

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



**Die Bedeutung der Ets-regulierten Proteine  
RhoGDI $\beta$  und PTHrP  
für die Biologie des invasiven Mammakarzinoms**

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

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

**von Dario Schunke  
geboren am 24.10.1981 in Bernburg**

**Betreuer: PD Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer**

**Gutachter:  
PD Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer  
Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Wesselborg (Universität Tübingen)**

**Datum der Verteidigung: 04.07.2008**

**urn:nbn:de:gbv:3-000014037**  
[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014037>]

Für Margit,

Edith und Fritz

## Referat und bibliographische Beschreibung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Funktion der Ets-regulierten Faktoren RhoGDI $\beta$  (Rho-GDP Dissociation Inhibitor  $\beta$ ), einem Inhibitor der Rho-GTPase-abhängigen Migration, und PTHrP im primären Mammakarzinom.

Die Expression von RhoGDI $\beta$  wird im primären Mammakarzinom durch Ets1 direkt beeinflusst, was per CHIP (Chromatin Immuno Precipitation) nachgewiesen wurde. Ets1 wiederum wird durch Protein-Kinase  $C\alpha$  reguliert. Dies konnte anhand der Untersuchung der mRNA-Expression von 52 Brustkrebsproben bestätigt werden. Außer RhoGDI $\beta$  wird im primären Mammakarzinom eine Vielzahl weiterer Faktoren in ihrer mRNA-Expression von Ets1 beeinflusst.

cDNA-Microarray-Studien an MDA-MB-231-Zellen, in denen per siRNA die Expression von RhoGDI $\beta$  unterdrückt wurde, zeigten, dass nur die Expression von Cox-2 (Cyclooxygenase-2) durch RhoGDI $\beta$  positiv beeinflusst wird. Dies erfolgt wahrscheinlich synergistisch mit Vav1, einem Rho-GTPase aktivierenden Faktor, via NFAT-1 (nuclear factor of activated T-cells-1). Im primären Mammakarzinom korreliert die mRNA-Expression von RhoGDI $\beta$  und von Vav1 miteinander und mit der von Cox-2. Bei Suppression von Vav1 mit Hilfe von siRNA verringert sich auch die Cox-2-Expression. Cox-2 ist ein etablierter Tumorpromotor des primären Mammakarzinoms.

Trotz dieser Befunde hat RhoGDI $\beta$  keinen Einfluss auf das krankheitsfreie oder das Gesamtüberleben. RhoGDI $\beta$  hat damit zwei entgegenstehende Eigenschaften, nämlich zum Einen eine migrationshemmende Wirkung als RhoGDI, zum Anderen eine die Tumorprogression fördernde Wirkung über die Stimulation der Cox-2-Expression. Damit trägt Ets1 indirekt auch über RhoGDI $\beta$  zum Tumorprogress bei, indem es die Expression von Cox-2 reguliert.

PTHrP (Parathormone-related peptide) ist nicht nur ein Faktor, der die ossäre Metastasierung des primären Mammakarzinoms wesentlich bestimmt, sondern hat auch Einfluss auf die Tumorzellen selbst. Die Zellzyklusregulatoren Cdc2 und Cdc25B werden über die Wirkung von PTHrP am Parathormonrezeptor über einen  $Ca^{2+}$ -abhängigen Signalweg negativ beeinflusst. Integrin  $\alpha 6$  wird von der Mittelregion von PTHrP reguliert und bewirkt im primären Mammakarzinom eine schlechte Prognose. Obwohl in Zellkultur von MDA-MB-231-Zellen weitere Faktoren ebenfalls durch PTHrP beeinflusst werden, reguliert PTHrP im primären Mammakarzinom nur die Expression von Integrin  $\alpha 6$ , Cdc2 und Cdc25B. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Überprüfung von in der Zellkultur gewonnenen Daten im Primärtumor.

# Inhaltsverzeichnis

Seite

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie und allgemeine Risikofaktoren.....	1
1.1.2	DCIS und LCIS als Vorläuferläsionen.....	2
1.1.3	Histologische Typen und biologische Einteilung des invasiven Mammakarzinoms....	3
1.1.4	Prognostische und prädiktive Faktoren.....	6
1.2	Carcinogenese.....	8
1.2.1	Genregulationsmechanismen.....	8
1.2.2	Transkriptionsfaktoren am Beispiel von Ets1 beim Mammakarzinom.....	8
1.3	Rho-GTPasen und Krebs.....	9
1.3.1	Rho-GTPasen.....	9
1.3.2	RhoGDIs.....	13
1.3.3	Rho-GEF am Beispiel von Vav1.....	14
1.4	PTHrP und PTH1R beim invasiven Mammakarzinom.....	15
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.1	Tumorproben.....	18
3.2	Q-RT-PCR-Primer.....	18
3.3	Methoden.....	19
3.3.1	siRNA-Transfektion und Zellkultur.....	19
3.3.2	RNA-Isolierung.....	20
3.3.3	cDNA-Synthese.....	21
3.3.4	Q-RT-PCR.....	21
3.3.5	Gel-Elektrophorese.....	22
3.3.6	cDNA-Microarray-Analyse.....	23
3.3.7	ChIP(Chromatin Immuno Precipitation)-Analyse.....	23
3.3.8	Statistische Auswertung.....	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
4.1	Genregulation durch Ets1.....	27
4.1.1	Zellkultur.....	27
4.1.2	Primäres Mammakarzinom.....	28
4.2	Regulation von RhoGDI $\beta$ .....	29
4.2.1	ChIP-Assay.....	29

4.2.2	Regulation von RhoGDI $\beta$ in der Zellkultur .....	30
4.2.3	Regulation von RhoGDI $\beta$ im invasiven Mammakarzinom .....	31
4.2.4	Assoziation von RhoGDI $\beta$ mit kliniko-pathologischen Parametern .....	34
4.3	Mit RhoGDI $\beta$ assoziierte Gene .....	35
4.3.1	Spezifität der verwendeten siRNA .....	35
4.3.2	Faktoren aus der Literatur .....	36
4.3.3	cDNA-Microarray .....	37
4.3.4	Verifikation mit Q-RT-PCR .....	37
4.3.5	Einfluss der Interaktion von RhoGDI $\beta$ mit Vav1 auf die Expression von Cox-2 .....	38
4.4	Kaplan-Meier-Kurven .....	40
4.4.1	Vergleich des Teilkollektivs mit dem Ursprungskollektiv .....	40
4.4.2	Ets1 und PKC $\alpha$ .....	40
4.4.3	RhoGDI $\beta$ .....	40
4.4.4	RhoGDI $\alpha$ .....	41
4.4.5	Endothelin-1 und Endothelin <sub>A</sub> -Rezeptor .....	42
4.4.6	uPA .....	43
4.4.7	PAI-1 .....	43
4.4.8	GTP Binding Protein 9 und GTPBP9 Isoform 1 .....	44
4.4.9	Integrin $\beta$ 1 .....	44
4.5	PTHrP und PTH1R .....	45
4.5.1	Spezifität von siPTHrP .....	45
4.5.2	Verifikation in der Zellkultur .....	45
4.5.3	PTHrP beeinflusst die Genexpression über verschiedene Signalwege .....	46
4.5.4	Einfluss von PTHrP auf die Genexpression in Brustkrebsproben .....	47
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
5.1	Bestimmung der Ets1-abhängigen Genregulation im primären Mammakarzinom ....	49
5.2	Relevanz der Expression von RhoGDI $\alpha$ beim primären Mammakarzinom .....	50
5.3	Bedeutung von RhoGDI $\beta$ .....	51
5.3.1	Bedeutung der Interaktion von RhoGDI $\beta$ mit Vav1 .....	56
5.3.2	TGF $\beta$ als Einflussfaktor der Expression von Cox-2 .....	58
5.4	Bedeutung von PTHrP .....	58
5.5	Schlussbetrachtung .....	61
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Thesen .....</b>	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AIB1	amplified in breast cancer 1
AKT	Protein Kinase B (PKB) (Retrovirus AKT)
ALH	atypische lobuläre Hyperplasie
AML1	acute myeloid leukemia 1 oncogene (=RUNX1)
AP-1	Activator Protein 1
ARHGDI A	Rho-GDP Dissociation Inhibitor $\alpha$ (RhoGDI1)
ARHGDI B	Rho-GDP Dissociation Inhibitor $\beta$ (RhoGDI2)
ARHGDI G	Rho-GDP Dissociation Inhibitor $\gamma$ (RhoGDI3)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 associated oncogene
Bcl-xL	BCL2-like 1
CaMKII	Calcium/Calmodulin dependent kinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD(44)	Cluster of Differentiation (44)
Cdc2	cell division control protein 2 (=CDK1, cyclin-dependent kinase 1)
Cdc25B	cell division cycle 25B
Cdc42	cell division cycle 42
CDK1	s. Cdc2
CDKI	CDK Inhibitoren
cDNA	copy DNA
CGH	comparative genomic hybridisation
ChIP	Chromatin Immuno Precipitation
CK	Cytokeratin
CKS2	CDC28 Proteinkinase 2
DNA	Desoxyribonucleic Acid
Col4A2	Kollagen IV $\alpha$ 2
Cox-2	Cyclooxygenase 2
CpG	Cytosin-Guanin (in CpG-Islands)
CRE	cAMP responsive element
CST4	Cystatin 4
CTNNB1	Catenin $\beta$ 1
CYP19	Aromatase-Gen
Cyr61	cysteine-rich, angiogenic Inducer, 61
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DH	Dbl-Homologie
DIAPH1	Diaphanous Homolog 1
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
EBS	Ets Binding Sequence
ECE	Endothelin-converting Enzyme
ECM	Extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Rezeptor
ELF1	E74-like Factor 1
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EP	Prostaglandin-Rezeptor
ER	Estrogen-Rezeptor
erbB2	human growth factor receptor 2 gene
ERK	elk-related tyrosine Kinase
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
Esx	E74-like Factor 1 (ETS-Domain, serine box, epithelial specific)
ET-1/2	Endothelin-1/2
ET <sub>A/B</sub> R	Endothelin-Rezeptor A/B
Ets1	E26 transformation specific sequence
FGF	Fibroblast Growth Factor
FN1	Fibronectin 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Glutamindiphosphat
GRCC8	Tome-1, trigger of mitotic entry 1
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	Glutamintriphosphat
GTPBP9	GTP-Binding Protein 9
Her2/neu	Genprodukt von erbB2
HGF	Hepatocellular Growth Factor
HME	human mammary epithelial cells
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
Hsp27	Heat Shock Protein 27
HSPA1A	Heat Shock 70kDa Protein 1A
IBC	inflammatorischen Mammakarzinom (inflammatory breast carcinoma)
IDC	invasiv duktales Carcinoma
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
IκB	Inhibitor of κB
IKK	Inhibitor of κB-kinase
IL	Interleukin
ILC	invasiv lobuläres Carcinoma
INSIG1	Insulin induced gene 1
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITGA6	Integrin α6
ITGB1	Integrin β1
JNK	Jun N-terminal kinase
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton

Ki-67	proliferation-related antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
KISS-1	KiSS-1 metastasis-suppressor (Metastin)
LCIS	lobäres Carcinoma in situ
LK	Lymphknoten
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein Kinase
MDR-1	multiple drug resistance 1
MEK	MAP-Kinase-Kinase oder Erk-Kinase
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MSBR	modifizierte Scarff-Bloom-Richardson Classification
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCHG	Nottingham Combined Histologic Grade
NF2	Neurofibromatosis 2
NFAT	nuclear factor of activated t-cells
NFκB	Nuclear Factor κB
NLS	nuclear localization sequence
NOS	duktales Karzinom, not otherwise specified
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
n.s.	nicht signifikant
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (non small cell lung carcinoma)
NST	duktales Karzinom, no special type
p53	Tumorsuppressor p53
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PAK	p21-activated Kinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEA3	ETS-domain Transcription Factor PEA3
PG	Prostaglandin-Rezeptor
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PI3KCA	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, p110 alpha
PIP	Phosphatidyl-Inositol-4-phosphat
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PIP5K	Phosphatidyl-Inositol-4-phosphat-5-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC(α)	Proteinkinase C(α)
PLAU	siehe uPA
PLCγ	Phospholipase Cγ
PML	promyelocytic leukemia (-Protein)
PR	Progesteron-Rezeptor
PTH1R	Parathormonrezeptor



PTHrP	Parathormon-related Peptide
PTPRN2	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2
Q-RT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Rac1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANK	receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B
RANKL	receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand
RhoA/B/C/G	ras homolog gene family, member A/B/C/G
RhoGAP	Rho GTPase Activating Factor
RhoGDI	Rho GDP Dissociation Inhibitor
RhoGEF	Rho-GTP Exchange Factor
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing Protein Kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute(-Zellkulturmedium)
rRNA	ribosomale RNA
RUNX1	runt-related Transcription Factor 1
siRNA	small interfering RNA
Sp100	SP100 nuclear antigen
TGF $\beta$ 1/2	Transforming Growth Factor $\beta$ 1/2
TGFR1	Transforming Growth Factor Rezeptor 1
TGFR2	Transforming Growth Factor Rezeptor 2
TIMP	Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases
TNF1	Tumor-Nekrose-Faktor 1
TPM1	Tropomyosin 1
TSSC3	tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment 3
uPA	urokinase-type Plasminogen activator
Vav1	Vav1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
Wee-1	wee-1 homolog (Schizosaccharomyces pombe)
WHO	Weltgesundheitsorganisation

# 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, ein tieferes Verständnis der Vorgänge zu gewinnen, die zur Tumorentstehung, Tumorprogression und Metastasierung des primären Mammakarzinoms beitragen. Dabei wird vor allem auf die Relevanz von RhoGDI $\beta$ , einem vormals als rein hämatopoetisch beschriebenen Faktor [348], eingegangen, der auch im Brustkrebs exprimiert wird. Zudem wird dessen Zusammenwirken mit Vav1 untersucht, einem weiteren hämatopoetischen Protein [202], welches aber auch im Pankreaskarzinom [106] vorkommt und dort zu einer schlechteren Prognose beiträgt. Diese Betrachtungen sind eingebettet in eine Analyse der durch Ets1 regulierten Gene, zu denen neben RhoGDI $\beta$  auch PTHrP zählt. Bisher wurden alle Daten zur Veränderung der Genexpression durch Ets1 ausschließlich an Zellkulturen gewonnen. Hier werden erstmals die wichtigsten der auf diese Weise regulierten Gene auf ihre Relevanz beim primären Mammakarzinom hin untersucht. Im zweiten Teil wird ein analoges Verfahren bei der Analyse von PTHrP und den dadurch regulierten Genen angewandt.

Nach einer Darstellung des Mammakarzinoms, seiner Entwicklung aus DCIS bzw. LCIS sowie von Erkenntnissen zu dessen biologischer Charakterisierung anhand von Genexpressionsarrays sei zur Hinführung zu diesen Themen ein Abriss der bisher verfügbaren Daten zu Ets1, RhoGDI $\beta$  und Vav1 sowie PTHrP gegeben.

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und allgemeine Risikofaktoren

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau sowohl in Deutschland als auch weltweit. Die jährliche Inzidenz liegt in Deutschland laut der Dachdokumentation Krebs des Robert-Koch-Instituts bei 47.500 Neuerkrankungen [326], die Mortalität lag 2004 laut der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes mit 17.592 Fällen an zweiter Stelle. Die WHO schätzt, dass im Jahr 2000 die jährliche weltweite Inzidenz bei einer Million Neuerkrankungen lag; es sollen jährlich 370.000 brustkrebsbedingte Todesfälle auftreten. Das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken liegt in Deutschland bei 9,2% [352] -13% [217]. In den letzten 20 Jahren zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Inzidenz in Deutschland und den restlichen EU-Ländern [325], wobei allerdings die Brustkrebssterblichkeit seit Mitte der 1990er Jahre rückgängig ist [176]. Die altersstandardisierte Inzidenz lag 2004 in Deutschland mit 93,8 pro 100.000 Frauen im europäischen Mittelfeld [11]. Mit zunehmendem Alter steigt auch das Brustkrebsrisiko. Die altersspezifische Erkrankungsrate erreicht in der Altersgruppe von 80-84 Jahre mit über 285 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen und Jahr ihr Maximum [11]. Die Hälfte aller Brustkrebsfälle tritt vor dem 63. Lebensjahr auf [176], der durchschnittliche Median für alle Krebsarten liegt jedoch bei 67 Jahren [326]. In der Altersgruppe von 45-49 Jahren hat das Mammakarzinom mit 45% den höchsten Anteil an allen Krebsneuerkrankungen [326].

Die 5-Jahres-Überlebensrate für Lymphknoten-negativen Brustkrebs beträgt 97%, während für das metastasierte Mammakarzinom nur 23% angegeben werden [6]. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate liegt heute bei 78% [326]. Die Überlebensrate ist verglichen mit Magen- und Bronchialkarzinom (31% bzw. 15% 5-Jahres-Überlebensrate) relativ günstig [326]. Der Anstieg der Überlebensrate ist auf eine frühere Diagnose und frühere sowie bessere Behandlung zurückzuführen, wobei die Überlebensraten der T3-T4-Tumoren keinen solchen Effekt zeigen [326].

Neben den genetischen Risikofaktoren werden eine Reihe weiterer lebensstilbezogener Faktoren diskutiert, die den beständigen Anstieg der Brustkrebsinzidenzen bedingen. Zu diesen gehören[326]: frühe Menarche, späte erste Schwangerschaft, kurze oder gar keine Stillzeit, späte Menopause, postmenopausale Hormonersatztherapie,

exzessiver Alkoholkonsum, Rauchen vor der ersten Schwangerschaft [17] sowie Übergewicht und postmenopausale Gewichtszunahme. Diese Aufzählung kann aufgrund der Bandbreite der angeschuldigten Faktoren nicht erschöpfend sein, da sich die einschlägige Forschung in ständigem Fluss befindet. Die großen Themen sind dabei lange Hormonexposition, fehlende Ausreifung des Brustdrüsengewebes sowie karzinogene Noxen [17].

### 1.1.2 DCIS und LCIS als Vorläuferläsionen

DCIS und LCIS sind präinvasive *Carcinoma in situ*, die per definitionem die Basalmembran nicht durchbrochen haben, aber aus malignen Tumorzellen bestehen. Im Folgenden seien die Merkmale von DCIS und LCIS vor allem auch in Hinblick auf die Tumorbiologie und die genetischen Alterationen zusammengefasst.

Das DCIS (duktales *carcinoma in situ*) macht heute mehr als 20% der diagnostizierten Brustkrebsfälle aus [101], wohingegen dieser Anteil in den 1970er Jahren nur 1% [101] - 5% [231] betrug. Grund dafür ist die gestiegene Mammografie- und damit Erkennungsrate. 50% der mammografisch erkannten Tumoren sind DCIS [231]. Der für DCIS typische mammografische Befund sind gruppiert liegende, polymorphe Mikrokalzifikationen [421].

Beim DCIS befinden sich die Tumorzellen ausschließlich im Ductuslumen und haben somit noch nicht die Fähigkeit erlangt, die Basalmembran zu durchbrechen. Nach der Architektur werden unterschieden: comedoartiges, cribriformes, papilläres, mikropapilläres, solides Wachstum sowie Morbus Paget der Mamille. Diese Einteilung hat jedoch – abgesehen von Morbus Paget keinen prädiktiven Charakter hinsichtlich der Rezidivrate oder der Entstehung des invasiven duktales Karzinoms (IDC).

