiden.

Zusammenfassend besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Elf-1 Proteinexpression und der Expression von potenziellen Zielgenen in dem von mir untersuchten Kollektiv 2. Dies deutet darauf hin, dass Elf-1 an der Regulation dieser Proteine in Tumorzellen und/oder Stromazellen des Brustkrebsgewebes beteiligt ist.

#### 4.1.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Transkriptionsfaktor Elf-1, dessen Zielsequenz sich in den Promotorbereichen vieler tumorrelevanter Gene befindet, beim invasiven Mammakarzinom exprimiert ist. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Elf-1 und der Expression der für das Mammakarzinom bedeutsamen prognostischen/prädiktiven Faktoren uPA und PAI-1 sowie für den Faktor ARHGDI1. Diese werden mit vermehrter Invasivität in Zusammenhang gebracht. Der Nachweis einer höheren Elf-1-Expression in größeren Tumoren in der Westernblotuntersuchung unterstreicht diesen Zusammenhang. Elf-1 beeinflusst somit möglicherweise die Tumorprogression von Mammakarzinomen, in dem es die Transkription der für uPA, PAI-1 und ARHGDI1 codierenden Gene reguliert. Der in der immunhistochemischen Untersuchung gesehene Zusammenhang zwischen Elf-1-Expression und guter Differenzierung des Tumors widerspricht dieser Annahme. Ein Einfluss auf die Tumormetastasierung und Mortalität ließ sich nicht nachweisen. Möglicherweise beeinflusst Elf-1 auch Gene, die die Tumorprogression hemmen, so dass seine potenziell tumorfördernde Wirkung über uPA/PAI-1 durch die Stimulierung von Tumorsuppressorgenen wieder aufgehoben sein könnte. Andererseits könnten Methodik, und die Wahl des Untersuchungsgutes dazu beigetragen haben, dass kein Zusammenhang zwischen Elf-1 Expression und Prognose zu beobachten war. Beispielsweise war in den beiden Kollektiven die Zahl hoher Tumorstadien (T3 und T4) sehr gering bzw. fehlten diese ganz. Zudem wurden in beide Kollektive wenige Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen eingeschlossen.

Ob Elf-1 via Regulation der Expression von uPA und PAI-1, welche als prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf Chemotherapie gelten, ebenfalls eine Vorhersage bzgl. des Krankheitsverlaufes bei bestimmter Therapie liefern kann, bleibt offen und bedarf weiterführender Studien an größeren und über einen längeren Zeitraum nachbeobachteten Patientinnengruppen.

## **4.2 Schlussfolgerung**

Ein wichtiges Ziel bei der Bekämpfung häufiger maligner Erkrankung wie des Mammakarzinoms ist es, prognostische und prädiktive Faktoren zu finden und zu etablieren, da diese für die betroffenen Patientinnen entscheidende Hinweise bei der Auswahl der effektivsten Therapie geben und somit zur Senkung der Mortalität beitragen können. Die Frage, ob der tumorrelevante Transkriptionsfaktor Elf-1 ein solcher Faktor sein könnte, lässt sich anhand meiner Ergebnisse nicht eindeutig beantworten. Zwar ergab sich kein Zusammenhang zwischen Elf-1 Proteinexpression und Prognose, doch korrelierte die Elf-1 Expression negativ mit dem Nodalstatus. Auch eine Korrelation zwischen der Elf-1 Expression mit der Expression von den etablierten Prognosefaktoren uPA und PAI-1 konnte sich nachweisen lassen. Die negative Korrelation mit dem Nodalstatus auf der einen Seite und die positive Korrelation mit uPA/PAI-1 auf der anderen Seite könnte auf eine komplexe Einflussnahme von Elf-1 auf die Tumorprogression hindeuten, die letztendlich zu keinem sichtbaren Effekt von Elf-1 auf die Prognose führen.