Deshalb wurden neue Klassifizierungen v.a. nach Grading, Zellpolarisation und Auftreten von Nekrosen eingeführt. Hervorzuheben sind dabei die Holland Classification [173] und der Van Nuys Prognostic Index [363].

Nach der Holland Classification eingeteilte DCIS wiesen als Rezidivrate 32% bei high-grade DCIS, 10% bei intermediate DCIS und 0% bei low-grade DCIS auf [220].

Zahlreiche Untersuchungen molekularer Marker unterstützen diese Einteilungen. So korreliert das Auftreten von p53-Mutationen, welche in 25% der DCIS gefunden wird, signifikant mit dem Grading, dem Auftreten von Nekrosen sowie dem mitotischen Index [311; 337]. In 30% aller DCIS, v.a. aber in high grade DCIS, wird eine erhöhte Expression von erbB2 (human growth factor receptor 2) gefunden [224], dessen Auftreten invers mit dem Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus korreliert [66]. Hohe Ki67-Werte, ein Zellzyklus-Antigen, werden vor allem in schnell proliferierenden high grade DCIS gefunden [252]. Auch die Cox-2 Expression (Cyclooxygenase-2) ist signifikant assoziiert mit hohem Grading, erbB2-Positivität, sowie negativem Hormonrezeptorstatus [33]. CyclinD1 zeigt ebenfalls eine erhöhte Expression in DCIS und ist im invasiven Mammakarzinom sowohl bei ER-negativen [405] als auch bei ER-positiven [206] Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Diese Veränderungen tragen in ihrer Gesamtheit dazu bei, dass high grade DCIS binnen 5-10 Jahren zum invasiven duktales Karzinom voranschreiten, wohingegen bei low grade DCIS dies erst deutlich später, nach 15-20 Jahren [273], erfolgt.

Lange Zeit wurde die Annahme vertreten, dass die Entstehung von invasivem duktales Brustkrebs aus DCIS einer linearen Entwicklung, analog zu Vogelsteins Modell der Colonkarzinogenese [414], folgt:

low grade DCIS → high grade DCIS → low grade IDC → high grade IDC

Angeführt wurde dabei eine Untersuchung zu Hsp27 (heat shock protein), welches der Modulation der intrazellulären Homeostase dient und signifikant mit dem Tumorprogress korreliert [289]. Normales Brustepithel exprimiert nur in 7,4% der Fälle Hsp27, jedoch 25,1% der Epithelhyperplasien und 61,1% der untersuchten DCIS.

Ein wesentliches Argument dagegen sind Studien von Roylance et al. [335; 336] zur CGH (comparative genomic hybridisation). Dabei konnte gezeigt werden, dass 65% der Grade I DCIS den langen Arm von Chromosom 16 (16q) verloren haben. Dies war jedoch nur in 16% der Grade III DCIS der Fall. In Grade III DCIS sind hingegen Veränderungen in 13q,17q und 20q festzustellen.

Somit scheint es viel mehr eine parallele Entwicklung von low und high grade DCIS hin zu low und high grade IDC zu geben, was durch eine Konkordanz von 98% bezüglich des Grading und des genetischen Profils von DCIS und IDC aus der gleichen Brust bestätigt wird [144]. Gleichwohl können verschiedene Zellklone aus einem DCIS entstehen, die verschiedene Gradings aufweisen [384].

Das LCIS (lobuläres *carcinoma in situ*) wurde lange Zeit als obligate Präkanzerose für die Entstehung eines invasiven lobulären Karzinoms angesehen und entsprechend therapiert. In den letzten 20 Jahren jedoch wurde deutlich, dass LCIS im Gegensatz zu DCIS eher ein Risikofaktor als eine Präkursorläsion ist. In neueren Arbeiten wird hiervon jedoch wiederum abgewichen und LCIS nun als fakultative Präkanzerose gesehen. LCIS und die atypische lobuläre Hyperplasie (ALH) werden als lobuläre Neoplasien zusammengefasst.

Diagnostische Kriterien für LCIS sind: hohes Kern-Plasma-Verhältnis, intrazytoplasmatische Räume bzw. Magenta Bodies sowie erhaltene lobuläre Struktur. Oft wird auch ein pagetoides Wachstum entlang der Duktuli zwischen Epithel und Basalmembran, wobei diese nicht durchbrochen wird, beobachtet.

LCIS wird in 90% der Fälle zwischen dem 40. und 50 Lebensjahr diagnostiziert, d.h. durchschnittlich 10 Jahre früher als DCIS [365]. Es sind zum größten Teil Zufallsbefunde in Biopsien, die aus anderen Gründen vorgenommen werden [231]. LCIS sind in der Mammografie mit Ausnahme eines seltenen kalzifizierenden Subtyps kaum zu erkennen [121; 344]. In einem Anteil von 30% [332] bzw. 50-70% [231] der Fälle sind LCIS bilateral und in 50% der Fälle multifokal in der gleichen Brust [332].

Während ALH das Risiko für das Auftreten eines invasiven lobulären Karzinoms um das 4-5fache erhöht [298], wird dieser Wert bei LCIS auf das 8-10fach mehr als verdoppelt [299]. In 50% der Fälle, in denen ein invasives lobuläres Karzinom aus einem LCIS entstanden ist, geschah dies zwischen 15-30 Jahre nach LCIS-Diagnose [257]. Die ipsilaterale Brust scheint ein dreifach höheres Risiko der Karzinomentstehung zu haben als die kontralaterale [300].

Durch CGH konnte gezeigt werden, dass LCIS Deletionen in 16p, 16q, 17p und 22q aufweisen, invasive lobuläre Karzinome (ILC) ebenfalls in 1q, 16q und 17p [47; 283]. Damit ist eine direkte Entstehung von ILC aus LCIS nahe liegend.

E-Cadherin-Mutationen und Verluste (lokalisiert in 16q22.1) sind häufig in LCIS und invasiven lobulären Karzinomen [90], wohingegen duktale Karzinome sowie DCIS und normales Epithel dieses weitgehend normal exprimieren [40; 182; 255]. Dieser Umstand macht E-Cadherin zum idealen Marker für LCIS. E-Cadherin ist ein Tumor-Suppressor, der an der Zell-Zell-Adhäsion sowie der Zellzyklusregulation beteiligt ist [205].

### 1.1.3 Histologische Typen und biologische Einteilung des invasiven Mammakarzinoms

Mammakarzinome lassen sich in duktale und lobuläre Karzinome einteilen, wobei zu den dukталen Karzinomen außerdem noch das medulläre Karzinom, das tubuläre Karzinom, das papilläre Karzinom, das muzinöse (Gallert)-Karzinom sowie das inflammatorische Karzinom gezählt werden.

70-80% der Mammakarzinome sind duktale Karzinome of „no special type“ (NST) bzw. NOS (not otherwise specified) [32; 231]. Diese können aufgrund ihres histologischen Erscheinungsbildes keiner speziellen Untergruppe der dukталen Karzinome zugeordnet werden. Die Tumoren sind scharf abgegrenzt, von knorpeliger bis steinharter Konsistenz mit durchschnittlichen Durchmessern von 1-2cm, nur selten über 4-5cm. Palpatorisch sind diese Tumoren oft fixiert und teils fest mit der Brustwand, der Haut oder der Mamille verwachsen. Histologisch finden sich wechselnde Anteile von Zellsträngen und Zellnestern, die das Stroma infiltrieren. Häufig findet sich eine Invasion der Perineuralscheide bzw. eine Lymphangiomas carcinomatosa.

Das lobuläre Karzinom macht etwa 10-15% [32] der Mammakarzinome aus. Es ist mit bis zu 20% deutlich öfter bilateral sowie multizentrisch in der gleichen Brust anzutreffen als andere Typen. Zudem zeigt das lobuläre Karzinom ein diffus invadierendes Wachstum und metastasiert häufiger in Ovar, Uterus, Knochenmark und seröse Häute als andere Subtypen des Mammakarzinoms [231]. Es ist häufig diploid, ER/PR positiv, und weist aufgrund der durchweg höheren Differenzierung der Zellen eine bessere Prognose auf als invasiv duktale Karzinome NST [231]. Die Zellen liegen dabei aufgrund des dissoziierten Wachstums des Tumors einzeln in Gänsemarschmuster im Stroma oder im Schießscheibenmuster um normale Duktuli herum [32]. Fast alle lobulären Karzinome weisen Mutationen und Expressionsverluste des E-Cadherin-Gens auf [32].

Das medulläre Karzinom macht 1-5% [231] der Mammakarzinome aus, wobei überproportional häufig jüngere Patientinnen betroffen sind. Der Tumor ist von weicher, fleischiger Beschaffenheit mit Durchmessern von 2-3cm. Er wächst überwiegend verdrängend und ist gut abgrenzbar. Histologisch sind die synzytialen Tumorzellen mit großen pleomorphen Kernen und prominenten Nukleoli von lymphoplasmazytären Infiltraten umgeben, wobei der Grad der lymphozytären Infiltration mit einer besseren Prognose einhergeht [146; 378]. Medulläre Karzinome weisen eine bessere Überlebensrate als duktale Karzinome auf, obwohl sie viele nachteilige Prognosefaktoren wie Aneuploidie, ER/PR-Negativität und hohes Grading aufweisen. Dies könnte auf eine hohe Expression von Adhäsionsmolekülen und auf das synzytiale Wachstumsmuster zurückzuführen sein [231].

Der Anteil an tubulären Karzinomen hat sich mit Einführung der Mammographie von 2% auf 10% der unter 1cm großen Tumoren erhöht. Mammographisch imponieren sie als irreguläre Massen. Die betroffenen Frauen sind überdurchschnittlich jung mit einem Häufigkeitsmaximum in der zweiten Hälfte der 5. Dekade. Tubuläre Tumoren sind multifokal in 10-56% und bilateral in 9-38% der Fälle [231]. Histologisch zeigen sich gut ausgereifte, teils kalzifizierte Drüsenläuche, die allerdings keine myoepithelialen Zellen aufweisen und in direktem Kontakt zum Stroma stehen. 95% der tubulären Karzinome sind diploid und ER/PR-positiv [231], sowie per definitionem gut differenziert und bedingen eine exzellente Überlebensrate.

Invasiv papilläre Karzinome haben nur einen Anteil von 1% und zeichnen sich durch ihr papilläres Wachstum aus. Im klinischen Erscheinungsbild gleichen sie dukталen Karzinomen NST, haben jedoch eine bessere Prognose [231].

Das muzinöse Karzinom ist vor allem bei älteren Patientinnen anzutreffen und zeichnet sich durch langsames, jahrelanges Wachstum aus. Es repräsentiert 1-6% aller Mammakarzinome. Dieser gut umschriebene Tumor hat die Konsistenz von Gelatine mit vereinzelt Inseln neoplastischer Zellen, die teilweise Drüsenazini bilden. Neuroendokrine Differenzierungen sind in 14-50% der Fälle möglich. Die Überlebensrate ist besser als bei dukталen Karzinomen NST.

Das inflammatorische Karzinom ist die aggressivste Form des Mammakarzinoms, welche sich durch ein schnelles infiltratives Wachstum auszeichnet. Histologisch zeigt sich eine extensive lymphovaskuläre Infiltration des oberflächlichen dermalen Gefäßnetzes [69]. Das Gesamtüberleben ist gegenüber anderen Subtypen des Mammakarzinoms deutlich schlechter [58].

Diese klassische Einteilung nach histologischen Gesichtspunkten kann die teils deutlichen Unterschiede in der Aggressivität der verschiedenen Untertypen nicht erklären, wengleich die Kombination von histologischem Erscheinungsbild mit Erfahrungswerten dies vorspiegelt. Vielmehr zeigt sich, dass das Grading ein besserer Prädiktor für das Gesamtüberleben ist als jeder andere klinisch-pathologische Parameter [47; 315; 336] allein.

Diese Annahme konnte anhand des Vergleichs der häufigsten genetischen Alterationen von Grade I und Grade III Mammakarzinomen erhärtet werden [47; 315; 336]:

	Grade I duktal	Grade III duktal
Verluste	16q (u.a. E-Cadherin)	8p, 11q, 13q, 14q
Gewinne		5p, 8q, 17q

Ein Progress von Grade I zu Grade III erscheint aufgrund dieses häufigen physischen Verlusts von 16q eher unwahrscheinlich [47; 315; 336].

Interessanterweise lassen sich Grade I invasive lobuläre Karzinome aufgrund ihrer auf den Verlust von 16q beschränkten genetischen Veränderungen gut den Grade I invasiv duktalem Karzinomen zuordnen, was auf einen gemeinsamen Ursprung schließen lässt [246]. Einen Unterschied zwischen duktalem und lobulärem Karzinom bildet allerdings der oben beschriebene E-Cadherinverlust, der vorwiegend bei lobulären Karzinomen auftritt.

Eine Variante des lobulären Karzinoms, das pleomorphe lobuläre Karzinom zeigt genetische Eigenschaften von duktalem wie auch von lobulären Karzinomen, nämlich Verlust von E-Cadherin, Verlust von 16q sowie Her2/neu-Expression, die wiederum relativ spezifisch für duktales Karzinome ist [268]. Somit scheint die strenge Einteilung in duktales und lobuläre Karzinome zumindest fraglich, und lässt eher einen gemeinsamen Ursprung vermuten.

Studien zu Expressions-Arrays [302] haben eine Einteilung in vier Kategorien vorgeschlagen, nämlich Luminal (A/B/C), Normal-like, Basal und Her-2/neu. Trotz der Vielzahl der untersuchten Gene haben sich nur einige wenige als charakteristisch erwiesen. Luminale Tumoren zeigen neben einer hohen ER-Expression vor allem die Cytokeratine 8 und 18, Her2-Tumoren sind meist ER-negativ, Basal-like Tumoren sind ER- und Her2-negativ und zeigen ein basales Expressionsmuster von Cytokeratinen, nämlich CK5,6 und CK17 sowie Integrin  $\beta$ 4 und Laminin.

Die Analyse des vorherrschenden Gradings innerhalb dieser Gruppen zeigt allerdings wieder eine generelle Einteilung in low grade und high grade [366], was sich erwartungsgemäß auch im Gesamtüberleben widerspiegelt, nämlich dahingehend, dass Luminal A/B/C (meist ER+) und Normal like eine relativ gute Prognose entsprechend dem vorherrschenden low grade aufweisen, Basal und Her2/neu+ aufgrund ihres allgemein hohen Gradings dagegen eine schlechte [373]. Allerdings sind auch diese Gruppen genetisch und klinisch heterogen [216; 374], was zur Spezifizierung weiterer Subgruppen [373], darunter auch ein basoluminaler Typ [219], führte.

Normal like	Luminal A/B/C	Basal	Her2/neu+
Low Grade		High Grade	

Eine Metaanalyse [267] hat allerdings ergeben, dass viele auf Genexpressionsprofilen beruhende Studien zu Prognose und Prädiktion des Outcome, darunter eine Studie von van't Veer et al. [411] über ein 70-Gen-Set beim Brustkrebs, in ihrem Vorhersagewert kaum eine zufällige Einordnung in gutes und schlechtes Überleben übertreffen, oder wie es Ioannides [177] ausdrückte: „[...]in five of the seven largest studies on cancer prognosis, this technology performs no better than flipping a coin. The other two studies barely beat horoscopes.“

Es bleibt somit abzuwarten, ob es überhaupt möglich ist, allein durch Genexpressionsprofile eine eindeutige Klassifikation und Risikostratifizierung für Mammakarzinome zu erreichen. Viel mehr als Expressionsprofile scheint die Kombination von mehreren prognostischen Parametern wie Grading, Staging, Lymphknotenbefall etc. sowie einigen ausgewählten Genexpressionswerten für eine Prognose des Outcome sowie die Prädiktion des Therapieerfolgs am Erfolgversprechendsten – und Ökonomischsten – zu sein.

#### 1.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Bei der Betrachtung von prognostischen und prädiktiven Faktoren ist es zunächst sinnvoll, zwischen beiden zu unterscheiden. Prognostische Faktoren sind solche, die den Verlauf des Mammakarzinoms mit und ohne systemische Therapie beschreiben, wohingegen prädiktive Faktoren Hinweise auf die Effektivität von spezifischen Therapien geben können. Viele prädiktive Faktoren sind auch gute prognostische Faktoren, dies gilt jedoch nicht immer umgekehrt [160]. Neben den nachfolgend angesprochenen Faktoren gibt es noch eine Reihe weiterer, die hier nicht im Einzelnen diskutiert werden sollen, darunter der Mitotische Index, S-Phase-Fraktionsbestimmung per Durchflusszytometrie, Thymidin Labeling Index sowie Ki-67, die allesamt Marker der Tumorpheriferation darstellen und daher ebenfalls prognostischen Wert besitzen.

Der Lymphknotenstatus ist der aussagekräftigste prognostische Faktor beim Mammakarzinom. Die rezidivfreie 5-Jahres-Überlebensrate bei Lymphknoten-negativem Brustkrebs liegt bei ca. 80%, bei Lymphknoten-positivem dagegen bei nur noch 20% [156; 164]. Andererseits ergibt sich aus diesen Zahlen nur der „natürliche“ Verlauf bei nicht therapierten Patientinnen. Neuere Studien von Kimura et al. [212] und Kim et al. [210] weisen bis zu 10 Jahre nach der Tumoroperation weiterhin eine erhöhte Rezidivrate bei Lymphknoten-positiven gegenüber -negativen Patientinnen nach. Deshalb ist die Axilladissektion mit vorangehender Sentinel-Node-Biopsie ein wichtiges Instrument des Stagings des Mammakarzinoms [156].

Die Tumorgröße ist ein weiterer wichtiger prognostischer Faktor. Das Risiko eines Rezidivs steigt im Allgemeinen mit dem Durchmesser des Primärtumors. Mit Tumordurchmessern unter 1cm liegt das 20-Jahres-Rezidivrisiko bei 12% [333]. In einem Beobachtungszeitraum von 30 Jahren liegt dieses Risiko bei Größen unter 2cm bei 25%, steigt bei 2-2,9 cm auf 35%, bei 3-3,9 cm auf 45% und erreicht bis zu 50% bei Tumordurchmessern von 4-4,9 cm. Darüber nimmt das Rezidivrisiko wieder ab, was auf die spezifische Biologie von Tumoren dieser Größe zurückgeführt wird, die wahrscheinlich kaum die Fähigkeit zur Metastasierung erreichen können [156].

Das Grading beim Mammakarzinom korreliert gut mit dem klinischen Outcome [77; 163]. Die am weitesten verbreitete Gradingklassifikation ist die modifizierte Scarff-Bloom-Richardson Classification (MSBR), auch Nottingham Combined Histologic Grade (NCHG) genannt [111]. Die SBR beurteilt die Gewebedifferenzierung, den Pleomorphismus sowie die Anzahl der Mitosen, was anschließend in Grade 1, 2 oder 3 eingeordnet wird. Die MSBR berücksichtigt den Differenzierungsgrad nicht mehr und ordnet in fünf verschiedene Kategorien ein. Ein hohes Grading nach MSBR ist mit einer hohen Metastasierungsrate assoziiert, und ist somit ein unabhängiger prognostischer Faktor [364].

Bestimmte histologische Typen sind mit verschiedenen Prognosen verbunden. So hat das inflammatorische Mammakarzinom die schlechteste Prognose. Frühe Studien geben bei nur lokaler Therapie eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 5% an [185]. Andere Subtypen wie das tubuläre, das muzinöse oder das papilläre Mammakarzinom haben bei Tumordurchmessern unter 3cm ein Rezidivrisiko von nur 10% [82]. Zwischen diesen Extremen steht das medulläre Karzinom, das zwar eine bessere Prognose als das duktales Karzinom NST aufweist, jedoch eine höhere Rezidivrate bedingt als die tubulären, muzinösen oder papillären Karzinome [110]. Damit ist auch die Histologie ein wichtiger Prognosefaktor [156].

Die Steroidrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  (Estrogen-Rezeptor) sowie PR $\alpha$  und PR $\beta$  (Progesteron-Rezeptor) werden seit den 1970er Jahren bestimmt. Anfangs aus gefrorenem Gewebe, heute über immunhistochemische Untersuchung von Paraffin-eingebettetem Material, die mit den Aussagen der vormaligen Proteinbestimmung der Rezeptoren hoch korreliert ist [157]. Vor allem in Kurzzeitanalysen haben ER-positive Mammakarzinome ein um 5-10% geringeres 5-Jahres-Rezidivrisiko als ER-negative [70; 164]. Danach verschwindet dieser Vorteil mit voranschreitender Zeit

[164; 350]. Deshalb wird die ER-Expression mit einer geringeren Wachstumsrate, nicht jedoch einem geringeren metastatischen Potential in Verbindung gebracht [156].

Das Vorhandensein des PR signalisiert in erster Linie die Funktionsfähigkeit des Estrogen-Rezeptors. Die selbständige Prognosefähigkeit des PR wird kontrovers debattiert, da einige Studien dafür sprechen [65; 175], andere dagegen [379; 380]. Aus diesem Grund sollte sein Auftreten immer in Verbindung mit ER untersucht werden, was die prädiktive Aussagekraft des ER-Status erhöht, wie in einer Studie mit 15.000 Patientinnen bestätigt wurde [18].

Es gibt trotz all dieser Untersuchungen einen beträchtlichen Anteil von Patientinnen, die bei ER-positivem Tumor nicht von einer antihormonalen Therapie profitieren. So führt zum Beispiel eine erhöhte Cox-2-Expression zu einer gesteigerten Prostaglandinsynthese, wodurch das Tumorstroma zu vermehrter Östrogenproduktion angeregt wird, was dann zur Tamoxifen- und Aromataseinhibitorresistenz führt [43]. So sollte trotz der hohen prädiktiven Fähigkeiten der Steroidrezeptoren auch ein Crosstalk zwischen diesen und Cox-2 bzw. Prostaglandin sowie Wachstumsfaktorrezeptoren nicht außer Acht gelassen werden, auch wenn dies die klinische Praxis noch nicht erreicht hat. Weitere Faktoren, die eine Tamoxifen-Resistenz bewirken können sind PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase) [52] und Proteinkinase  $\text{Ca}$  [13].

Die Her(human epithelial growth factor receptor)-Familie der Transmembran-Tyrosinkinasen, Erb-B1/EGFR (Her-1), Erb-B2 (Her2/neu), Erb-B3 (Her-3) sowie Erb-B4 (Her-4) spielt eine große Rolle bei der Entwicklung bestimmter Mammakarzinome. Außer Her2/neu haben alle diese Rezeptoren spezifische Liganden, durch deren Bindung sie aktiviert werden können. Her2/neu kann nur durch aktivierte Her-1,3 oder 4 aktiviert werden, indem es durch diese in einen heterodimeren Komplex integriert wird, wobei es die Signalübertragung verstärken kann [156]. Trotz dieser Besonderheit spielt Her-2, aber auch Her-1, eine herausragende prognostische und zunehmend auch prädiktive Rolle. Der EGF-Rezeptor ist in 35-60% aller Mammakarzinome vorhanden. In einer Studie mit über 3.000 Patienten konnte ein signifikant schlechteres Überleben bei höherer EGFR-Expression nachgewiesen werden [115]. Durch die Entwicklung spezifischer Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren erlangt EGFR auch eine prädiktive Bedeutung [46; 265]. Her-2/neu wird in 10-34% der Mammakarzinome überexprimiert, was regulatorisch oder aber durch Genamplifikation vonstatten geht [213]. Der enge Zusammenhang von schlechter Prognose und Her-2/neu-Überexpression wurde durch Studien an LK-positivem [142] und LK-negativem [8] Brustkrebs nachgewiesen. Eine Her-2/neu-Überexpression ist ein Indikator für eine relative Resistenz gegenüber CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil) basierten Chemotherapien [145] sowie erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Anthracyclinen [395]. Auch eine Tamoxifenresistenz bei ER- und Her-2/neu-positivem Brustkrebs wird diskutiert [78], vor allem bei zusätzlich hoher Expression von AIB1 (amplified in breast cancer 1, ein ER-Coaktivator)[294]. Hohen prädiktiven Wert hat Her-2/neu natürlich für das Ansprechen auf eine Trastuzumab-basierte Therapie [370].

Viele Studien haben einen engen Zusammenhang von hoher uPA- (urokinase-type Plasminogen-Aktivator) oder PAI-1(Plasminogen Aktivator Inhibitor 1)-Proteinkonzentration und kürzerem rezidivfreiem und Gesamtüberleben gezeigt, was durch eine Metastudie mit 8.377 Patientinnen bestätigt wurde [244]. uPA ist Mitglied der Serinprotease-Familie. Nach Aktivierung von pro-uPA durch Plasmin, ist uPA in der Lage, über die Aktivierung weiterer Proteasen, wie Matrix-Metalloproteinasen, verschiedene Komponenten der ECM (extrazelluläre Matrix) zu degradieren und damit zum ECM-Remodelling beizutragen, was für Tumorproliferation und Metastasierung herausragende Bedeutung hat. Vor allem Patientinnen mit hohen uPA/PAI-1-Werten profitieren von einer Chemotherapie, wie Harbeck et al. nachweisen konnten [153]. Damit ist das uPA/PAI-1-System prognostisch und beschränkt auch prädiktiv einsetzbar.



## 1.2 Carcinogenese

### 1.2.1 Genregulationsmechanismen

Neben der Supprimierung von Tumorsuppressorgenen oder deren Mutation existieren weitere Mechanismen, durch die eine Tumorzelle die exprimierten Gene kontrolliert. Diese umfassen als wesentliche Genregulationsmechanismen beim Mammakarzinom die Transkriptionsregulation mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren, die im Folgenden näher erläutert werden, sowie die epigenetische Kontrolle, also die Veränderung der Transkriptionsrate eines Gens durch Mechanismen, die nicht in der DNA-Sequenz kodiert sind. Durch epigenetische Modifikation kann es zu vermehrter oder auch verminderter Expression ausgewählter Gene kommen.

### 1.2.2 Transkriptionsfaktoren am Beispiel von Ets1 beim Mammakarzinom

Verantwortlich für die Genregulation sind Transkriptionsfaktoren, die über die Bindung an DNA-Elemente im proximalen Promotorbereich, die 100-200bp „upstream“ der Initiationsstelle liegen, und Enhancer, die bis zu 50kb „upstream“, „downstream“ oder in Introns des Gens liegen können, die Gentranskription beeinflussen. Man vermutet, dass im menschlichen Genom bis zu 2000 Transkriptionsfaktoren vorkommen. Einige der Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und in der Aufrechterhaltung eines invasiven Phänotyps. Ein Beispiel dafür ist Ets1.

Die Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren umfasst mittlerweile über 35 Mitglieder, deren gemeinsames Merkmal die ETS-Domäne ist [419], eine konservierte „helix-turn-helix“ [417] DNA-Bindungsdomäne aus 84 Aminosäuren, die an die Konsensussequenz GGAA/T (ETS-Binding sequence EBS) bindet [287]. Inzwischen sind aber auch Fälle bekannt, bei denen eine Bindung auch an andere Sequenzen möglich ist [356], da auch die Umgebung der EBS Einfluss hat. Der Name Ets leitet sich von Avian Erythroblastosis E26 transformation specific sequences ab [419]. Ets1 ist primär im Nukleus lokalisiert, aber in ruhenden Endothelzellen sowie in Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen auch im Cytoplasma [388; 389; 407]. Die Kernlokalisationssequenz wurde am C-terminalen Ende der ETS-Domäne lokalisiert [35]. Ets1 spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese, der Wundheilung sowie der Tumorprogression, wobei es nur während spezifischer Prozesse aktiv wird, so vor allem während der Bildung neuer Blutgefäße in physiologischem wie pathologischem Umfeld [228]. Ausschlaggebend für diese Funktion ist die Verteilung der EBS in Promotoren relevanter Gene. So findet man eine EBS in den Promotoren von anderen Transkriptionsfaktoren wie JunB, aber auch in Promotorregionen von Wachstumsfaktorrezeptoren wie VEGFR, sowie bei Proteasen (uPA, MMPs), deren Inhibitoren und Zelladhäsionsmolekülen (VE-Cadherin, Integrin  $\beta$ 2) [262]. Die Ets1-Expression kann durch Einwirkung von TNF1, FGF oder VEGF in endothelialen Zellen oder auch in Tumorzellen erhöht werden [60]. Ets1 wiederum kann die Transkription von uPA, MMP1, MMP3, MMP9 in vaskulären endothelialen Zellen, in Fibroblasten des Tumorstromas [76] sowie in Karzinomzellen erhöhen und induziert so häufig einen invasiven Phänotyp [290]. Ets1 scheint auch für die Entwicklung der Brustdrüse eine entscheidende Rolle zu spielen.

Ets1 wird in vielen verschiedenen Karzinomen, Sarkomen und Astrozytomen exprimiert [84]. Wobei es in Mamma-, Lungen-, Colon-, Pankreas- und Schilddrüsenkarzinomen entweder ausschließlich in „high grade“ Tumoren oder in diesen höher exprimiert wird [84]. Dabei ist eine hohe Ets1-Expression in Mamma-, Ovarial-, und Cervixkarzinomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert [76; 375]. Ets1 scheint dabei eine wichtige Funktion

als Regulator von Faktoren auszuüben, die für eine metastatische Progression relevant sind [20]. Überraschenderweise wird Ets1 vorrangig im Stroma, hier vor allem in peritumoralen Fibroblasten, Endothelien und Lymphozyten, exprimiert [124]. Es wird beim Mammakarzinom aber auch in Brustkrebszelllinien und Primärtumoren gefunden [20]. Östrogen kann in Mammakarzinomzellen die Ets1-Expression induzieren [236].

Ein wichtiger regulatorischer Transkriptionsfaktor ist Esx, ein epithelspezifischer ETS-Faktor, der in Mammakarzinomen überexprimiert wird und bereits in DCIS vermehrt anzutreffen ist [56]. Dieser ist in der Lage, auch Ets1 zu induzieren [235], zudem wird ein positiver Feedback loop zwischen Esx und Her2/neu vermutet [98]. Auch Ets1 aktiviert den Her2/neu-Promotor, sogar stärker als Esx [98].

Die Ets1-Expression korreliert signifikant mit der von VEGF und PAI-1 [375]. Die EGF-induzierte Expression von uPA sowie MMP9 benötigt zur Aktivierung der Promotoren das Zusammenspiel von Ets1 und AP-1 (activator protein-1), so dass Ets1 als ein wichtiges Bindeglied zwischen EGF und der darauf folgenden zellulären Antwort angesehen werden kann [390]. Ets1 erhält die Expression von MMPs durch einen vermuteten Feedbackmechanismus aufrecht [23]. Ein weiteres Ets1-responsives Gen ist PTHrP, welches durch TGF $\beta$  vermehrt exprimiert wird. TGF $\beta$  aktiviert dabei über einen Smad-Ets1-Synergismus die PTHrP-Expression [237].

Span et al. [375] haben die Expression von Ets1 in Brustkrebsproben untersucht, wobei zwar keine Korrelation von Ets1 mit kliniko-pathologischen Parametern festzustellen, jedoch ein signifikanter Zusammenhang von Ets1-Expression und kürzerem rezidivfreiem Intervall zu verzeichnen war. Es fand sich allerdings kein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben.

Wie die Aktivität von Ets1 in den Tumorzellen allerdings reguliert wird, ist weiterhin unklar. Ras erhöht die Aktivität von Ets1 über eine Aktivierung von ERK1/2 [434], welches Ets1 an einem Threonin der N-terminalen Domäne phosphoryliert [355]. Calcium/Calmodulin dependent kinase II ist in der Lage, Ca<sup>2+</sup>-abhängig die Ets1 DNA-Bindungsaktivität zu unterbinden, indem es die ExonVII-Domäne von Ets1 phosphoryliert. Auch PKC $\alpha$  kann die Aktivität von Ets1 regulieren [413]. PKC $\alpha$  wird als Vertreter der konventionellen PKC-Isoformen durch Calcium und 1,2-Diacylglycerol aktiviert, und kann nach Reaktion mit membrangebundenem Phosphatidylserin verschiedenste Substrate phosphorylieren, möglicherweise auch Ets1, wodurch es aktiviert werden kann. Auf diese Weise ist eine Ets1-Aktivierung von außen über Signaltransduktionskaskaden denkbar. Durch verschiedene Phosphorylierungsorte kann die Aktivität von Ets1 gleich einem Rheostat fein reguliert werden [310].

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen zahlreichen Einzelbefunden für Ets1 eine zentrale Stellung in der Regulation der Expression von Transkriptionsfaktoren, Proteasen, Zellzyklusregulatoren, Zytokinen, Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren [356] in Tumorzellen sowie ihrem Stroma. Zudem reguliert Ets1 das ECM-Remodelling [399] unter anderem über die uPA- und PAI-1-Expression.

## 1.3 Rho-GTPasen und Krebs

### 1.3.1 Rho-GTPasen

Um die Relevanz von RhoGDI $\beta$  und anderen RhoGDIs zu verstehen, ist es von Bedeutung, ihre Funktion im Kontext der Rho-GTPasen zu betrachten. Aus diesem Grund sei deren Bedeutung unter anderem für das Mammakarzinom der Darstellung der RhoGDIs vorangestellt.

Metastasen sind die Haupttodesursache bei Krebs [109]. Beim Brustkrebs erfolgt die Metastasierung v.a. in die Sentinel- und axillären Lymphknoten, die kontralaterale Brust, die Lunge, die Knochen, sowie in Gehirn und Rückenmark. Tatsächlich sind aber nur ca. 0,1% aller Tumorzellen in der Lage, Metastasen zu bilden [109]. Diese Fähigkeit hängt unter anderem von Rho-GTPasen ab. Diese sind mit allen wesentlichen Facetten der Migration und

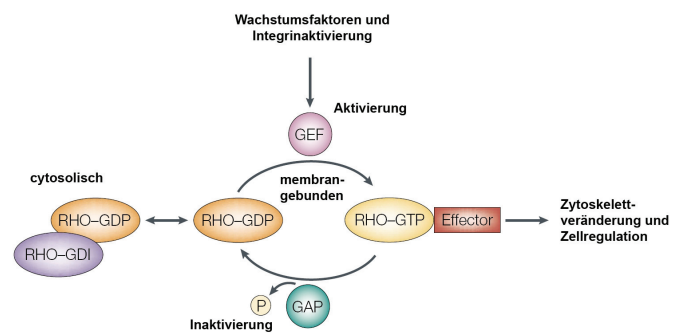
teilweise der Invasivität verbunden [338]. Im Einzelnen sind dies der Verlust der Zellpolarität und der Zell-Zell- sowie der Zell-Substratum-Adhäsion [102; 320], die Motilität, die Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix umzugestalten (sog. ECM Remodelling) sowie die Intra- und Extravasation in bzw. aus Lymph- und Blutgefäßen [338]. Des Weiteren haben sie einen Einfluss auf das Zellüberleben, das Wachstum wie auch auf die Zellproliferation, indem sie Einfluss nehmen auf Regulatoren des Zellzyklus [183; 338].

Rho-GTPasen sind monomere, hochkonservierte Proteine von 20-30 kDa [253], die 1985 aufgrund ihrer Homologie zu ras (Rho= ras homolog) im kalifornischen Seehasen (*Aplysia californica*) entdeckt wurden [253]. Inzwischen sind 21 Vertreter der Rho-Familie bekannt, u.a. Rac1, RhoA und Cdc42 [319]. Rho-GTPasen existieren in zwei Zuständen, die zyklisch durchlaufen werden. Inaktiv sind Rhos bei gebundenem GDP, aktiv bei Bindung von GTP [253; 319]. Dieser Zyklus wird von vier Arten von Interaktionspartnern reguliert. Rho-GEFs (GTP exchange factors) sorgen für einen Austausch des GDPs durch GTP und überführen somit Rhos in einen aktiven Zustand [349]. Rho-GAP (GTPase activating factor) beschleunigen die intrinsische GTPase-Aktivität der Rhos, beenden also dadurch den aktiven Zustand [272]. Rho-GDIs (GDP dissociation inhibitors) schließlich verhindern die Bindung von GTP im Austausch mit GDP [403]. Zudem bilden sie lösliche cytosolische Komplexe mit den sonst membrangebundenen Rho-GTPasen (**Abb.1.1**). Eine weitere Stufe der Regulation von Rho-GTPasen sind Rho-GDFs (GDI dissociation factors), die zur Auflösung der Rho/Rho-GDI-Komplexe beitragen [36; 63].

Rho-GTPasen sind nach ihren Hauptvertretern in die Untergruppen der RhoA-ähnlichen, Rac1-ähnlichen, Cdc42-ähnlichen Rhos sowie in solche ohne GTPase-Aktivität unterteilt [338].

Die Rho-GTPasen weisen zueinander viele strukturelle Ähnlichkeiten auf. Die C-terminale Domäne beinhaltet ein CAAX-Motiv, welches durch einen Prenylrest modifiziert ist. Dies ist für die Funktion der Rho-GTPasen von Bedeutung, weil dadurch eine Membranbindung ermöglicht wird. Ohne Prenylrest verbleiben Rho-GTPasen im Cytosol, ohne Effektoren aktivieren zu können [234]. Für die Interaktion mit Effektorproteinen sind die Switch I und II Regionen wichtig. Die verschiedenen Effektorspezifitäten der Rho-GTPasen lassen sich auf Strukturunterschiede in diesen Regionen zurückführen [30].

Rho-Effektorproteine sind in erster Linie Kinasen, wie die p21-activated kinases (PAKs) die durch aktive Cdc42 oder Rac1 aktiviert werden oder auch Rho-associated coiled-coil forming kinases (ROCKs), die v.a. durch RhoA aktiviert werden [338]. Trotz ihrer Ähnlichkeit zu ras – dieses ist in 30% aller Tumoren [329], aber nur in 5% der Mammarkarzinome [328] mutiert – wurden bisher keine konstitutiv aktiven Mutationen der Rho-GTPasen bei Tumoren gefunden [276; 323]. Damit scheint die zyklische Aktivität der Rho-GTPasen für ihre Funktionsfähigkeit unbedingt notwendig zu sein, wodurch den Regulatoren dieses Zyklus eine fundamentale Bedeutung zukommt [338].