## **5. Literaturverzeichnis**

Andrews PGP, Kennedy MW, Popadiuk CM, Kao KR (2008): Oncogenic Activation of the Human Pygopus2 Promoter by E74-Like Factor-1. *Mol Cancer Res*; 6:259-266.

Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KP, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R, Qizilbash A, Ambus U, Lipa M, Weizel H, Katz A, Baida M, Mariz S, Stoik G, Dacamara P, Strongitharm D, Geddie W, McCready D (1998): neu/erbB-2 amplification identifies a poor prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 16, 1340-9

Band PR, Le ND, Fang R, Deschamps M (2002): carcinogenic and endocrine disrupting effects of cigarette smoke and risk of breast cancer. *Lancet* 360, 1044-9

Banks E and Canfell K (2010): Recent declines in breast cancer incidence: mounting evidence that reduced use of menopausal hormones is largely responsible. *Breast Cancer Research*, 12:103

Bassuk AG, Barton KP, Anandappa RT, Lu MM, Leiden JM (1998): expression pattern of the Ets-related transcription factor Elf-1. *Mol Med.* 4(6):392-401

Berclaz G, Li S, Price KN, Coates AS, Castiglione-Gertsch M, Rudenstam CM, Holmberg SB, Lindtner J, Erien D, Collins J, Snyder R, Thürlimann B, Fey MF, Mendiola C, Werner ID, Simoncini E, Crivellari D, Gelber RD, Goldhirsch A; International Breast Cancer Study Group (2004): body mass index as a prognostic feature in operable breast cancer: the International Breast Cancer Study Group experience, *Ann Oncol*,15(6):875-84

Bersch, C (2002): Vergleich der duktaalen-präinvasiven Läsionen der Mamma und ihrer immunhistochemischen Eigenschaften anhand von vier histologischen Klassifikationen: Eine retrospektive Analyse 1996-1999. Halle, Univ., Med. Fak., Diss.

Blumenthal, Sybille G (2001): Die Regulation der Expression des humanen Interleukin-5-Gens, Tübingen, Univ., Chem. Fak., Diss.

Bianco NR, Montano MM (2002): regulation of prothymosin alpha by estrogen receptor alpha: molecular mechanisms and relevance in estrogen mediated breast cell growth, *Oncogene* 21, 5233-5244

Bredemeier-Ernst I, Nordheim A, Janknecht R (1997): transcriptional activity and constitutive nuclear localization of the ETS protein Elf-1, *FEBS Lett.* 12;408(1):47-51

Buerger H, Mommers EC, Littmann R, Simon R, Diallo R, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B, van Diest PJ, Boecker W (2001): ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *J Pathol* 194, 165-70

Buggy Y, Maguire TM, McGreal G, McDermott E, Hill ADK, O'Higgins N Duffy MJ (2004): overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer.* 4;91(7):1308-15

Carmichael AR (2006): Obesity and prognosis of breast cancer. *Obes Rev.*; 7(4):333-40.