**Abb. 1.1:** Schema der Interaktion von RhoGTPasen mit RhoGEFs, RhoGAPs und RhoGDIs (modifiziert nach [338])

### *Rho-GTPasen im Tumor*

Die Funktion der Rho-GTPasen wird bei Tumoren v.a. durch ihre Überexpression bestimmt [234]. So werden RhoA, Rac1 sowie Cdc42 in Mamma- [118], Bronchial- sowie Colonkarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe deutlich überexprimiert, wobei die Expression von RhoA beim Mammakarzinom darüber hinaus mit dem Tumorgrading korreliert [117]. Das Vorhandensein sowie die erhöhte Aktivität von Rho, ROCK, Rac1 und Cdc42 sind Voraussetzung für Migration und Metastasierung von Brustkrebszellen [37; 190]. Eine erhöhte RhoC-Expression und –Aktivität ist im Pankreaskarzinom [386] sowie beim inflammatorischen Mammakarzinom (IBC) festzustellen [408], hier ist es sogar kausal für den motilen, hochinvasiven Charakter verantwortlich, da allein eine RhoC-Überexpression HME-Zellen (human mammary epithelial) einen solchen Phänotyp verleihen kann [409]. Damit stellt RhoC einen prognostischen Marker für das Metastasierungsrisiko kleiner inflammatorischer Mammakarzinome dar [214]. Eine erhöhte Aktivität der Rho-GTPasen wird auch von Wachstumsfaktoren wie FGF, PDGF, HGF und TGF $\beta$  hervorgerufen [27; 450].

### *Verlust der Zellpolarität*

Erhöhte Level von RND3/RhoE inhibieren die Funktion von RhoA [137; 284], was zu einem Verlust der Zellpolarität führt [150]. Dies wird auch infolge eines Mangels an Rac1 und nachfolgender, nicht mehr asymmetrischer Lamininverteilung in der extrazellulären Matrix beobachtet [288].

Ein Verlust der Adherens Junctions wird in Nierenzellen bei Herabregulation von Rac1 beobachtet. Zudem geht dies mit einem motileren Phänotyp einher [450], wie er auch bei einem epithelial-mesenchymalen Übergang anzutreffen ist, der vorrangig in aggressiveren Tumoren vorliegt. Der Verlust der Adherens Junctions infolge der Einwirkung von TGF $\beta$  ist nur in Anwesenheit von Rho und ROCK zu beobachten [27]. In Keratinozyten erfolgt eine Verminderung der Adhärenz durch eine erhöhte Aktivität von Rac1 [39]. Die Funktion von Rac1 wird jedoch durch die extrazelluläre Matrix bestimmt, welche je nach Zusammensetzung zu einer Verminderung oder Erhöhung der Zahl der Zell-Zell-Adhäsionen beiträgt [343], was die gegenteiligen Befunde hinsichtlich Rac1 erklären kann.

### *Zellmotilität*

Die Regulation der Zellmotilität ist eine zentrale Funktion der Rho-GTPasen. Cdc42 ist dabei für die Bildung aktinreicher Spikes, sog. Filopodien verantwortlich, die die Richtung der Zellbewegung vorgeben. Rac1 bildet daraufhin Lamellipodien, die als führende Zellfront imponieren [321]. RhoA schließlich führt zu einer Kontraktion des Aktinskeletts im Zellkörper wie auch im Schwanzbereich [320]. Dabei ist ein steter Wechsel von Integrin-vermittelter Adhäsion und Migration entlang des Zellkörpers wichtig, um eine gerichtete Bewegung zu ermöglichen.

Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) erhöhen die Zellmotilität, indem sie das Aktin-Gerüst mit dem ECM-Transmembranrezeptor CD44 verbinden [338]. RhoA begünstigt via ROCK die Phosphorylierung und damit Aktivitätssteigerung von Ezrin [261], Rac1 inhibiert den Ezrin-Antagonisten NF2 (Neurofibromatosis 2) [360]. Dieser Einfluss von Rho-Proteinen scheint angesichts der Tatsache, dass Ezrin und CD44 in Tumoren häufig überexprimiert werden und NF2 Tumorsuppressoreigenschaften besitzt, überaus relevant für das Tumorstadium zu sein [3; 151].

### *ECM Remodelling*

RhoA und Rac1 sind außerdem in der Lage, über eine Regulation der Expression von MMP (Matrixmetalloproteinasen) und TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases) zum „Remodelling“ der ECM beizutragen [100; 209; 449].

### *Intravasation*

Fernmetastasen können nur über die Tumorzell dissemination über den Blut- oder Lymphweg entstehen. Für die Migration durch das Gefäßendothel wird die Aktivität von RhoA und ROCK benötigt [1]. Die Überexpression von RhoC führt zu einer vermehrten Bildung von angiogenen Faktoren in Brustepithelien [410], was die Wahrscheinlichkeit für eine Intravasation erhöht.

### *Zellzyklusregulation*

Rho-GTPasen sind auch an der Dysregulation des Zellzyklus beteiligt. Wesentliche Faktoren der Zellzyklusregulation sind dabei CDKs (cyclin dependent kinases). CDK4 und 6 sind Cyclin D1-abhängige CDKs, die für die Proliferation der Zelle zuständig sind. Viele Studien unterstreichen die Relevanz von Cyclin D1 – welches in Tumoren oftmals erhöht exprimiert wird [338] – für die Tumorgenese und Proliferation [327]. Diese Expression wird im Wesentlichen von Ets1, AP1 sowie NF- $\kappa$ B reguliert [4; 165].

AP-1 besteht als Heterodimer aus Vertretern der Fos-Familie, der Jun-Familie sowie den ATF-Transkriptionsfaktoren. Rac1 und Cdc42 können über eine Aktivierung von JNK (Jun N-terminal kinase) und p38 zu einer erhöhten Aktivität von Jun und ATF beitragen [165]. Zudem haben Rac1 und Cdc42 über PAK und Raf sowie MEK Einfluss auf ERK1/2 [119], was schließlich zu einer Aktivierung von Ets1 und AP-1 führt [4]. Dieser Pathway wird jedoch von Ras dominiert; der Einfluss von Rho-GTPasen hat dabei eher modulierenden Charakter.

Auch NF- $\kappa$ B hat einen wichtigen Einfluss auf die Cyclin D1-Expression. Rac1 kann zu einer Erhöhung der NF- $\kappa$ B-Aktivität beitragen [192; 194]. Dabei reguliert Rac1 die Aktivität von IKK (inhibitor of  $\kappa$ B-kinase), welches wiederum zur Degradation von I $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B) führt [51]. Dieser Einfluss auf NF- $\kappa$ B korreliert mit der Rac1-medierten NADPH-Oxidase abhängigen Superoxid-Produktion [192; 194]. Auch indirekte Wege der Kontrolle der Cyclin D1-Expression über Fibronectin-bedingte Erhöhung der Rac1-Aktivität via Integrin-Signalwege werden diskutiert [266].

RhoA bewirkt des Weiteren auf direkten [167] wie auch indirekten Wegen [391] – zum Teil unter Beteiligung von Cdc42 und Rac1 [61] – die Herabregulation der CDKI (CDK Inhibitoren) p21<sup>WAF1</sup> und p27<sup>KIP1</sup>.

Die Rho-Aktivität wird in normalen Zellen durch die Integrin-Aktivierung [316], die Konfluenz [340] sowie Adherens Junctions [286] kontrolliert. Dabei bewirkt eine Aktivierung von Integrin durch extrazelluläres Fibronectin eine Aktivitätssteigerung von RhoA und Rac1, welche dann durch Herabregulation von p21<sup>WAF1</sup> [266] respektive direkte Heraufregulation von Cyclin D1 [72] die Proliferation begünstigen. Überexpression von Rho-GTPasen in Tumorzellen kann dieses Signal auch ohne Fibronectin imitieren [338].

### *Apoptose und Überleben*

Divergierende Funktionen haben Rho-GTPasen bei der Apoptose. Während eine erhöhte Rac1-Expression v.a. über erhöhtes NF- $\kappa$ B [192] eine Apoptose verhindert [304], wird RhoB für eine durch DNA-Schäden bedingte Apoptose benötigt [240]. Rac ist allerdings auch für eine Fas-induzierte Apoptose wichtig [41; 382]. Rac2 wiederum verhindert über eine Aktivierung der für ein Überleben der Zelle wichtigen AKT-Kinase in Mastzellen die Apoptose [435].

Die Funktion der Rho-GTPasen ist jedoch im Einzelfall von der intrazellulären Lokalisation, der umgebenden ECM sowie den sie regulierenden Proteinen abhängig [338].

### 1.3.2 RhoGDIs

RhoGDIs sind Inhibitoren der Dissoziation von an Rho-GTPasen gebundenem GDP. Damit bleiben diese Rho-GTPasen inaktiv, da auch die Interaktion mit Rho-GEF verhindert wird [345; 444]. Gegenwärtig sind drei RhoGDIs bekannt. RhoGDI $\alpha$  (RhoGDI1, ARHGDI $\alpha$ ) wird ubiquitär [403] exprimiert und ist in der Lage mit den meisten Rho-GTPasen, nämlich RhoA [403], Cdc42 [313], Rac1, Rac2 [169], RhoC [104] sowie RhoG [443], zu interagieren. RhoGDI $\beta$  (RhoGDI2, ARHGDI $\beta$ ) soll exklusiv von hämatopoetischen Geweben [227; 348], insbesondere von B- und T-Lymphozyten [89], gebildet werden und vor allem RhoA [403], Cdc42 [230] sowie Rac1 und 2 [169] binden, jedoch mit niedrigerer Affinität als dies bei RhoGDI $\alpha$  der Fall ist [307]. RhoGDI $\gamma$  (RhoGDI3, ARHGDI $\gamma$ ) schließlich kommt vor allem in Lunge, Gehirn, Hoden, Pankreas und Niere vor [80; 89]. Es soll spezifisch für RhoB, RhoG, RhoA sowie Cdc42 sein, nicht jedoch Rac1 und Rac2 [2]. Während RhoGDI $\alpha$  und RhoGDI $\beta$  in 1:1-Komplexen mit Rho-GTPasen im Cytosol vorliegen [80], findet sich RhoGDI $\gamma$  vor allem membrangebunden am Golgi-Apparat [45]. Die etwas kryptischen Gensymbole ARHGDI(A/B/G) stehen für *Aplysia ras homolog GDP dissociation inhibitor* ( $\alpha/\beta/\gamma$ ) und leiten sich vom kalifornischen Seehasen ab, bei dem die Rho-GTPasen zuerst entdeckt wurden [225]. Trotz ihrer Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer Bindungspartner ist RhoGDI $\alpha$  bei Knock-out-Experimenten nicht durch RhoGDI $\beta$  und  $\gamma$  zu ersetzen, was zu spezifischen Defiziten führt [89]. Ein Knock-out von RhoGDI $\beta$  zeigt sich lediglich in einer geringgradig verminderten NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxidproduktion in neutrophilen Granulozyten [139].

Die Hauptfunktionen von RhoGDIs sind damit die Inhibition der GDP-Dissoziation von Rho-GTPasen. Diese bleiben damit inaktiv im Cytosol, eine Interaktion mit GEF wird verhindert. Des Weiteren können auch GTP-Rho gebunden und die Aktivität der intrinsischen GTPase sowie ein Angreifen von Rho-GAP unterdrückt werden. Zudem wird eine Interaktion mit Effektoren verhindert. Auch eine Shuttling-Funktion zwischen zellulären Regionen wird diskutiert [444].

Ihre Funktion als Inhibitoren der Rho-GTPasen verdanken die RhoGDIs vor allem ihrer Struktur. Die N-terminale Domäne bildet eine nach Rho-Bindung stabile Helixstruktur aus [347]. Sie macht den regulatorischen Teil der GDI aus, indem die GDP-Dissoziation direkt inhibiert wird [89]. Die C-terminale Region der GDI weist eine Immunglobulin-ähnliche  $\beta$ -Faltung auf, die eine hydrophobe Tasche für die Aufnahme des Prenylrests der Rho-GTPasen bildet [243]. Dieser Mechanismus wird durch die exemplarische biphasische Herauslösung von Cdc42 aus der Membran deutlich. Zuerst bindet die N-terminale Region des GDI die Switch-Region der Rho-GTPase, dann erfolgt die Bindung der Geranyl-geranylierten hydrophoben Gruppe der Rhos in der C-terminalen Tasche, was die Herauslösung aus der Membran bewirkt [172]. Die so entstehenden Rho/RhoGDI-Komplexe sind löslich [172] sowie biologisch inert [285], soweit sie nicht selbst eine katalytische Aktivität zeigen [55].

Der RhoGDI $\alpha$ -Gehalt der Neutrophilen ist ungefähr so hoch wie der Gehalt an RhoA, Rac1 und 2 sowie Cdc42 zusammengenommen. Es wird daher angenommen, dass die Rho-GTPasen vorrangig in 1:1-Komplexen mit den RhoGDIs vorliegen [402]. Es scheint somit kein Pool freier aktiver Rho-GTPasen zu existieren.

Die Aktivität der RhoGDIs wird durch Phosphorylierung sowie durch GDI Dissociation Factors (GDF) reguliert. RhoGDI $\alpha$  wird von PKC $\alpha$  phosphoryliert, was zu einer erhöhten Aktivität von RhoA führt [263]. Gleiches wurde für die Freisetzung von Rac1 im Zuge der Bildung von Lamellipodien beobachtet [89]. Die PAK1-abhängige Phosphorylierung von RhoGDI $\alpha$  in der Umgebung der Prenyl-Bindungsregion der C-terminalen Domäne führt zu einer spezifischen Freisetzung von Rac1, nicht jedoch von RhoA. Dies scheint, angesichts der Tatsache, dass PAK1 ein Effektor von Rac1 ist, ein positiver Feedback-Mechanismus zu sein [81]. Doch auch der Phosphorylierungsstatus der Rho-GTPasen hat Einfluss auf die Bindungsaffinität der RhoGDIs. So bewirkt die

PKA-abhängige Phosphorylierung von RhoA [223] oder Cdc42 [114] die vermehrte Bildung von Rho/RhoGDI-Komplexen. Die Moleküle der ERM-Gruppe (Ezrin, Radixin, Moesin) können auch durch vermehrte Freisetzung von Rho-GTPasen aus dem cytosolischen Pool die Motilität steigern. So kann Radixin als GDF fungieren und RhoA aus dem Komplex mit RhoGDI $\alpha$  herauslösen, um so die Bildung von Stress Fibres während der Zellmigration zu ermöglichen [387]. Ein CD43-Ezrin-Komplex verhindert in der Immunologischen Synapse von T-Lymphozyten die Interaktion von RhoGDI $\alpha$  und Cdc42 [5]. Unspezifischer wirken dagegen kleine Moleküle wie Membranlipide. Insbesondere Arachidonsäure und Phosphatidylinisitol-4,5-Diphosphat sind in der Lage, Rac1/RhoGDI $\alpha$ -Komplexe aufzulockern [63], so dass RhoGEF schließlich diese aufzulösen können [89]. Auch die genannte GDF-Funktion der ERM-Gruppe ist vom Vorhandensein von Phosphatidylinisitol-4,5-Diphosphat abhängig [440].

Die Expression von RhoGDIs in Tumorzellen ist stark vom untersuchten Tumortyp abhängig. Die RhoGDI $\alpha$ -Expression ist im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom erhöht [250], während in Grade III Astrozytomen RhoGDI $\alpha$  geringer gebildet wird als in niedrig malignen Astrozytomen [64]. Bei high Grade Ovarialkarzinomen ist eine im Vergleich mit Normalgewebe vierfach höhere RhoGDI $\alpha$ -Expression [191] festzustellen. Die Expression von RhoGDI $\alpha$  und  $\gamma$  ist im Brustkrebs deutlich niedriger als in tumorfreiem Normalgewebe [188]. Dies steht im Einklang mit der ebenfalls beobachteten erhöhten Expression von RhoG. RhoGDI $\beta$  zeigte in dieser Studie keine gegenüber dem Normalgewebe veränderte Expression.

Im ovariellen Adenokarzinom zeigen sich erhöhte Level von RhoGDI $\beta$ , was mit der Malignität des Tumors korreliert [392]. Niedrige RhoGDI $\beta$ -Level im Blasenkrebs sind mit erhöhter Metastasierungsrate verbunden [357; 393]. Die Expression von RhoGDI $\beta$  verringert sich Gildea et al. [123] zufolge mit höherem Stage und Grade auch bei den weiterhin untersuchten Prostata-, Mamma-, Colon- und Bronchialkarzinomen sowie hepatozellulären Karzinomen. Die Allgemeingültigkeit dieser Aussagen muss jedoch auch aufgrund der geringen Fallzahlen stark angezweifelt werden. Dies wird durch die Vielzahl der Studien unterstrichen, die mit Hilfe der differentiellen Genexpression zu dem Ergebnis kommen, dass RhoGDI $\beta$  mehrheitlich bei höherem Grading oder vermehrter Invasivität verstärkt exprimiert wird. So beim Magenkarzinom (1,5fach erhöht) [189], beim Nierenzellkarzinom (erhöht) [229], beim cisplatinresistenten Blasenkarzinom (3,3fach erhöht) [401], beim malignen Mesotheliom (9,9fach erhöht) [207] beim hochinvasiven malignen Melanom (14fach erhöht) [354] sowie beim paclitaxelresistenten Ovarialkarzinom [127].

Titus et al. [396] haben schließlich den Mechanismus aufgedeckt, durch welchen RhoGDI $\beta$  zumindest im Blasenkrebs als Tumor-Suppressor fungieren könnte. Bei erhöhter RhoGDI $\beta$ -Expression wird deutlich weniger Endothelin-1 produziert. Dieser angiogene Faktor sorgt nicht nur für die Bildung neuer Gefäße, sondern kann parakrin und autokrin auch via ET $_A$ R (Endothelin-Rezeptor A) die Aktivität von ERK1/2 und damit die Genregulation der Tumorzelle selbst beeinflussen [396].

### 1.3.3 Rho-GEFs am Beispiel von Vav1

Rho-GEFs (RhoGTP Exchange Factor) bestehen unter anderem aus einer Dbl-Homologie(DH)-Domäne, sowie einer Pleckstrin-Homologie(PH)-Domäne [171; 312]. Die DH-Domäne vermittelt die Spezifität der GEF [171] für bestimmte Rho-GTPasen, die PH-Domäne bindet Phosphoinositolphosphate und bedingt auf diese Weise ein Membrantargeting [371]. Bisher sind 69 Vertreter dieser funktionellen Proteine bekannt [334]. Die Hauptfunktion der GEF besteht im Austausch von GDP gegen GTP und damit die Aktivierung der Rho-GTPase, die dann weitere Effektoren aktivieren kann. Sie weisen eine autoregulatorische Einheit auf, die die zufällige Aktivierung der GEF verhindert [28]. Rho-GEF sind häufig in mutierter – konstitutiv aktiver – Form im Tumor vorzufinden, wodurch

eine erhöhte Motilität der Tumorzellen zum Teil erklärt werden kann [297]. Aktiviert werden Rho-GEF durch intrinsische und Wachstumsfaktorrezeptor-gekoppelte Tyrosinkinase [346]. Vertreter der Vav-Familie werden durch Stimulation dieser Rezeptoren, speziell des EGF-Rezeptors, aktiviert [49].

Die Vav-Familie besteht aus drei Mitgliedern, Vav1, Vav2 sowie Vav3. Alle diese sind in der Lage, RhoA, Rac1 und Cdc42 zu aktivieren [49; 215; 274]. Während Vav2 und Vav3 ubiquitär exprimiert werden, ist Vav1 ursprünglich ein hämatopoetischer Faktor, der vorwiegend in T-Zellen exprimiert wird [48]. Dort aktiviert er im Zuge der Zellreaktion auf Vorgänge an der immunologischen Synapse Rac [48], welches unter anderem NFAT (nuclear factor of activated t-cells) stimuliert [425]. Dabei kann Vav1 mit RhoGDI $\beta$  interagieren. Ohne Vav1 inhibiert RhoGDI $\beta$  die Rac-Aktivität, bei Vorhandensein von Vav1 wirkt RhoGDI $\beta$  jedoch synergistisch aktivierend auf Rac und weiter auf NFAT [135]. NFAT wird auch im Brustkrebs exprimiert [438], wo es vor allem für eine erhöhte Produktion der Cyclooxygenase 2 (Cox-2) sorgt.

Des Weiteren haben Fernandez-Zapico et al. [106] von einer erhöhten Expression von Vav1 im Pankreaskarzinom berichtet. Dabei korreliert ein hoher Vav1-Level mit einer schlechten Überlebensrate. Hier wird ein Zusammenhang mit der Aktivierung von Vav1 über den EGF-Rezeptor diskutiert, was schließlich zu einer Stimulation von NF- $\kappa$ B und nachfolgender erhöhter Produktion von Cyclin D1 führt.

Beim Vergleich der Genexpression zwischen medullärem und duktalem Brustkrebs sowie Normalgewebe wurde unter anderem festgestellt, dass Vav1 nur im medullären Mammakarzinom in 60% der untersuchten Tumoren vorkommt [125].

Insgesamt scheinen viele ursprünglich rein hämatopoetische Faktoren, wie Ets1, RhoGDI $\beta$  und Vav1, auch im Brustkrebs exprimiert zu werden. Die Relevanz für das Mammakarzinom ist aber trotz vieler Studien weiterhin unklar. Die Verwendung von Vav1 und RhoGDI $\beta$  als prognostische oder auch prädiktive Faktoren bedarf deshalb der weiteren Abklärung der spezifischen Funktion dieser Faktoren für die Biologie des Mammakarzinoms.

#### 1.4 PTHrP und PTH1R beim invasiven Mammakarzinom

PTHrP (parathyroid hormone related peptide) wurde als humoraler Faktor der malignitätsassoziierten Hypercalcämie entdeckt [129], die besonders bei Brustkrebs, aber auch beim Prostatakarzinom auftreten kann. Ausgelöst wird dies durch eine Homologie zum Parathormon, wodurch es am Parathormonrezeptor (PTH1R) aktivierend wirkt [197], jedoch bei carcinogener Expression keine Rückkopplung erfährt. Im Knochen und an der Niere führt dies zu einem Anstieg von cAMP [256], was zur Osteolyse und zur Calciumretention in der Niere führt. Physiologischerweise ist PTHrP an der Knochen- [199; 200] und Brustdrüsenentwicklung [428] im Rahmen der duktalem Morphogenese [97] beteiligt, und dabei unersetzlich, wie Knock-out-Experimente zeigten.

Das PTHrP wird von vielen verschiedenen Zelltypen während der Embryonalentwicklung und physiologisch beim Menschen gebildet. Zudem wird es von einer Vielzahl von Tumoren sezerniert, so auch beim Mammakarzinom. Mitverantwortlich dafür ist eine zum Teil Ets-abhängige Regulierung der Expression von PTHrP [86; 237].

PTHrP scheint einen positiven Einfluss auf das Tumorwachstum zu haben. Überexpression von PTHrP im Brustdrüsenewebe führte in Mäusen zu vermehrtem Tumorwachstum [427]. PTHrP-Antikörper unterdrückten das Wachstum von Brustkrebsmetastasen bei Mäusen [141]. Beim Menschen existieren widersprüchliche Aussagen. Henderson et al. [161; 162] konnten einen Zusammenhang von PTHrP-Expression mit längerem Überleben feststellen. Linford et al. [239] sowie Yoshida et al. [442] beobachteten in ihren untersuchten Kohorten eine Korrelation von PTHrP-Expression mit geringerem rezidivfreiem Überleben, ein Effekt, der bei ebenfalls hoher



Expression von PTH1R noch verstärkt wurde [239]. Auch erhöhte Serumkonzentrationen von PTHrP bei Krebspatienten waren mit einem schlechteren Überleben verbunden [168; 400].

PTHrP spielt bei der Metastasierung in den Knochen eine wichtige Rolle, indem es durch lokale Osteolyse eine Nische für osteotrope Tumoren wie Brustkrebs [126] oder Prostatakarzinom schafft. Es stimuliert Osteoklasten jedoch nicht direkt, sondern induziert in Osteoblasten die Sezernierung von RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B) [275] und IL-11 [394], welche schließlich die Osteoklasten aktivieren. Trotz dieser Rolle scheint es nicht direkt das metastatische Potential der Tumorzellen zu beeinflussen [427]. Die Knochenmetastasierung von MDA-MB-231-Zellen in Mäusen konnte durch PTHrP-Antikörper verhindert werden [141], ebenso bei kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen, die jedoch weiterhin andere Metastasierungsorte befallen konnten [269]. Beim Menschen konnte in einem großen Anteil der Knochenmetastasen (73-92%), aber nur in einem geringen Teil (17-20%) anderer Metastasen eine PTHrP-Expression festgestellt werden [412]. Mitverantwortlich dafür ist ein selbstverstärkender Mechanismus: TGF $\beta$  wird durch Osteolyse aus dem Knochen freigesetzt und stimuliert die Tumorzellen zur weiteren PTHrP-Produktion [437]. Zelllinien, die dagegen wenig PTHrP exprimieren, werden durch TGF $\beta$  in ihrem Wachstum gehemmt [439].

PTHrP kann zur Zellzyklusregulation beitragen. In Chondrozyten führt seine Wirkung auf PTH1R via cAMP [29] zur Abnahme der Expression von p57<sup>KIP2</sup> [251], einem Zellzyklusinhibitor, und zur Zunahme von Cyclin D1 [24]. Zudem nimmt die PTHrP-Expression bei Eintritt von Keratinozyten in die S-Phase des Zellzyklus zu [222]. Interessanterweise ist in Plattenepithelkarzinomen die PTHrP-Expression während des gesamten Zellzyklus hoch [222], was eine Dysregulation hervorrufen kann [85]. Dieser Mechanismus wird in Karzinomzellen wie auch MCF-7 [170] vorwiegend autokrin genutzt [85]. Andere Studien zeigten bei exogener Gabe von PTHrP einen antiproliferativen Effekt auf MCF-7 Brustkrebszelllinien [260]. Die Expression von PTHrP konnte nur auf intrakrinem, nuklearem Weg die Proliferation anregen [85; 398]. Diese Diskrepanz ist jedoch auf die verschiedenen MCF-7 Zelllinien zurückzuführen, bei denen die Aktivierung von PTH1R gegensätzliche Wirkungen entfaltet [85]. Beide Reaktionsweisen sind beim primären Mammakarzinom möglich, es überwiegt jedoch die proliferationssteigernde Wirkung von PTHrP [85].

PTHrP ist auf intrakrinem Wege auch in der Lage, die Invasivität von MCF-7-Brustkrebszellen positiv zu beeinflussen, indem es die Expression von Integrin  $\alpha$ 6 und  $\beta$ 4 fördert [361], was die Migrations- und Invasionsfähigkeit erhöht. Exogen zugeführtes PTHrP führt bei Chondrozyten zur Bildung von MMP2, MMP3, sowie MMP9 [203]. Intrakrin ist PTHrP in der Lage, in 8701-BC Brustkrebszellen die uPA-Expression zu erhöhen [249], reduziert aber in anderen Zelllinien die Degradation der extrazellulären Matrix [248]. PTHrP kann MCF-7 Zellen auf intrakrinem Weg vor Apoptose schützen, indem es zu einer Erhöhung der Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> beiträgt [398]. Dies alles zeigt in der Zusammenschau die vielfältigen Funktionen, die PTHrP im Brustkrebs wahrnehmen kann, andererseits aber, wie gegensätzlich die Wirkung auch bei nur geringen Unterschieden der verwendeten Zelllinien sein kann.

## 2 Fragestellung

Ets1 ist ein wichtiger Tumorpromotor im primären Mammakarzinom, der die Expression einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst, die ihrerseits zur Proliferation, Migration, Invasivität und Metastasierung beitragen.

So wird PTHrP zum Teil durch Ets1 reguliert. Ungeklärt war bis vor kurzem, welche Proteine durch PTHrP kontrolliert werden, um seine tumorzellbezogenen Effekte zu entfalten. Zudem wurden viele Ergebnisse mit Hilfe der Überexpression von PTHrP erzielt. Welche Funktion PTHrP auf einem physiologischen Niveau hat, war damit nicht zu eruieren. Auch die Relevanz dieser Ergebnisse für den tatsächlichen primären Brustkrebs lassen sich durch Zellkulturexperimente nur vermuten. Aus diesem Grund verfolgt die vorliegende Arbeit einen dualen Ansatz, um die Eigenschaften von PTHrP im Brustkrebs zu beleuchten:

Zum einen Zellkulturexperimente mit siRNA-Transfektion von MDA-MB-231-Zellen, die in Microarrays analysiert werden sowie deren Bestätigung in der Zellkultur. Zum anderen die Überprüfung der so erreichten Aussagen anhand der Expressionsuntersuchung an Tumorproben des primären Mammakarzinoms.

Ein ähnlicher Untersuchungsgang wird für die Analyse der anderen Ets1-abhängigen Gene angestrebt. Dabei wird vor allem auf die Relevanz von RhoGDI $\beta$  und Vav1 für die Biologie des Brustkrebses eingegangen. Auch dies erfolgt mit Hilfe von siRNA-Transfektion mit siEts1, siPKC $\alpha$ , aber auch siR $\beta$  und siVav1, um deren spezifische Relevanz für die Tumorbiologie festzustellen, gefolgt von Microarray-Analysen, sowie deren Bestätigung vor allem anhand der primären Tumorproben.

Da es sich bei der vorliegenden Arbeit nicht vorrangig um eine Kohortenstudie zu einzelnen prognostischen Faktoren handelt, ist eine geringere Anzahl an Tumorproben ausreichend. Von übergeordnetem Interesse sind dabei Korrelationen in der Vielzahl der untersuchten Faktoren, weniger deren Verbindungen zu kliniko-pathologischen Daten. Nichtsdestotrotz sind einzelne Aussagen zur Prognose möglich, wenn auch mit eingeschränkter Aussagekraft aufgrund der begrenzten Größe der Kohorte.

Ziel der Arbeit ist es, die für das Mammakarzinom relevanten Gene zu identifizieren, die durch Ets1, aber auch von den durch Ets1 regulierten Genen PTHrP und RhoGDI $\beta$  beeinflusst werden, und die neben der Zellkultur auch im primären Tumorproben exprimiert werden. Dieses Vorgehen ermöglicht eine realistische Abschätzung des Einflusses der untersuchten Gene auf den Primärtumor.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tumorproben

Es wurden 52 zufällig ausgewählte Tumorproben aus einem Kollektiv von 263 Brustkrebspatientinnen hinsichtlich der mRNA-Expression per Q-RT-PCR untersucht. Die Proben wurden uns von der Arbeitsgruppe von Paul N. Span, Abteilung für Chemische Endokrinologie der Universitätsklinik Nijmegen, Niederlande überlassen. Die zugesandten RNA-Proben (0,5µg auf 10µl H<sub>2</sub>O) wurden bis zur cDNA-Synthese bei -80°C gelagert. Das Ursprungskollektiv wurde im Rahmen der Veröffentlichung von Span et al. [375] einer Analyse ihrer Ets1-Expression unterzogen. Es handelt sich um Proben von Patientinnen mit unilateralem, operablem Brustkrebs, die zwischen November 1987 und Dezember 1997 operiert wurden, und deren Proben in der Tumorbank Nijmegen vorrätig waren. Die Patientinnen hatten vorher kein Karzinom, keine Metastasen und kein Rezidiv innerhalb eines Monats nach der Operation. Patientinnen, die neoadjuvant behandelt wurden oder die ausschließlich die Diagnose DCIS bzw. LCIS aufwiesen, wurden ausgeschlossen.

Die Gewebeproben wurden zur Routinebestimmung der Estrogen- und Progesteron-Rezeptor-Status unter flüssigem Stickstoff (-196°C) pulverisiert. Ein Aliquot wurde in flüssigem Stickstoff zur RNA-Extraktion aufbewahrt. Diese erfolgte mit dem RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus 20mg Gewebe nach Herstellerangaben mit DNase-Behandlung. Die Qualität der RNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese anhand der rRNA-Banden gesichert. Der Versand der RNA erfolgte in Trockeneis. Es schloss sich die cDNA-Synthese wie unten beschrieben an.

#### 3.2 Q-RT-PCR-Primer

Bis auf die Primer für Cdc25b, welche von Qiagen (QT00028350) gekauft wurden und für die keine Sequenz verfügbar ist, wurden sämtliche anderen Primer von MWG Biotech (Deutschland) nach Maßgabe der Arbeitsgruppe hergestellt. Dabei wurde vor allem Wert darauf gelegt, dass mit mindestens einem der beiden Primer Exongrenzen überspannt werden, um die Detektion nur der gesplitten mRNA zu ermöglichen. Im Falle des Auftretens von Primer-Dimeren wurde der betroffene Primer ersetzt. Die Primersequenzen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Eine Erklärung der Gensymbole erfolgt bei den entsprechenden Ergebnissen.

Gensymbol	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')	Produkt
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCTGGAGT	GAAGATGGTGATGGGATTTC	226bp
HPRT	GGACAGGACTGAACGTCTTGC	TGAGCACACAGAGGGCTACAA	76bp
ARHGDIA	AACCGAGAGATAGTGTCCGGC	TCTTGACGCCTTTCCTGTACG	60bp
ARHGDIB	AGCAACTAGAGGCCAGAAAATGG	CTGGAACCTGAGTCAAAGACCTG	60bp
ARHGDIG	GCGTGGACAAGACCGTCTACA	CCACCGGAGTCACAAACTCAT	74bp
BCL3	GAAGCACATGCACCTACCCA	GGACTGGTGCCTGAGAATGC	102bp
Cdc2	TGGAAACCAGGAAGCCTAGC	GAAATTCGTTTGGCTGGATCAT	100bp
COL4A2	TCCTTCCTCATGCACACGG	CATTGATGAATGGTGTGGC	103bp
Cst4	GAACAGCCAGAAGTGCAGAAGA	CATTCTGTCTCCAGGGAA	71bp
CTNBN1	AATCATGCAACCTTTGCGTGA	GACGTACGGCGCTGGGTAT	88bp
CYR-61	TGGACACTAATGCAGCCACG	CCAAAATGAAGCAGTAACATGTGC	74bp
DIAPH1	GCCTTATTGCCAGGAGGGA	ACAGACGCCCTGCATCAGAG	82bp
Elf-1	TTGCAATGGAACCGTCAGTGT	CAACCAGCTGTGAACTGCGA	91bp

**Tab. 3.1:** Primersequenzen für Q-RT-PCR

Gensymbol	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')	Produkt
ET-1	TCTGCCACCTGGACATCATTT	GGCTTCCAAGTCCATACGGA	66bp
ET <sub>A</sub> R	TGAACGGAACAAGCATCCAG	TCATGCTGTCCTTATGGCTGC	81bp
Ets1	CGTACGTCCCCACTCCTG	TTGATGATGGTGAGAGTCGGC	68bp
Ets2	TTTCTCATGACTCCGCCAACT	GGCTTGACTCATCACAGCCTT	71bp
ESX	AAACGGGAGATCCTGGAACG	CCGCTTGAGTTTTTGCCAAA	68bp
FLJ21424	ACCACAGCTTACCATTGGCCT	AAAGACAGTCATTGGTTCACAGGAA	50bp
FN1	TGCGAGAGTAAACCTGAAGCTG	ACCCACTCGGTAAGTGTTC	68bp
GTPBP9 <sup>both</sup>	AATTGAGTGCTGAGGAGAGACAGA	TATTCTAGTTGGAGTGCTGCAAACC	102bp
GTPBP9-iso1	ATTGCCAAATGTTGGGAAATCTA	TGAAGCCTGCATATTGGTTAACACA	57bp
HSPA1A	GAGAAGGACGAGTTTGAGCACAA	TGGTACAGTCCGCTGATGATG	74bp
IGF2	CCGTGCTTCCGGACAACCTT	TGGACTGCTTCCAGGTGTCATA	71bp
INSIG-1	GATCATTCTGAACTTTGGAATGACC	TGCTTTTCATCTAATAACTTCTGGTTTTTC	125bp
ITGA6	GGCACCTACACTCACCTGCA	CAGCTAACGTGATGGACGTCTG	78bp
ITGB1	GGAAAACAGCGCATATCTGGA	CATCGAAACCACCTTCTGGAG	52bp
KISS-1	TTTCTCTGTGCCACCCAC	AGGGATTCTAGCTGCTGGCC	90bp
MMP9	CCCGGACCAAGGATACAGTTT	GGAATGATCTAAGCCCAGCG	73bp
NQO1	TACCAGATGCTGACTGGCACTG	GCCGTCAGCTATTGTGGATATGT	60bp
PAI-1	GGCCATGGAACAAGGATGAGA	GACCAGCTTCAGATCCCGCT	68bp
PI3KCA	AGCCACACACTACATCAGTGGCT	ACAGGTCAATGGCTGCATCAT	69bp
PLAU	ATTCTGCCAGGGAGACTCAG	CCAGTCAAAGTCATGCGGC	66bp
PKC $\alpha$	ACAAGCAATGCGTCATCAATG	TAGGTAAATCCGCCCCCTCT	74bp
PTGS2 (COX-2)	GCACCTTGCTGGCAGGGTT	TCTGTACTGCGGGTGGAACAT	52bp
PTHrP (exon1C)	ACTAACGACCCGCCCTCG	GAACAAGTTTCAAGTGC GTGTGTC	67bp
PTHrP (exon2)	AGGAGGCGGTTAGCCCTGT	TCCCATAGCAATGTCTAATTAATCTGG	71bp
PTHrP (exon4)	ACCTCGGAGGTGTCCCCTAAC	TCAGACCCAAATCGGACGG	71bp
PTH1R	TGCTCTTCAACTCCTTCCAGG	AGCTTGTACCTCGCCATTGC	71bp
PTPRN2	TCAGCGTAGAAAACGCACCTC	TGGAGAGTACCATCTATCTAAGATGGAG	72bp
RUNX1	CAAGCTGGTGTCTTCAGCCA	CTGTGTACCGTGGACTGTGGAC	117bp
SP100	ACTGTGTAGACAAGGTACCAGGTCAG	AGGGATTGAGATTGGCTTTGTG	72bp
TGFB1	TTAGCGCCCACTGCTCCT	GAACCCGTTGATGTCCACTTG	61bp
TGFB2	TGGCTTACCATAAAGACAGGA	TACAAAAGTGCAGCAGGGACA	68bp
TGFBR1	CATTGCTGGACCAGTGTGCT	CAGTGC GGTTGTGGCAGAT	71bp
TGFBR2	AGAAGCTGAGTTCAACCTGGGA	TGATGGCACAGTGCTCGC	72bp
TPM-1	CTGGCAACAGCTTTGCAGAA	CAATGACTTTCATGCCTCTCTCA	76bp
TSSC3	TTTGCATCACTGTGCCATT	AGCCACAGCCGGATGGTA	68bp
Vav-1	CTGGATGCCATGAGGGACC	TGTCGCAGTGTCTCGTTGTCT	67bp

**Tab. 3.1:** Primersequenzen für Q-RT-PCR (Fortsetzung)

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 siRNA-Transfektion und Zellkultur

Die Zelllinien (MDA-MB-231, MCF-7 und SKBR3) wurden in RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland) ohne Zugabe von Antibiotika kultiviert. Small interfering RNA (siRNA) wurde von MWG Biotech (Deutschland) gekauft, die Sequenzen sind in Tab 3.2 aufgeführt. Die Transfektion durch Elektroporation wurde wie folgt durchgeführt. Die Zellen wurden trypsinisiert, einmal mit RPMI gewaschen und in RPMI-Medium in einer Dichte von ca. 8 Millionen Zellen pro ml resuspendiert. Für jede Transfektion wurden 250  $\mu$ l der Zellsuspension mit

20µl der siRNA (20µM in H<sub>2</sub>O) gemischt und mit Hilfe eines Biorad GenePulserX-Cell (Hercules, California, USA)(250V, 800mF) elektroporiert. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Zellen auf eine 100mm Petrischale überführt und mit 8 ml Medium gemischt. Die Zellen wurden für drei Tage kultiviert und anschließend zur RNA-Analyse wie unten beschrieben lysiert. Die Züchtung und Transfektion der Zellen wurden durch A. und J. Dittmer durchgeführt.

siRNA	sense strand (5'→3')	anti-sense strand (5'→3')
siluc	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT
siE1#1	AACCCAGCCUAUCCAGAAUCCdTdT	GGAUUCUGGAUAGGCUGGGUdTdT
siE1#2	AUGAUGUCUCAAGCAUUAAdTdT	UAAAUGCUUGAGACAUCAUdTdT
siPa	AAGGAUGUGGUGAUUCAGGAUdTdT	AUCCUGAAUCACCACAUCUdTdT
siRβ	GGAAGGUUCUGAAUAUAGAdTdT	UCUAUAUUCAGAACCUUCCdTdT
siRβ1	GAUGAUGAGAGUCUAAUUAdTdT	UAAUUAGACUCUCAUCAUCdTdT
siVav1#1	CACUGCGACAGAUCACCAAdTdT	UUGGUGAUCUGUCGCAGUGdTdT
siVav1#2	GAAGUGGAGCCACAUGUUCdTdT	GAACAUGUGGCUCCACUUCdTdT
siElf	CACAAUUUAUCUUUGGGAGdTdT	CUCCCAAAGAUAAATUGUGdTdT
siPTHrP	CUCUUUGUACGUCUCCACcdTdT	GGUGGAGACGUACAAAGAGdTdT
siPrec	GUCCAGAUGCACUAUGAGAdTdT	UCUCAUAGUGCAUCUGGACdTdT

**Tab. 3.2:** siRNA-Sequenzen

### 3.3.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus der Zellkultur von MDA-MB-231-Zellen wurde mit dem Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend den Herstellerempfehlungen durchgeführt.