- Cattoretti G., Suurmeijer A.J.H. (1995): Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffinembedded tissues using microwaves: a review. *Adv Anat Pathol* 2, 2-9.
- Chang CH, Scott GK, Kuo WL, Xiong X, Suzdaltseva Y, Park JW, Sayre P, Erny K, Collins C, Gray JW, Benz CC (1997): ESX: a structurally unique Ets overexpressed early during human breast tumorigenesis, *Oncogene*. 3;14(13):1617-22
- Chen WY, Colditz GA, Rosner B, Hankinson SE, Hunter DJ, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC, Speizer FE (2002): use of postmenopausal hormones, alcohol, and risk for invasive breast cancer. *Ann Intern Med*. 19;137(10):798-804
- Cho HJ, Baek KE, Yoo J (2010): RhoGDI2 as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 14(1):67-75
- Clark GM, Osborne CK, McGuire WL (1984): correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* 2, 1102-9
- Cleary MP and Grossmann ME: Minireview (2009): obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* 150, 2537-42
- Cotter MA II, Robertson ES (2000): modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of epstein-barr nuclearantigen 3 C with prothymosin alpha, *Mol Cell Biol* 20, 361-366
- Crowe JPJ, Gordon NH, Hubay CA, Shenk RR, Zollinger RM, Brumberg DJ, McGuire WL, Shuck JM (1991): estrogen receptor determination and long term survival of patients with carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 173, 273-8
- Davis PL, Miron A, Andersen LM, Iglehart JD, Marks JR (1999): isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter, *Oncogene* 18, 6000 - 6012
- Dawson AE, Austin REJ, Weinberg DS (1991): nuclear grading of breast carcinoma by image analysis. classification by multivariate and neural network analysis. *Am J Clin Pathol* 95, S29-37
- Dellas C, Loskutoff DJ (2005): historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost.*;93(4):631-40.
- Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) und andere: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau, AWMF 032/045 (S3) 08/2008
- Dittmer A, Dittmer J (2006): Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis*. 27(14):2844-5
- Dittmer J, Nordheim A (1998): Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta*. 17;1377(2):F1-11
- Dittmer, J (2003 ): the biology of the Ets I proto-oncogene. *Mol Cancer*, 2-29
- Dube A, Thai S, Gaspar J, Rudders S, Libermann TA, Iruela-Arispe L, Oettgen P (2001): Elf-1 is a transcriptional regulator of the tie2 gene during vascular development. *Circ Res*. 2;88(2):237-44

- Evstafieva AG, Belov GA, Kalkum M, Chichkova NV, Bogdanov AA, Agol VI, Vartapetian AB (2000): Prothymosin alpha fragmentation in apoptosis. *FEBS Lett.* 11;467(2-3):150-4
- Estafieva AG, Belov GA, Rubtsov YP, et al. (2003): apoptosis related fragmentation, translocation and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res* 284, 211-223
- Estafieva AG, Karapetian RN, Rubtsoc IP, et al. (2005): novel functions of the well known protein prothymosin-alpha is involved in protection of cells against apoptosis and oxidative stress, *Mol Biol, Mosk*, 39, 729-745
- Fox SB, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Hastrich D, Harris AL: the epidermal growth factor receptor as a prognostic marker (1994): results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res Treat* 29, 41-9
- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichten A, Schnitt SJ (2000): prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124, 966-78
- Graves BJ, Petersen JM (1998): Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res.*, 75:1-55.
- Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL, Altman DG (1991): c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer*, 63, 434-8
- Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Säve-Söderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, et al. (1992): prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 10, 1049-56
- Hapke S, Kessler H, Lubber B, et al. (2003): ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha (v)beta3/vitronectin interaction, *Biol Chem* 384, 1073-1084
- Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JGM, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA (2002): enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res* 62, 4617-22
- Harbeck N, Kates RE, Schmitt M (2002): clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol.*;20(4):1000-7
- Harbeck N, Schmitt M, Vetter M, Krol J, Paepke D, Uhlig M, Paepke S, Jänicke F, Geurts-Moespot A, von Minckewitz G, Sweep F, Thomssen C (2008): prospective biomarker trials Chemo N0 and NNBC-3 europe validate and clinical utility of invasion markers uPA and PAI-1 in node-negative breast cancer. *Breast Care*, 3 (suppl 2): 11-15
- Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK: *Diseases of the Breast*. 3. Aufl.; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2004)

Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M (1991): relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. the basis for a prognostic index. *Cancer* 68, 2142-9

Heyes GJ, Mill AJ, Charles MW (2009): Mammography – oncogenity at low doses. *J Radiol Prot*, A123-A132

Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM (1998): time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52, 227-37

Hollenhorst PC, Shah AA, Hopkins C, Graves BJ. (2007): Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev.*;21(15):1882-94