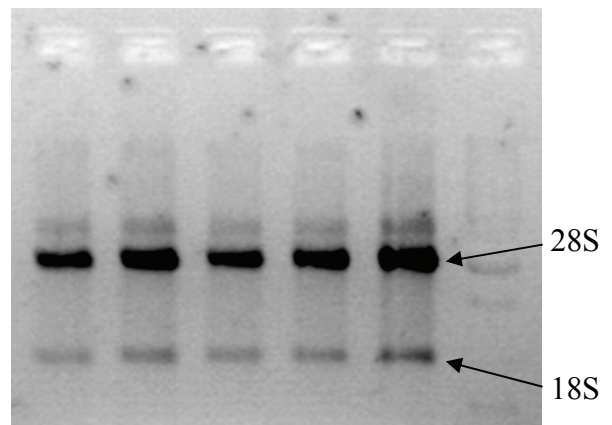
Die Prozeduren seien im Folgenden kurz aufgeführt:

1. Zweimaliges Waschen der adhärenen Zellkultur mit 1x PBS (10x PBS: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,9g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,2g; NaCl 90g; Aqua dest. ad 1000 ml)

Alternativ bei 3D-Kultur:

Abzentrifugieren der Zellen bei 1500 min<sup>-1</sup> und Absaugen des Mediums, anschließend einmaliges Waschen mit 1x PBS durch Resuspension der Zellen, dann nochmaliges Abzentrifugieren

2. Lysieren der Zellen in der Kulturschale mit 350 µl RA1 Buffer+3,5µl Mercaptoethanol
3. Filtration durch NucleoSpin Filtereinsätze (1 min zentrifugieren bei 11.000g)
4. Zugabe von 350µl 70% Ethanol (RNase-frei), anschließend vortexen
5. RNA-Bindung an Silica-Membran der NucleoSpin RNA II Säulen (30s zentrifugieren bei 11.000g)
6. Entsalzen der Silica-Membran durch Zugabe von 350µl Membran Desalting Buffer (MDB)
7. DNase-Verdau auf der Membran durch Qiagen RNase-free DNase (Qiagen, Hilden, Deutschland) (1 Ampulle lyophilisierte DNase entsprechend den Herstellerangaben aufgenommen in 550µl RNase freies Wasser (DEPC(Diethylen-Pyrocabonat)-behandelt)), davon pro Präparation 10µl auf 90µl RNase freies Wasser; 15 min Inkubation bei Raumtemperatur)
8. Inaktivieren der DNase durch Zugabe von 200µl RA2-Buffer und abzentrifugieren (30s bei 11.000g)
9. Zweimaliges Waschen der Membran mit RA3 Buffer (600µl bzw. 250µl), dazwischen und danach abzentrifugieren (2 min bei 11.000g)
10. Eluieren der RNA mit 50-60 µl RNase freiem Wasser (2 min bei 11.000g)



**Abb.3.1:** Repräsentatives Bild einer RNA-Gelelektrophorese mit Darstellung der rRNA. Keine Degradation erkennbar.

Anschließend erfolgte die sporadische Kontrolle der RNA-Qualität durch RNA-Gelelektrophorese in TBE-Agarose (TBE-Puffer: 10,78 g (89 mM) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; 5,50 g (89 mM) Borsäure; 0,58 g (2 mM) EDTA; Aqua dest. ad 1000ml). Wichtiges Kriterium ist dabei die scharfe getrennte Abbildung der 28S- und 18S-Banden der rRNA, die bis zu 95% der RNA ausmacht. mRNA ist in RNA-Gelelektrophoresen nur als Schmier zwischen den rRNA-Banden zu erkennen. Eine Kontamination mit RNasen wäre bei einer unscharfen Abbildung der rRNA-Banden zu vermuten. In solchen Fällen wäre eine Degradation auch der mRNA, die nur einen geringen Teil der Gesamt-RNA ausmacht, anzunehmen.

### 3.3.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus der RNA der Zellkultur wie auch aus den Tumorproben wurde folgendermaßen durchgeführt: 1µg Gesamt-RNA (nach spektrometrischer Konzentrationsbestimmung bei 260nm) wurde mit 1µl 10mM dNTPs (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), 1µl RNasin (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 1µl Random Hexamere (Amersham Biosciences, später GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, USA) gemischt und ggf. mit RNase freiem Wasser auf 13µl aufgefüllt, bei 65°C für 5 min inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.

4µl 5x FirstStrand Buffer und 2µl 0.1M DTT wurden hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Anlagerung der Primer (Annealing) während der Inkubation bei 25°C für 2 min. Nach Zugabe von 1µl Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte die Synthese der cDNA bei sequentieller Inkubation bei 25°C für 10 min, und 45°C für 50 min. Anschließend wurde durch Inkubation bei 70°C für 15 min die Synthese gestoppt. Die erhaltene cDNA wird bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.3.4 Q-RT-PCR

Die Q-RT-PCR (Quantitative-Reverse-Transkriptase-PCR) wurde mit Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix (Abgene, Rochester, New York, USA) durchgeführt. Für jeden Reaktionsansatz wurden 10µl SYBR Green Fluorescein Mix mit 2µl der 1:20 verdünnten cDNA, 3µl Wasser sowie je 2,5µl der jeweiligen Primerlösung (5pmol) gemischt und in einem iCycler (Biorad, Hercules, California, USA) inkubiert und analysiert. Folgende Zyklen wurden durchgeführt:

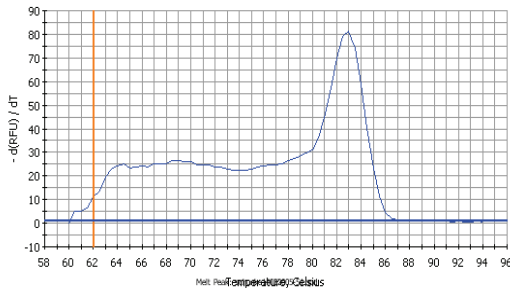
1. Aktivierung der Polymerase: 95°C 15min
2. 40 Zyklen: Denaturierung: 95°C 15s  
                   Annealing: 60°C 1min  
                   Synthese: 72°C 1min

Jede Messung erfolgte im Doppelansatz. Die Ergebnisse wurden mit der iCycler iQ Optical System software (Version 3.1) (Biorad) analysiert.

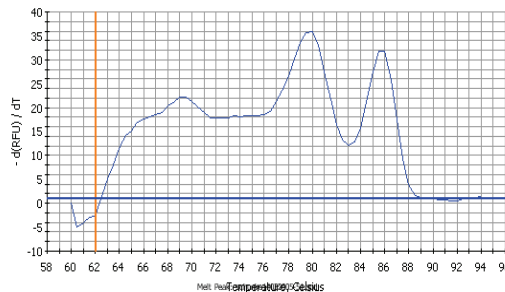
Der relative RNA-Gehalt der Proben wurde mit der  $C_t(2^{-\Delta\Delta C_t})$  –Methode anhand der  $C_t$  -Werte der automatisch von der Software bestimmten Threshold Cycles bestimmt. Zur Normalisierung wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) sowie bei den Tumorproben zusätzlich HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) verwendet. Es wurde der Mittelwert der jeweiligen Doppelansätze aus Gen (X) bzw. Normalisierungsgen (N) verwendet. Der Algorithmus sei im Folgenden kurz dargestellt:

- (1)  $(X_1+X_2) * \frac{1}{2} = X$
- (2)  $(N_1+N_2) * \frac{1}{2} = N$
- (3)  $Expression = 2^{-(X-N)}$

Routinemäßig wurde zudem die bei jeder Q-RT-PCR erzeugte Schmelzkurve des PCR-Produkts analysiert, um die Bildung von Primer-Dimeren auszuschließen, die ansonsten das Ergebnis verfälschen würden. **Abb.3.2** zeigt eine regelrechte Schmelzkurve mit nur einem Produkt. **Abb.3.3** lässt ein zusätzliches Produkt erkennen, welches einen anderen Schmelzpunkt aufweist. Dies sind in den meisten Fällen Primer-Dimere, die sich unabhängig vom eigentlichen Produkt aufgrund des Primerdesigns durch Zusammenlagerung der Primer entlang basenpaaranaloger Sequenzen bilden. In solchen Fällen müssen die Primer, soweit möglich, ausgetauscht werden.



**Abb. 3.2:** regelrechte Schmelzkurve, gute Signal-Noise-Ratio



**Abb. 3.3:** Schmelzkurve mit Primer-Dimeren. Der Primer wurde ausgetauscht.

Primer-Dimere sind meist kürzer als das gesuchte Produkt und haben deshalb, abhängig von ihrem GC-Gehalt, einen niedrigeren Schmelzpunkt, so dass der erste Peak meist die Dimere darstellt. Weil auch dies DNA-Doppelstränge sind, wird SYBR Green ebenso wie das eigentliche Produkt eingelagert und durch das Q-PCR-Gerät gemessen. Eine Unterscheidung im Gerät oder in der Software erbringt keinen großen Nutzen, da eine Dimerbildung immer kompetitiv abläuft, so dass das gesuchte Produkt stets mit geringerer Performance gebildet wird, als ohne auftretende Dimere. Der Threshold Cycle erscheint künstlich verzögert, die Messung wäre zu ungenau.

GAPDH und HPRT wurden als Normalisierungsgene gewählt. Beides sind House-keeping-Gene, also Gene, die konstitutiv in jeder Zelle exprimiert werden, und von Umgebungsbedingungen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Somit ist ihr Anteil an der Gesamt-RNA ebenfalls stets gleich. GAPDH ist als Standard in zahlreichen Genexpressionsanalysen in der Literatur etabliert [21; 375]. HPRT wird durch deKok et al. [79] als Normalisierungsgen empfohlen, da es die geringsten Expressionsschwankungen der untersuchten Gene zeigt, und somit als beinahe gleichwertiger Ersatz zur Messung von bis zu 10 Normalisierungsgenen dienen kann. Zudem zeigt es ähnlich hohe  $C_T$ -Werte wie die meisten untersuchten Zielgene. Dadurch ist auch die Effektivität der Q-RT-PCR bei Normalisierungsgen und dem zu untersuchenden Gen vergleichbar. Da GAPDH und HPRT in den Zellkulturexperimenten stets vergleichbare Ergebnisse liefern, wurde bei diesen aus ökonomischen Gründen nur GAPDH zur Normalisierung verwendet. Korrelationen von Expressionswerten bei der Analyse der Tumorproben wurden hingegen nur verwendet, wenn die Messung gegen GAPDH und HPRT zu ähnlichen Ergebnissen kommt.

### 3.3.5 Gel-Elektrophorese

Das per konventioneller PCR erhaltene PCR-Produkt wurde in 2%igem Agarose Gel analysiert. Dazu werden 2g Agarose zu 98g 0,5x TE-Lösung (5 mM Tris/HCl; 0,5 mM EDTA; pH 8,0) gegeben und kurz aufgeköcht. Nach dem Gießen des Gels und Auftrag von 6 $\mu$ l des unverdünnten fertigen PCR-Produkts (GoTaq-Polymerase-Puffer enthält bereits alle nötigen Reagenzien), wurde das Gel für 30 min bei 120V in der Elektrophoresekammer gefahren. Anschließend wurde das Gel für 30min in Ethidiumbromidlösung (2 $\mu$ l/ml) inkubiert, kurz gewaschen und anschließend per Foto dokumentiert. Stichprobenartig wurden auch die PCR-Produkte der Q-RT-PCR analog zum oben genannten Vorgehen per Gel-Elektrophorese analysiert.

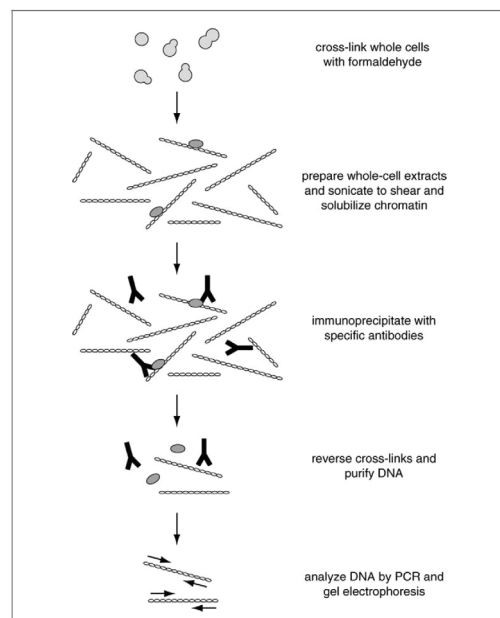
### 3.3.6 cDNA-Microarray-Analyse

Zur Microarray-Analyse wurde der Affymetrix HG-U133A verwendet, wobei die Herstellerangaben strikt befolgt wurden. 1-8µg total RNA werden mit T7-Oligo(dT) Promotor Primern in der first strand cDNA Synthese-Reaktion revers transkribiert. Nach Synthese des zweiten cDNA Strangs mit RNase-H wird die doppelsträngige cDNA gereinigt und mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase in cRNA in einer Mischung von biotinylierten Nukleotid-Analoga und Ribonukleotiden transkribiert. Die biotinylierte cRNA wird aufgereinigt, fragmentiert und auf einen HG-U133A GeneChip für 16h bei 45°C mit Hilfe eines Hybridisierungspuffers (100mM. 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure (MES), 1M NaCl, 20mM EDTA, 0.01% Tween-20), der 50 pM eines Kontrolloligonukleotids, 0.1 mg/ml Heringssperma DNA, 0.5 mg/ml Kälberserumalbumin und 10% Dimethylsulfoxid enthält, hybridisiert. Nach mehreren Waschschrinen, wird die hybridisierte biotinylierte cRNA mit Streptavidin-Phycoerythrin detektiert.

Microarray-Analysen wurden von jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dabei wurden zum einen die Expressionsmuster von MDA-MB-231-Zellen, die mit siRNA gegen RhoGDIβ behandelt wurden, mit denen von Zellen verglichen, die mit siRNA gegen Luciferase behandelt wurden. Zum anderen wurden analog dazu drei Experimente mit Zellen, die mit siRNA gegen PTHrP behandelt wurden im Vergleich zu siLuc-behandelten Zellen durchgeführt. Nur solche Gene, die einen p-Wert <0,05 (einseitiger Wilcoxon Rank Test) und deren Expression in ähnlicher Weise in allen drei Vergleichsanalysen verändert ist, wurden als siRβ bzw. siPTHrP-responsive Gene angesehen. Alle Microarray-Analysen wurden von Pearl Campbell, Genomics Manager, Ontario Genomics Innovation Centre, Ottawa Health Research Institute, 501 Smyth Road, Ottawa, Ontario, Canada durchgeführt.

### 3.3.7 ChIP(Chromatin Immuno Precipitation)-Analyse

Zum Nachweis der direkten Abhängigkeit der RhoGDIβ-Expression von der Wirkung des Transkriptionsfaktors Ets1 am Promotor wurde eine ChIP durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Bindung eines bestimmten Proteins, in diesem Fall von Ets1, an ein DNA-Fragment im Chromatin nachgewiesen. Dazu werden lebende MDA-MB-231-Zellen mit Formaldehyd fixiert, um Protein-Protein, aber auch Protein-DNA cross-links zu erzeugen. Die Zellen werden lysiert und die so erhaltene DNA durch Ultraschall fragmentiert. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen Ets1 wird das Ets1-DNA-Konjugat präzipitiert. Durch Hitzeeinwirkung über Nacht werden die Protein-DNA cross-links aufgehoben und die so erhaltene DNA quantitativ analysiert. Der Ablauf ist schematisch in nebenstehendem Diagramm dargestellt (Abb.3.4). Um eine Bindung von Ets1 an die Promotorregion von RhoGDIβ zu zeigen, wurden mögliche Ets1-Binding-Sites (EBS) in der Sequenz gesucht und entsprechende Primer hergestellt, die in Tabelle 3.3 aufgeführt sind.



**Abb. 3.4:** Prinzip des ChIP-Assays anhand der Untersuchung von Hefezellen (aus [10])



Primerpaar Nr.: Produktgröße:	Name: ARHprom-	Sequenz (5' → 3'):
1 77bp	-121F -197R	AAGTTGGCTGATCAAGAGATAGGC GACCTACTTGAAGAGGAAACCCTG
2 104bp	-775F -878R	GTTTAAACATGGCCTCCGAGACT TTGTGACAACCTTAACAAGTGCCAA

**Tab. 3.3:** PCR-Primer der Promotorregion von RhoGDI $\beta$

Zur Durchführung des CHIP-Assays wurde ein Kit von Lake Placid Biologicals (Lake Placid, New York, USA) verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Diese seien im Folgenden kurz genannt.