Huang X, Brown C, Ni W, Maynard E, Rigby AC, Oettgen P (2006): critical role for Ets transcription factor ELF-1 in the development of tumor angiogenesis, *Blood* 107, 3153-3160

Huseby RA, Ownby HE, Brooks S, Russo J (1990): evaluation of the predictive power of progesterone receptor levels in primary breast cancer: a comparison with other criteria in 559 cases with a mean follow-up of 74.8 months. *The Breast Cancer Prognostic Study Associates. Henry Ford Hosp Med J*, 38, 79-84

Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M (2001): randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1., *J Natl Cancer Inst.*, 20;93(12):913-20

Janknecht R, Cahill MA, Nordheim A (1995): signal integration at the c-fos promoter. *Carcinogenesis*. 16(3):443-50

Jiang X, Kim HE, Shu H, et al. (2003): distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in death regulatory pathway, *Science* 299, 223-226

Juang YT, Solomou EE, Rellahan B, Tsokos GC (2002): Phosphorylation and O-linked glycosylation of Elf-1 leads to its translocation to the nucleus and binding to the promoter of the TCR zeta-chain. *J Immunol.*, 15;168(6):2865-71

Juang YT, Tenbrock K, Nambiar MP, Gourley MF, Tsokos GC (2002): Defective production of functional 98-kDa form of Elf-1 is responsible for the decreased expression of TCR zeta-chain in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 15;169(10):6048-55

Kelsey JL, Gammon MD (1991): the epidemiology of breast cancer. *CA Cancer J Clin.*;41(3):146-65

Kobayashi T, Wang T, Maezawa M, et al. (2006): overexpression of the oncoprotein prothymosin alpha triggers a p53 response that involves p53 acetylation, *Cancer Res* 66, 3137-3144

Law J, Faulkner K, Young KC (2007): Risk factors for induction of breast cancer by x-rays and their implications for breast cancer. *Br J Radiol* 80, 261-6

Lim K, Chang HI (2009): O-GlcNAc inhibits interaction between Sp1 and Elf-1 transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 13;380(3):569-74. Epub 2009 Jan 25.

Lindemann RK, Braig M, Hauser CA, Nordheim A, Dittmer J (2003): Ets2 and protein kinase C $\epsilon$  are important regulators of parathyroid hormone-related protein expression in MCF-7 breast cancer cells, *Biochem J.* 372, 787-797

Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CGJF, Ulm K, Peyrat J, Martin P, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl P, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LVAM, Klijn JGM, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA (2002): pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 94, 116-28

Maehle BO, Tretli S, Skjaerven R, Thorsen T (2001): premorbid body weight and its relations to primary tumour diameter in breast cancer patients; its dependence on estrogen and progesterone receptor status. *Breast Cancer Res Treat.* ;68(2):159-69

Maehle BO, Tretli S, Thorsen T (2004): the associations of obesity, lymph node status and prognosis in breast cancer patients: dependence on estrogen and progesterone receptor status. *APMIS.*;112(6):349-57

Magdalena C, Dominguez F, Loidi L, et al. (2000): tumor prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer, *Br J Cancer* 82, 584-590

Martini PG, Delage-Mourroux R, Kraichely DM, Katzenellenbogen BS (2000): prothymosin alpha selectively enhances estrogen receptor transcriptional activity by interacting with a repressor of estrogen receptor activity. *Mol Cell Biol.* 20(17):6224-32

Martini PG, Katzenellenbogen BS (2003): modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85(2-5):117-22

Martini PG, Katzenellenbogen BS (2001): regulation of prothymosin alpha gene expression by estrogen in estrogen receptor containing breast cancer cells via upstream half-palindromic estrogen response element motifs, *Endocrinology* 142, 3493-3501

Malicet C, Giroux V, Vasseur S, Dagorn JC, Neira JL, Iovanna JL (2006): regulation of apoptosis by the p8/prothymosin  $\alpha$  complex, *Proc Natl Acad Sci* 103, 2671-2676

Minisini AM, Fabbro D, Di Loreto C, Pestrin M, Russo S, Cardellino GG, Andretta C, Damante G, Puglisi F (2007): markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 128(1):112-7.

Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyama K, Kamiya A, Ando J (2006): Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291(1):G26-34.

Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW, Burke KP, Willet WC, MacMahon B (1994): lactation and reduced risk of premenopausal breast cancer, *N Engl J Med.* 330, 81-87

- Oikawa, T (2004): ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci*; 95: 626–633
- Orre RS, Cotter MA II, Subramanian C, et al. (2001): prothymosin alpha functions as a cellular oncoprotein by inducin transformation of rodent fibroblasts in vitro, *J Biol Chem*, 276, 1794-1799
- Piacentini M, Evangelisti C, Mastroberardino PG, et al. (2003): does prothymosin alpha act as molecular switch between apoptosis and autophagy? *Cell Death Diff* 10, 937-939
- Pineiro A, Begona Bugia M, Pilar Arias M, et al. (2001): identification of receptors for prothymosin alpha on human lymphocytes, *Biol Chem* 382:1473-1482
- Pineiro A, Cordero OJ, Nogueira M (2000): fifteen years of prothymosin alpha; contradictory past and new horizons, *Peptides* 21,1433-1446
- Prat C, Perou CM (2009): Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med.*;15(8):842-4.
- Qiu L, Guo BY, Miao H, et al. (2002): effect of recombinant prothymosin alpha on secretion of IFN-gamma, IFN alpha and TNF alpha in vitro, *Yao Xue Xue Bao*, 37, 326-328
- Quong J, Eppenberger-Castori S, Moore D 3rd, Scott GK, Birrer MJ, Kueng W, Eppenberger U, Benz CC. (2002): age-dependent changes in breast cancer hormone receptors and oxidant stress markers. *Breast Cancer Res Treat.*; 76(3):221-36
- Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D, Million Women Study Collaboration (2007): Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the million women study: cohort study. *BMJ* 335 1134-45
- Reis-Filho, JS, Lakhani, SR (2003): the diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in preinvasive lesions. *Breast Cancer Res* 5, 313-9
- Remmele W, Stegner HE (1987): recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue, *Pathologie* 8, 138-140
- Robert-Koch-Institut Hrsg.: *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, Kapitel 1.2.6.3, Robert-Koch-Institut, Berlin, 2006
- Robert-Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt: *Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 25: Brustkrebs*; Robert-Koch-Institut, Berlin, 2005
- Rogozińska-Szczepka J, Utracka-Hutka B, Grzybowska E, Maka B, Nowicka E, Smok-Ragankiewicz A, Zientek H, Steffen J, Wojciechowska-Łacka A (2004): BRCA1 and BRCA2 mutations as prognostic factors in bilateral breast cancer patients. *Ann Oncol*. 15(9):1373-6
- Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S (1989): pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 7, 1239-51

- Roylance R, Gorman P, Harris W, Liebmann R, Barnes D, Hanby A, Sheer D (1999): comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* 59,1433-6
- Russo J, Moral R, Balogh G, Mailo D, Russo IH (2005): the protective role of pregnancy in breast cancer, *Breast Cancer Res.* 7, 131-142
- Sasaki H, Nonaka M, Fujii Y, et al. (2001): expression of the prothymosin-a-gene as a prognostic factor for lung cancer, *Surg Today* 31, 936-938
- Schmitt M, Thomssen C, Ulm K, Seiderer A, Harbeck N, Höfler H, Jänicke F, Graeff H (1997): time-varying prognostic impact of tumour biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer. *Br J Cancer* 76, 306-11
- Schmitt M, Mengele K, Gkazepis A, Napieralski R, Magdolen V, Reuning U, Harbeck N (2008): assessment of Urokinase-type Plasminogen Activator and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissue: historical aspects and future prospects. *Breast Care*; 3(suppl 2), 3-10
- Schunke D, Span P, Ronneburg H, et al. (2007): Cyclooxygenase-2 is a target gene of rho GDP dissociation inhibitor beta in breast cancer cells. *Cancer Res*;67(22):10694-702
- Scott GK, Daniel JC, Xiong X, Maki RA, Kabat D, Benz CC (1994): binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the Her2/neu promoter in human breast cancer cells, *J Biol Chem* 269, 19848-19858
- Scott GK, Chang CH, Erny KM, Xu F, Fredericks WJ, Rauscher FJ III, Thor AD, Benz CC (2000): Ets regulation of the erbB2 promoter, *Oncogene* 19, 6290-6502
- Sementchenko VI, Watson DK. (2000): Ets target genes: past, present and future. *Oncogene*.18;19(55):6533-48.
- Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR (1997): the ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol.*;29(12):1371-87
- Sharrocks AD (2001): the ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(11):827-37
- Sharrocks AD (2002): modern approaches in studying gene expression. *methods.* 26(3):215-6
- Sharrocks AD (2002): complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily. The Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans.* 30(2):1-9
- Shiwa M, Nishimura Y, Wakatabe R, et al (2003): rapid discovery and identification of a tissue- specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform, *Cancer Lett* 192, 205-214
- Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, Pandya KJ, Page, DL, Robert NJ (2000): prognostic value of histologic grade and proliferative

activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol* 18, 2059-69

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987): human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science* 235, 177-182

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001): use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-92

Span PN, Manders P, Heuvel JJ, Thomas CMG, Bosch RR, Beex L, Sweep CGJ (2002): expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer, *Oncogene*, 21, 8506-8509

Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tüchler H (1993): immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg* 218, 13-21

Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Auerbach L, Spona J, Tüchler H (1995): a prospective analysis of immunohistochemically determined hormone receptors and nuclear features as predictors of early recurrence in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 36, 11-21

Subramanian C, Hasan S, Rowe M, et al. (2002): Epstein-Barr nuclear antigen 3 C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation, *J Virol* 76 , 4699-4708

Subramanian C, Knight JS, Robertson ES (2002): the Epstein-barr nuclear antigen EBNA3C regulates transcription, cell transformation and cell migration, *Front Biosci* 7, 704-716

Suzuki S, Takahashi S, Takahashi S, Takeshita K, Hikosaka A, Wakita T, Nishiyama N, Fujita T, Okamura T, Shirai T (2006): expression of prothymosin alpha is correlated with development and progression in human prostate cancers, *Prostate* 66, 463-469

Takahashi K, Hayashi N, Shimokawa T, Umehara N, Kaminogawa S, Ra C (2008): cooperative regulation of Fc receptor gamma-chain gene expression by multiple transcription factors, including Sp1, GABP, and Elf-1. *J Biol Chem.* 30;283(22):15134-41. Epub 2008 Mar 31

Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Shang S, Nasu K, Miyakawa I (2003): clinical relevance of Elf-1 overexpression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.*; 89(3):408-13

Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I (2003): the significance of Elf-1 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Mol Med.*;12(3):349-54

Tapper J, Kettunen E, El-Rifai W, Seppälä M, Andersson LC, Knuutila S (2001): Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 128, 1–6

Thomas L: Labor und Diagnose, 6.Aufl., TH-Books, Frankfurt, 2005

Thomssen C (2002): Mammakarzinom: Inzidenz und Mortalität in den letzten 25 Jahren: Was haben wir erreicht? Gynäkologe 35, 680–688

Thomssen C (2005): Mammakarzinom – Standards in der Versorgung heute und morgen. Onkologie 11, 265–272

Thompson CB, Wang CY, Ho IC, Bohjanen PR, Petryniak B, June CH, Miesfeldt S, Zhang L, Nabel GJ, Karpinski B, et al. (1992): cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. Mol Cell Biol.;12(3):1043-53