### I. Formaldehyd Cross-linking und Zellyse

1. Zugabe von 37% Formaldehyd zu kultivierten Zellen bis zur Zielkonzentration von 1% Formaldehyd. Mischen durch Schwenken der Kulturschale.
2. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Zugabe von 10x Glycin bis zur Zielkonzentration von 1x. Mischen durch Schwenken der Kulturschale.
4. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Überstand von Formaldehyd, Glycin und Medium absaugen.
6. Zellen durch zweimalige Zugabe von 1x PBS waschen.
7. Zugabe von 1ml Scraping Buffer.
8. Zellen abschaben und in Microfuge Tube auf Eis sammeln.
9. Zellen in Pellet durch Zentrifugieren bei 700g bei 4°C sammeln, Überstand verwerfen.
10. Zugabe von 1ml Final Lysis Buffer (1ml Lysis Buffer + 5 $\mu$ l Protease Inhibitor Cocktail). Resuspendieren der Zellen. Inkubation auf Eis für 10 min. Dabei gelegentlich mischen.
11. Zelllysate bei 12.000g abzentrifugieren. Überstand in neues Tube überführen. Lagerung bei -80°C.

### II. Chromatin-Präparation

1. Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250, Branson Ultraschall GmbH, Dietzenbach, Deutschland) gemäß Herstellerangaben vorbereiten.
2. DNA-Fragmentierung durch 3-5 Pulse von 5-10s Dauer auf Eis. Pausen zwischen den Pulsen von 30s bis 1 min.
3. Abzentrifugieren der Chromatin-Präparation bei 12.000g, um unlösliches Material zu pelletieren.
4. Chromatinüberstand abnehmen und in neues Tube überführen. Lagerung bei -80°C

### III. Immunopräzipitation

1. Zugabe von 900 $\mu$ l des Dilution Buffer mit Protease Inhibitor Cocktail zu jedem Reaktionsgefäß.
2. Zugabe von 50 $\mu$ l Protein G Agarose (at 50% slurry) und für 30 min bei 4°C im Rotator mischen.
3. Zentrifugieren bei 3000-5000g für 1 min, um Protein G-Agarose zu pelletieren.
4. Chromatinüberstand in neues Reaktionsgefäß überführen, Protein G-Agarose verwerfen.
5. 10 $\mu$ l (1%) abnehmen und als Input Chromatin in neuem Reaktionsgefäß bis Sektion V bei 4°C aufbewahren.
6. Entsprechende Menge Antikörper zugeben. Gleiches Verfahren für Negativkontrolle einhalten.
7. Über Nacht bei 4°C im Rotator mischen.
8. 50 $\mu$ l Protein G-Agarose zugeben und für 1h im Rotator bei 4°C mischen.

9. Zentrifugieren bei 3.000-5.000g für 1 min, um Protein G-Agarose zu pelletieren.
10. Überstand abnehmen und verwerfen oder zur späteren Analyse des ungebundenen Chromatins aufbewahren.
11. Waschen der Protein G-Agarose mit 1ml eines jeden Puffers in der Reihenfolge:  
Wash Buffer 1-3; je einmal waschen  
Wash Buffer 4; zweimal waschen.
- Dabei Inkubieren des Puffers mit der Protein G-Agarose bei 4°C für 5 min im Rotator. Zentrifugieren bei 3.000-5.000g für 1 min, um Protein G-Agarose zu pelletieren. Anschließend vorsichtig Überstand abnehmen.
12. Letzten Wash Buffer bis zum nächsten Schritt belassen, um Austrocknen zu verhindern.

#### **IV. Eluieren des Antikörper-Antigen-DNA-Komplexes**

1. Zugabe von 200µl Elutions-Puffer in Input-Reaktionsgefäß.
2. Zu jedem Tube mit pelletierter Protein G-Agarose, 100µl Elutions-Puffer zugeben.
3. Gut mischen und bei Raumtemperatur für 15 min inkubieren.
4. Protein G-Agarose bei 3.000-5.000g für 1 min pelletieren.
5. Überstand vorsichtig abnehmen und in neues Reaktionsgefäß überführen. Dies ist der immunopräzipitierte Antikörper-Antigen-DNA-Komplex.
6. Schritte 2-5 mit weiteren 100µl Elutions-Puffer wiederholen.

#### **V. Aufbrechen der cross-links und Vorbereiten für die DNA-Isolierung**

1. Zugabe von 8µl 5M NaCl zu jedem Reaktionsgefäß. Mischen und Inkubieren bei 65°C für mindestens 4h oder über Nacht, um Formaldehyd cross-links rückgängig zu machen.
2. Zugabe von 1 µl RNase A zu jedem Reaktionsgefäß und Inkubieren für mind. 15 min bei 37°C.
3. Zugabe von 8µl 1M Tris-HCl, pH 6.5, 4µl 0.5M EDTA und 1µl Proteinase K zu jedem Reaktionsgefäß und Inkubieren für 1-1.5 h bei 45°C.
4. 500µl Phenol zugeben, 2-3 min mischen, 3 min bei 13.000 min<sup>-1</sup> abzentrifugieren.
5. Obere wässrige Phase abnehmen, in neue Reaktionsgefäße überführen. 500µl Chloroform/Phenol-Mix (25:24:1) zugeben, 2-3 min mischen, 3 min bei 13.000 min<sup>-1</sup> abzentrifugieren.
6. Obere wässrige Phase abnehmen, in neues Reaktionsgefäß überführen, 500µl Chloroform zugeben, 2-3 min mischen, 3 min bei 13.000 min<sup>-1</sup> abzentrifugieren.

#### **VI. DNA-Fällung**

1. Obere wässrige Phase (ca. 350µl) abnehmen, in ein neues Reaktionsgefäß überführen, 1/10 Volumen (ca. 35µl) Natriumacetatlösung (1M) und 1 Volumen (ca. 350µl) Isopropanol zugeben, mischen, 10 min bei 13.000 min<sup>-1</sup> abzentrifugieren.
2. Waschen mit 70%igen Ethanol, zentrifugieren für 1min bei 13.000 min<sup>-1</sup>. DNA im Pellet
3. Pellet unter der Abzugshaube trocknen und je nach Menge in H<sub>2</sub>O resuspendieren

Die so erhaltene DNA wird per semiquantitativer PCR analysiert. Die semiquantitative PCR wird in einem Gesamtvolumen von 12µl pro Primerpaar angesetzt und mit folgendem Programm auf einer Biometra TGradient PCR-Maschine (Biometra, Göttingen, Deutschland) amplifiziert:

DNA (unverdünnt)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
Primer F (10pmol/µl)	1,0 µl
Primer R (10pmol/µl)	1,0 µl
2x GoTaq (Promega)	6,0 µl

<b>PCR Programm</b>		
hot start	95°C	2 min
Denaturieren	94°C	1 min
Anlagern	54°C	30s
Synthese	72°C	40s
32 Zyklen		

Anschließend wird das PCR-Produkt in der Gel-Elektrophorese wie in 3.3.5 beschrieben bei 120V für 30 min aufgetrennt und anschließend das Gel in Ethidiumbromidlösung (2µl/ml) für 30 min inkubiert und dann fotografiert. Es erfolgt dabei stets ein Vergleich zwischen der Amplifikation immunopräzipitierter DNA und Input DNA.

Die ChIP-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit A. und J. Dittmer durchgeführt.

### 3.3.8 Statistische Auswertung

Der zweiseitige Pearson-Korrelationskoeffizient wurde genutzt, um das Verhältnis der relativen mRNA-Expression der Gene untereinander in den Brustkrebsproben zu vergleichen. Der Mann-Whitney U-Test wurde verwendet, um Alter, Menopausenstatus, Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus mit der RhoGDIβ-Expression zu vergleichen. Das Verhältnis von Nodalstatus, Tumorart und Grading mit RhoGDIβ wurde mittels des Kruskal-Wallis-Test und das zwischen Tumorgröße und RhoGDIβ mit dem Spearman-Korrelations-Test untersucht. Überlebensanalysen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt, wobei die Überlebenskurven mit dem Log-Rank-Test verglichen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket SPSS Version 13.0 (SPSS Inc., USA). P<0,05 wurde als signifikant betrachtet.

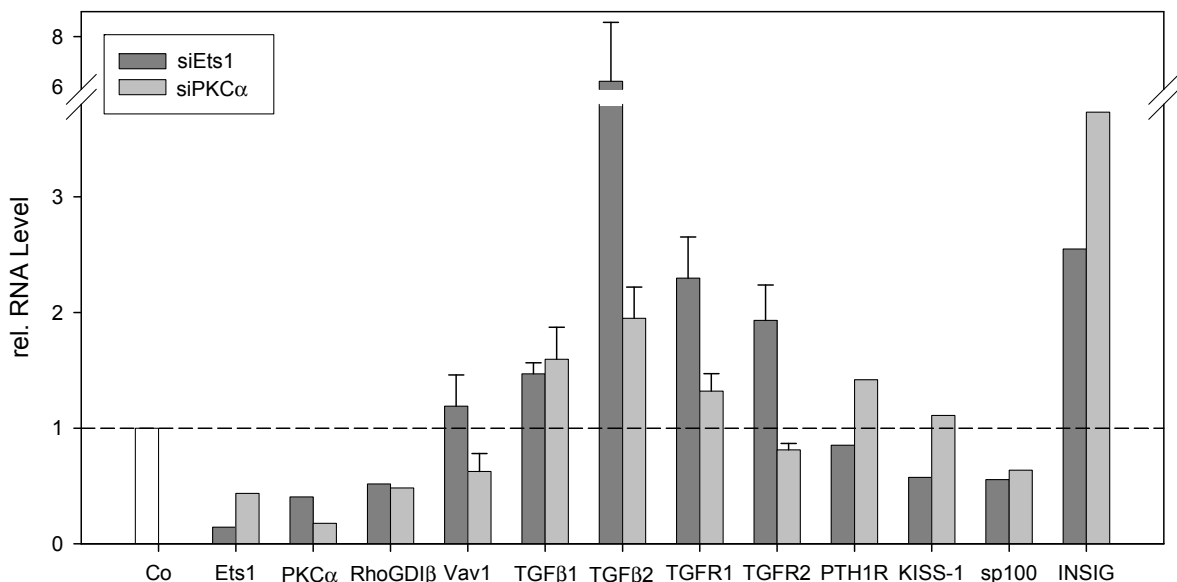
## 4 Ergebnisse

Die Untersuchung der Genexpression der unten angeführten Gene geht von einer Microarray-Analyse der durch Ets1 bzw. PKC $\alpha$  regulierten Gene bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 aus [413]. Um die Relevanz für das primäre Mammakarzinom zu ergründen, erfolgte die vorliegende Analyse.

### 4.1 Genregulation durch Ets1

#### 4.1.1 Zellkultur

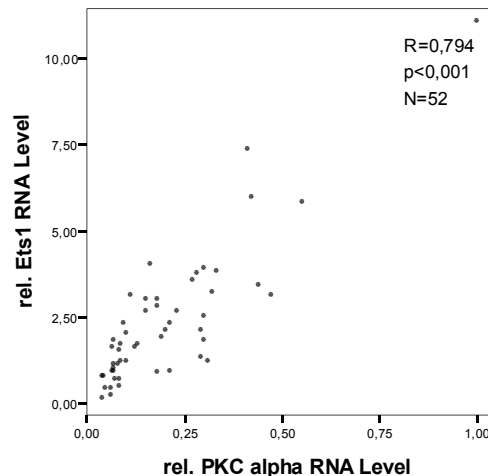
Zur Bestätigung der Microarray-Daten [413] erfolgte eine ergänzende Q-RT-PCR-Analyse von RhoGDI $\beta$ , Vav1, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGFR1, TGFR2, PTH1R, KISS-1, Sp100 und INSIG-1 an MDA-MB-231-Zellen, bei der die Ets1- bzw. PKC $\alpha$ -Expression mit Hilfe von siRNA unterdrückt wurde. Zur Kontrolle diente jeweils ein mit siLuc (siRNA gegen Luciferase, die in humanen Zellen nicht vorkommt) behandelter Ansatz. Wie sich zeigte, wird RhoGDI $\beta$  positiv von Ets1 und PKC $\alpha$  reguliert. Vav1 hingegen zeigte nur bei Unterdrückung der PKC $\alpha$ -Expression eine Reduktion der Expression. TGF $\beta$ 1 wird in MDA-MB-231-Zellen nicht von Ets1 oder PKC $\alpha$  reguliert, da die Expressionsveränderungen nur marginal sind, ebenso verhält es sich mit PTH1R. TGF $\beta$ 2 hingegen wird durch Unterdrückung von Ets1 bis zu achtfach in der Expression induziert, bei supprimiertem PKC $\alpha$  noch 2,2fach. TGFR1 und TGFR2 werden vor allem durch Ets1 unter normalen Bedingungen supprimiert, da sie bei Unterdrückung der Expression von Ets1 bis zu zweifache Expressionssteigerungen zeigen. PKC $\alpha$  hat auf diese keinen Einfluss. Die Expression von KISS-1 wird durch Ets1 positiv beeinflusst. Sp100 wird von Ets1 und PKC $\alpha$  positiv reguliert. Schließlich zeigt sich bei INSIG-1 (insulin-inducible gene 1) bei Unterdrückung von Ets1 oder PKC $\alpha$  eine Expressionssteigerung auf das 2,5 bzw. 3,7fache. (**Abb. 4.1**)



**Abb. 4.1:** Induktion bzw. Suppression ausgewählter Gene durch siEts1 bzw. siPKC $\alpha$  in MDA-MB-231-Zellen

### 4.1.2 Primäres Mammakarzinom

An bis zu 52 Brustkrebsproben erfolgte die Expressionsuntersuchung von 42 Genen, die direkt oder indirekt in MDA-MB-231-Zellen von Ets1 oder PKC $\alpha$  reguliert werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression von PKC $\alpha$  mit der von Ets1 wurde von Lindemann et al. [238] und Vetter et al. [413] nachgewiesen. Die Regulation von Ets1 durch PKC $\alpha$  zeigte sich auch anhand der untersuchten Brustkrebsproben im Scatterplot (**Abb.4.2**), damit kann von einer allgemeinen Gültigkeit der bisher nur in MDA-MB-231-Zellen nachgewiesenen Abhängigkeit ausgegangen werden.



**Abb. 4.2:** Korrelation der mRNA-Expressionslevels von Ets1 und PKC $\alpha$

Die Korrelationen nach Spearman von Ets1 und PKC $\alpha$  mit den übrigen untersuchten Faktoren werden nachfolgend in Tabellenform (**Tab.4.1**) wiedergegeben. Die Korrelationen sind separat nach dem verwendeten House-keeping Genen HPRT und GAPDH aufgeführt. Dabei wurden nur 34 Proben untersucht, die abhängig von der Expressionskonkordanz zwischen HPRT und GAPDH ausgewählt wurden (Daten nicht gezeigt). Proben, die eine höhere Abweichung zwischen der Expression von GAPDH und HPRT aufwiesen, wurden in die folgende Tabelle nicht aufgenommen. Nur Faktoren, die mit beiden House-keeping Genen signifikant mit Ets1 bzw. PKC $\alpha$  korrelieren, wurden als valide angesehen.

Es zeigt sich eine sehr hohe Korrelation zwischen PKC $\alpha$  und Ets1, wie sie nach den Ergebnissen der Zellkultur von Vetter et al. [413] zu vermuten war. Weiterhin ist RhoGDI $\beta$ , nicht jedoch RhoGDI $\alpha$  oder  $\gamma$  mit Ets1 und PKC $\alpha$  assoziiert. Auch Vav1 ist mit PKC $\alpha$  und Ets1 hochsignifikant korreliert, ebenso wie PAI-1 und uPA. Auch die Korrelation von Ets1 und PKC $\alpha$  mit Sp100, DIAPH und PI3KCA bestätigen die von Vetter et al. im Microarray gefundenen Zusammenhänge. Erstaunlich ist die hohe Korrelation von TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 sowie TGFBR1 mit Ets1 und PKC $\alpha$ . TGFBR2 korreliert dagegen nur mit PKC $\alpha$ . Ebenso bemerkenswert ist die zuvor von Vetter et al. [413] noch nicht gesehene Korrelation von Endothelin-1 und dessen Rezeptor ET $_A$ R mit Ets1 und PKC $\alpha$ . Eine Kausalität ist dabei möglich, wurde jedoch nicht weiter untersucht. Die Gesamt-RNA-Menge von PTHrP korreliert mit Ets1 und PKC $\alpha$ , wobei jedoch lediglich das Produkt von Exon 4, nicht jedoch die von Exon 1 und 3, mit PKC $\alpha$  assoziiert ist.

Nur wenige Faktoren wie Elf1, NQO1, PTHrP P2, RUNX-1, TGFBR2 sowie TPM1 korrelieren nur mit PKC $\alpha$ , nicht aber mit Ets1. Etliche andere Faktoren, die in MDA-MB-231-Zellen von Ets1 reguliert werden, darunter MMP9, INSIG, IGF-2, TSSC3 und PTPRN2 zeigen in den klinischen Proben keinen Zusammenhang mit Ets1 oder PKC $\alpha$ .

Diese stichprobenartige Untersuchung der potentiell von PKC $\alpha$  und Ets1 regulierten Faktoren zeigt, dass keine großen Abweichungen der mit PKC $\alpha$  bzw. Ets1 korrelierenden Faktoren bestehen. Dies bestätigt die enge Beziehung beider Faktoren zueinander, was damit auch in Mammakarzinomproben nachgewiesen wurde.