Traub F, Jost M, Hess R, Schorn K, Menzel C, Budde P, Schulz-Knappe P, Lamping N, Pich A, Kreipe H, Rammen H (2006): peptidomic analysis of breast cancer reveals a putative surrogate marker of estrogen-receptor negative carcinomas, Lab Invest 86, 246-253

Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Baron J, Greenberg ER, Willet WC (1997): Body size and risk of breast cancer. Am J Epidemiol 145, 1011-19

Trichopoulos D, Brown J, MacMahon B (1987): urine estrogens and breast cancer risk factors among post-menopausal women. Int J Cancer. 15;40(6):721-5

Tzai TS, Tsai YS, Shiau AL, et al. (2006): urine prothymosin-alpha as novel tumor marker for detection and follow up of bladder cancer, Urology 67, 294-299

Veronesi A and Serraino D (2009): Is breast cancer overdiagnosed? Nature Reviews Clinical Oncology 6, 682-683

Wang M, Pan JY (2007): prothymosin alpha and tumor; current status and perspective, Ai Zheng 26, 333-336

Wang CY, Petryniak B, Thompson CB, Kaelin WG, Leiden JM (1993): Regulation of the Ets-related transcription factor Elf-1 by binding to the retinoblastoma protein. Science. 28;260(5112):1330-5

Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyrén O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Adami HO (2001): A prospective study of obesity and breast cancer risk (Sweden). Cancer causes and control 12,13-21

Wu CG, Habib NA, Mitry RR, et al. (1997): overexpression of hepatic prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma, Br J Cancer 76, 1199-1204

Wysowski DK, Comstock GW, Helsing KJ, Lau HL (1987): sex hormone levels in serum in relation to the development of breast cancer. Am J Epidemiol. 125(5):791-9

Yang BS, Hauser CA, Henkel G, Colman MS, Van Beveren C, Stacey KJ, Hume DA, Maki RA, Ostrowski MC (1996): Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. Mol Cell Biol.;16(2):538-47

Yang CH, Murti A, Baker SJ, et al. (2004): interferon induces the interaction of prothymosin alpha with STAT3 and results in the nuclear translocation of the complex, *Exp Cell Res* 298, 197-206

Zhang Y, Zhang B (2006): D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res.* 1;66(11):5592-8

Zhao R, Gish K, Murphy M, et al. (2000): analysis of p53 – regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays, *Genes Dev* 14, 981-993

## **6. Thesen**

1. Der Ets-Transkriptionsfaktor Elf-1 kann im invasiven Mammakarzinom sowohl immunhistochemisch im Kern als auch durch Westernblotanalyse nachgewiesen werden, wobei die Stärke der Expression variiert.
2. Eine immunhistochemische Analyse von 125 Brustkrebsproben zeigt, dass bei negativem Nodalstatus und geringerem Grading die Elf-1 Expression höher ist.
3. Eine Westernblotanalyse von 90 Brustkrebsproben zeigt einen Zusammenhang zwischen Nodalstatus, Tumorgröße und Elf-1 Expression.
4. Kein Zusammenhang besteht zwischen der Elf-1 Proteinexpression und Hormonrezeptorstatus, Her2-Status, Fernmetastasierung und Alter der Patientinnen.
5. Die Expression von Elf-1 steht in signifikantem Zusammenhang mit der Expression der Prognosemarker uPA und PAI-1.
6. Die Expression von Elf-1 korreliert signifikant mit der Expression des tumorrelevanten Proteins ARHGDIB.
7. Elf-1 hat keinen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom.
8. Elf-1 hat keinen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben von spezifisch mit CMF- oder Tamoxifen-behandelten Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom.
9. Elf-1 scheint weder eine prognostische noch eine prädiktive Bedeutung beim Brustkrebs zu haben.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Alice Antoinette Gerloff, geb. Ulrich  
Geburtsdatum: 02.06.1981  
Geburtsort: Magdeburg  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

### Schulbildung

09/1987 – 08/1991 Grundsule „Erich Weinert“, Magdeburg  
09/1991 – 07/1999 Gymnasium „Otto – v. – Guericke“, Magdeburg (Abiturnote: 1,0)

### Hochschulbildung

10/1999 – 05/2006 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Martin–Luther–Universität Halle–Wittenberg (Note: 1,83)

### Praktisches Jahr

*Innere Medizin* Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
*Dermatologie* Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
*Chirurgie* Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, Diakoniekrankenhaus, Halle

### Beruflicher Werdegang:

07/2006 – 10/2010 Ärztin in Weiterbildung, Universitätsklinikum Halle, Department für Innere Medizin, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III (Prof. Dr. K. Werdan)  
davon: 24 Monate kardiologische, angiologische und pulmologische Station, 6 Monate internistische Wachstation und 8 Monate internistische Kurzliegerstation (Unterbrechung durch Mutterschutz/Elternzeit von 12/2008 bis 02/2010)

11/2010 – 10/2011 Ärztin in Weiterbildung, Abteilung Allgemeinmedizin, Johann Christian Reil gGmbH (Dres. Reeg und Thomas), Halle

seit 11/2011 Ärztin in Weiterbildung, Chirurgisches Operationszentrum Dres. Höhler und Degner, Halle

Weiterbildungsziel: FÄ für Allgemeinmedizin

### Studienbegleitende Tätigkeiten

04/2002 – 01/2003 Studentische Pflegekraft, Intensivstation der Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost, Halle

## Praktika

11/2004 – 02/2005

Praktikum der chirurgischen Sonographie, Universitätsklinik und Poliklinik für Kinderchirurgie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), 28.02.2012

Alice Antoinette Gerloff

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, Alice Antoinette Gerloff, die vorliegende Arbeit „Immunhistochemische und proteinbiochemische Untersuchungen zur Expression des Ets-Transkriptionsfaktors Elf-1 im invasiven Mammakarzinom“ selbständig angefertigt zu haben.

Von mir genutzte Hilfsmittel und Literatur sind vollständig angegeben.

Halle (Saale), 28.02.2012

Alice Antoinette Gerloff

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Alice Antoinette Gerloff, dass die vorliegende Arbeit „Immunhistochemische und proteinbiochemische Untersuchungen zur Expression des Ets-Transkriptionsfaktors Elf-1 im invasiven Mammakarzinom“ zur Erlangung des akademischen Doktorgrades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstmalig von mir eingereicht wird.

Es liegen keine weiteren Promotionsarbeiten von mir an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder an anderen Universitäten zur Begutachtung vor.

Halle (Saale), 28.02.2012

Alice Antoinette Gerloff

## **Publikationen**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

### **Publikationen in Fachjournalen:**

“Protein expression of the Ets transcription factor Elf-1 in breast cancer cells is negatively correlated with histological grading, but not with clinical outcome”

**Alice Gerloff**, Angela Dittmer, Ilka Oerlecke, Hans-Jürgen Holzhausen, Jürgen Dittmer,  
Oncol Rep. 2011 Nov;26(5) 1121-1125

## **Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Jürgen Dittmer für die Überlassung des Themas und für seine gute Betreuung. Besonders danke ich ihm und dem gesamten Team des Forschungslabors dafür, dass ich auch nach den längeren Pausen immer wieder herzlich empfangen und unterstützt worden bin.

Vielen Dank an Prof. Dr. Hans-Jürgen Holzhausen für die Beurteilung der immunhistochemischen Präparate und an Angela Dittmer für ihre tatkräftige Hilfe im Labor.

Ganz besonders danke ich meinem Mann, meinen Eltern und meinen Großeltern für ihre Unterstützung während meines Studiums und dafür, dass sie mich immer und immer wieder nach dem Fortschritt meiner Doktorarbeit gefragt haben.

Ich bedanke mich auch bei allen namentlich nicht erwähnten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.