Symbol	HPRT		GAPDH		Gen
	ETS1	PKC $\alpha$	ETS1	PKC $\alpha$	
ETS1	1	,881(**)	1	,863(**)	E26 transformation specific sequence 1 (Ets1)
PKC $\alpha$	,881(**)	1	,863(**)	1	Protein Kinase C $\alpha$
ARHGDI A	,374(*)	n.s.	n.s.	n.s.	Rho GDP Dissociation Inhibitor $\alpha$
ARHGDI B	,677(**)	,689(**)	,656(**)	,684(**)	Rho GDP Dissociation Inhibitor $\beta$
ARHGDI G	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	Rho GDP Dissociation Inhibitor $\gamma$
CYR61	,542(**)	,547(**)	,539(**)	,579(**)	cysteine-rich heparin-binding protein 61
DIAPH1	,634(**)	,545(**)	,394(*)	n.s.	diaphanous homolog 1
ELF1	,514(**)	,616(**)	n.s.	,503(**)	E74-like factor 1 (Elf-1)
ESX	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	E74-like factor 3 (Elf-3); ETS domain, serine box, epithelial-specific
ET-1	,652(**)	,598(**)	,592(**)	,565(**)	Endothelin-1
ET <sub>A</sub> Rec	,573(**)	,659(**)	,487(**)	,583(**)	Endothelin Receptor A
ETS2	,627(**)	,626(**)	,580(**)	,492(**)	E26 transformation specific sequence 2 (Ets2)
FN1	,618(**)	,598(**)	,534(**)	,430(*)	Fibronectin-1
IGF2	,434(*)	,426(*)	n.s.	n.s.	Insulin-like Growth Factor 2
INSIG	n.s.	,392(*)	n.s.	n.s.	insulin induced gene 1
MMP9	,384(*)	n.s.	n.s.	n.s.	Matrix-Metallo-Proteinase 9
NQO1	,441(*)	,501(**)	n.s.	,409(*)	NAD(P)H:Chinon Oxidoreductase I
PAI1	,542(**)	,557(**)	,601(**)	,629(**)	plasminogen activator inhibitor 1
PI3KCA	,503(**)	,590(**)	,452(**)	,574(**)	PI3-kinase p110 subunit alpha
PLAU	,488(**)	,463(**)	,433(**)	,366(*)	uPA (urothelial plasminogen activator)
PTH1R	,696(**)	,743(**)	,730(**)	,700(**)	Parathormon-1 Rezeptor
PTHrP	,414(*)	,463(**)	,399(*)	,410(*)	Parathormone related peptide (Exon 4) (entspricht Exon 6)
PTHrP1A	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	Parathormone related peptide (Exon 1A) (entspricht Exon 1)
PTHrP1C	n.s.	,521(**)	n.s.	n.s.	Parathormone related peptide (Exon 1C) (entspricht Exon 3)
PTHrP2	n.s.	,453(*)	n.s.	,386(*)	Parathormone related peptide (Exon 2) (entspricht Exon 4)
PTPRN2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2
RUNX1	,609(**)	,715(**)	n.s.	,537(**)	runx related transcription factor 1
SP100	,682(**)	,714(**)	,615(**)	,708(**)	SP100 nuclear antigen
TGFB1	,682(**)	,723(**)	,665(**)	,703(**)	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
TGFB2	,451(**)	,411(*)	,492(**)	,450(**)	Transforming Growth Factor $\beta$ 2
TGFBRec1	,394(*)	,440(**)	n.s.	,409(*)	TGF $\beta$ Rezeptor 1
TGFBRec2	,670(**)	,693(**)	,619(**)	,641(**)	TGF $\beta$ Rezeptor 2
TPM1	n.s.	,483(**)	n.s.	,462(*)	tropomyosin 1 (alpha)
TSSC3	n.s.	,392(*)	n.s.	n.s.	tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment 3
VAV1	,825(**)	,838(**)	,774(**)	,824(**)	Vav1

\*\*Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

\* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

n.s. nicht signifikant

**Tab. 4.1:** Vergleich der Korrelationen von Ets1 und PKC $\alpha$  bei Verwendung von GAPDH bzw. HPRT als Normalisierungsgen

## 4.2 Regulation von RhoGDI $\beta$

### 4.2.1 CHIP-Assay

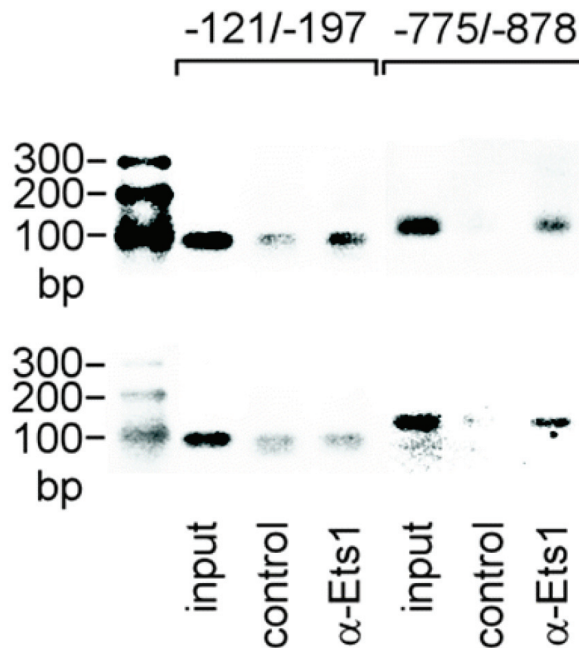
Das CHIP-Assay [10; 105] diente dem Nachweis der Bindung von Ets1 an den Promotor von RhoGDI $\beta$  *in vivo*, um einen direkten Einfluss von Ets1 auf die Expression von RhoGDI $\beta$  zu bestätigen.

Zunächst wurden die zwei ausgewählten Primerpaare, die Sequenzen des RhoGDI $\beta$ -Promotors mit vermuteten Ets1-Binding Sequences (EBS) amplifizieren, an Input DNA getestet. Als interner Standard diente ein RhoGDI $\beta$ -Primer, der ca. 1kbp von der Promotor-Region entfernt in der kodierenden Region des Gens bindet. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Bereich nach DNA-Fragmentierung und Immunpräzipitation mit Ets1 ebenfalls angereichert wird. Der Standard diente dem Nachweis der Verwendung der gleichen Menge DNA pro Ansatz.

Die konventionelle Endpunkt-PCR ergab eine relativ homogene und hochspezifische Amplifikation aller untersuchten Primerpaare sowie des Standards. Damit war erwiesen, dass die in der PCR angewendeten Bedingungen für die Amplifikation aller durch die Primerpaare spezifizierten Sequenzen ausreichend sind (Daten nicht gezeigt). In der Immunpräzipitation werden DNA-Fragmente angereichert, an die Ets1 *in vivo* bevorzugt bindet. Durch den Vergleich der Menge der durch die Primerpaare amplifizierten DNA-Fragmente in diesem Ansatz mit deren Menge in der eingesetzten Input DNA kann die Bindungsaffinität von Ets1 *in vivo* abgeschätzt werden.

Das ChIP-Assay ergab durch die Immunopräzipitation mit Ets1 eine deutliche Anreicherung eines Fragments, welches sich im Promotorbereich 775-878bp upstream des RhoGDI $\beta$ -Gens (**Abb. 4.3**). Zum Vergleich wurde zudem ein Fragment (121-197 bp upstream) der Promotorregion untersucht, das in der Kontrolle wie auch in Ets1 einen gleichen DNA-Gehalt aufweist. Die Input-DNA ergab stets eine stärkere Bande, da durch die oben beschriebenen Schritte der Immunopräzipitation eine erhebliche DNA-Menge verloren geht.

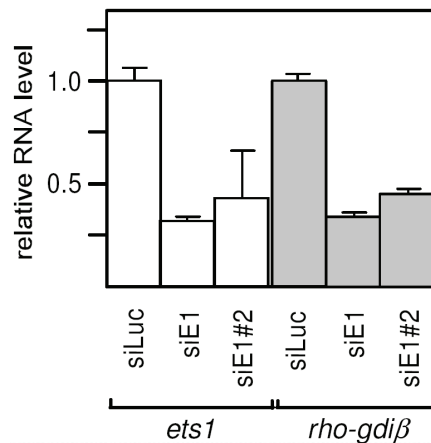
Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Ets1 an den Promotor von RhoGDI $\beta$  *in vivo* bindet und dadurch auf direktem Wege die Expression von RhoGDI $\beta$  steuert.



**Abb. 4.3:** ChIP-Assay. Durch Antikörper gegen Ets1 deutliche Anreicherung des Fragments -775/-878, während das Kontrollfragment -121/-197 in der Menge unverändert zur Darstellung kommt.

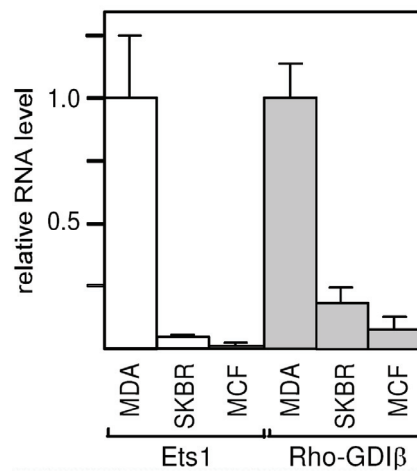
#### 4.2.2 Regulation von RhoGDI $\beta$ in der Zellkultur

Bei Supprimierung von Ets1 mit Hilfe von spezifischer siRNA (siE1) verringert sich auch die RhoGDI $\beta$ -Expression in den untersuchten MDA-MB-231-Zellen. Dieses Ergebnis ist auch mit einer zweiten Ets1-spezifischen siRNA (siE1#2) reproduzierbar (**Abb. 4.4**).



**Abb. 4.4:** Einfluss von siE1 und siE1#2 auf die Expression von Ets1 und RhoGDI $\beta$ . Abhängig vom Ausmaß der Suppression von Ets1 wird auch die Expression von RhoGDI $\beta$  unterdrückt.

In verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien zeigt die Expression von RhoGDI $\beta$  und Ets1 ein ähnliches Verhalten. Hohe Ets1-Expression, wie in MDA-MB-231-Zellen zu beobachten ist, geht mit einer hohen RhoGDI $\beta$ -Expression einher. Die niedrige Expression von Ets1 in MCF-7-Zellen bedingt analog dazu eine niedrige RhoGDI $\beta$ -Expression (**Abb. 4.5**).



**Abb. 4.5:** Vergleich der relativen mRNA-Level von Ets1 und RhoGDI $\beta$  in verschiedenen Zelllinien des primären Mammakarzinoms. Die Höhe der Expression von RhoGDI $\beta$  ist eng mit dem Expressionslevel von Ets1 assoziiert.

#### 4.2.3 Regulation von RhoGDI $\beta$ im invasiven Mammakarzinom

RhoGDI $\beta$  (**Abb.4.6, 4.7**) und etwas geringer auch RhoGDI $\alpha$  (**Abb.4.8, 4.9**) korrelieren hoch signifikant mit der Ets1- ( $R=0,659$  bzw.  $R=0,519$ ), aber auch mit der PKC $\alpha$ -mRNA-Expression ( $R=0,601$  bzw.  $R=0,438$ ) im invasiven Mammakarzinom. Die RhoGDI $\gamma$ -Expression korreliert dagegen nicht mit diesen Faktoren (**Abb.4.12, 4.13**). Allerdings ist die RhoGDI $\alpha$ -Expression nur einer sehr geringen relativen Spannweite von 25 unterworfen, d.h. die maximale Expression ist 25fach höher als die niedrigste, so dass die RhoGDI $\alpha$ -Level eher als konstant angesehen werden müssen. Im Gegensatz dazu beträgt die maximale RhoGDI $\beta$ -Expression das 69fache der niedrigsten, im Falle von RhoGDI $\gamma$  sogar das 159fache (**Abb. 4.14**).

Bei Betrachtung nur der in 4.1.2. angesprochenen 34 Proben ergeben sich folgende Korrelationen (**Tab. 4.2**):

		Ets1	PKC $\alpha$	
Spearman's rho	RhoGDI $\alpha$	Correlation Coefficient	,107	,049
		Sig. (2-tailed)	,546	,782
		N	34	34
	RhoGDI $\beta$	Correlation Coefficient	,533(**)	,467(**)
		Sig. (2-tailed)	,001	,005
		N	34	34
	RhoGDI $\gamma$	Correlation Coefficient	-,165	-,093
		Sig. (2-tailed)	,366	,612
		N	32	32

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Tab. 4.2:** Spearman Korrelationskoeffizient und Signifikanz der Assoziation von RhoGDI $\alpha$ , RhoGDI $\beta$  und RhoGDI $\gamma$  mit Ets1 und PKC $\alpha$  bei Betrachtung der 34 Proben, bei denen die Normalisierungsgene GAPDH und HPRT eine konstante Relation zueinander aufweisen.



Es zeigt sich, dass die hohen Korrelationen von RhoGDI $\beta$  weitgehend konstant bleiben, während RhoGDI $\alpha$  keinerlei Zusammenhang mit der Ets1- oder PKC $\alpha$ -Expression zeigt. Die Korrelation bei Betrachtung aller 52 Proben wird durch wenige Ausreißer verursacht, während der Großteil der Proben keine signifikante Korrelation zulässt. Die RNA-Expression von RhoGDI $\alpha$  steht somit im primären Mammakarzinom in keinem Zusammenhang mit Ets1 oder PKC $\alpha$  (Abb.4.10, 4.11).

### RhoGDI $\beta$

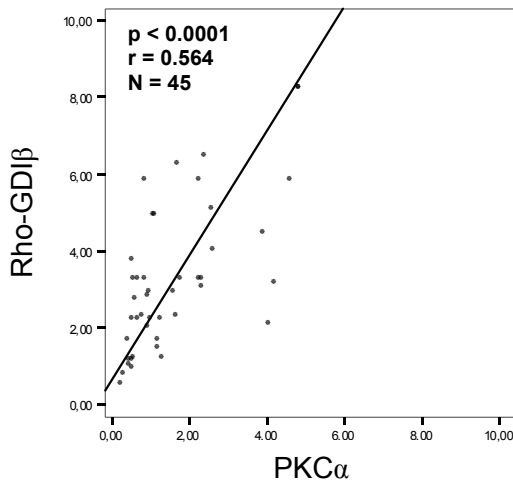


Abb. 4.6: Korrelation von RhoGDI $\beta$  mit PKC $\alpha$

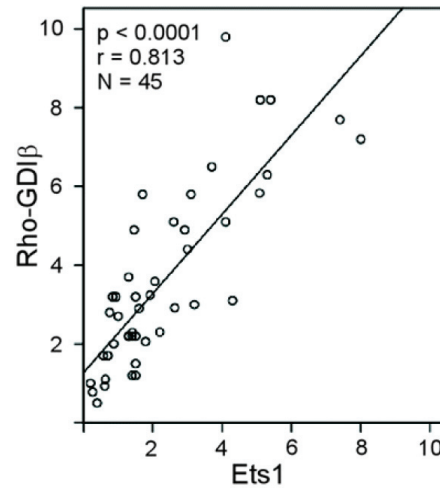


Abb. 4.7: Korrelation von RhoGDI $\beta$  mit Ets1

### RhoGDI $\alpha$

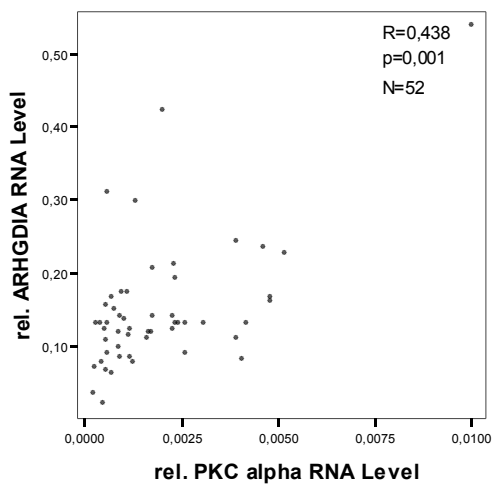


Abb. 4.8: Korrelation von RhoGDI $\alpha$  mit PKC $\alpha$   
N=52

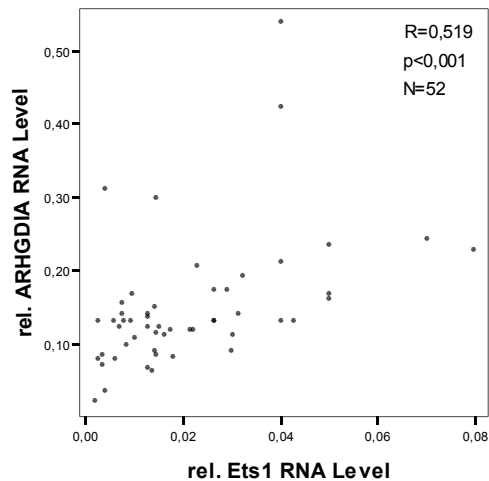
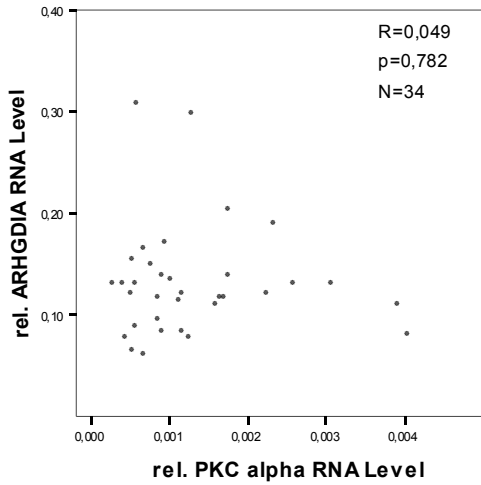
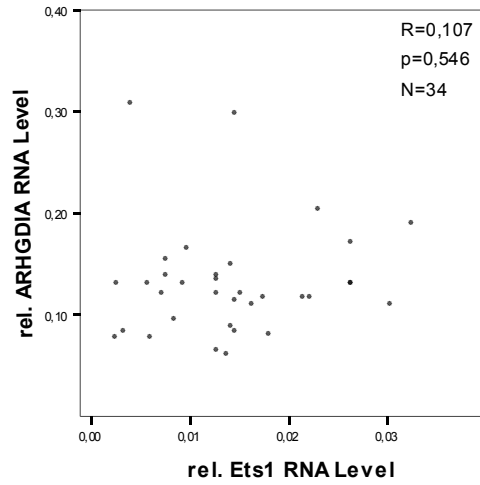


Abb. 4.9: Korrelation von RhoGDI $\alpha$  mit Ets1  
N=52

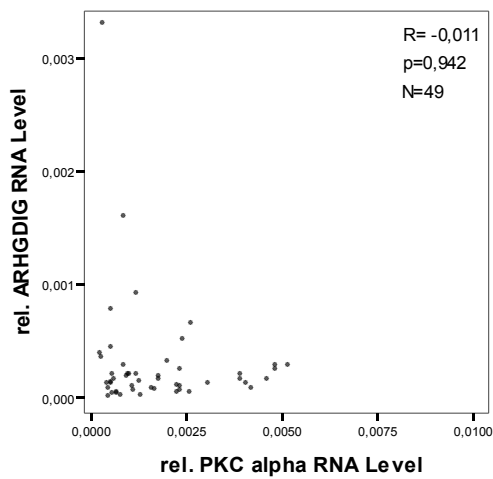


**Abb. 4.10:** Korrelation von RhoGDI $\alpha$  mit PKC $\alpha$   
N=34

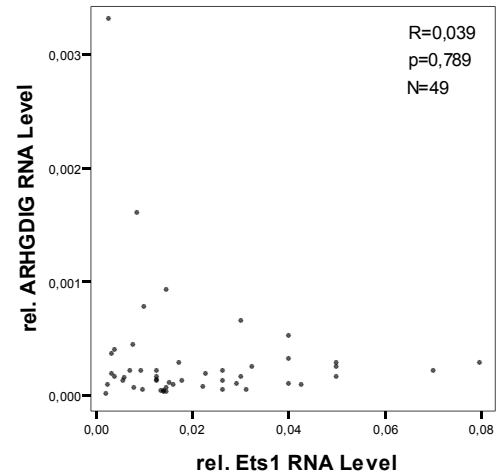


**Abb. 4.11:** Korrelation von RhoGDI $\alpha$  mit Ets1  
N=34

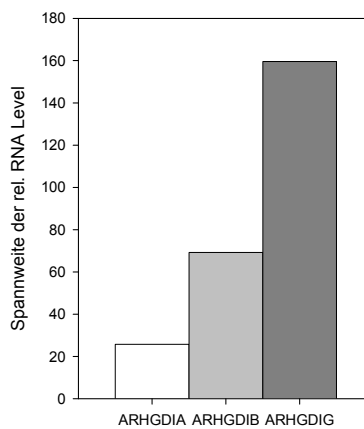
### RhoGDI $\gamma$



**Abb. 4.12:** Korrelation von RhoGDI $\gamma$  mit PKC $\alpha$



**Abb. 4.13:** Korrelation von RhoGDI $\gamma$  mit Ets1



**Abb. 4.14:** relative Spannweite der Expression von RhoGDI $\alpha$ , RhoGDI $\beta$  und RhoGDI $\gamma$ .

RhoGDI $\beta$  ist im invasiven Mammakarzinom spezifisch mit Ets1 assoziiert. Es korreliert mit Ets1 und PKC $\alpha$ , nicht jedoch mit den anderen untersuchten Ets-Faktoren Ets2 (Abb. 4.15) oder Esx (Abb.4.16).

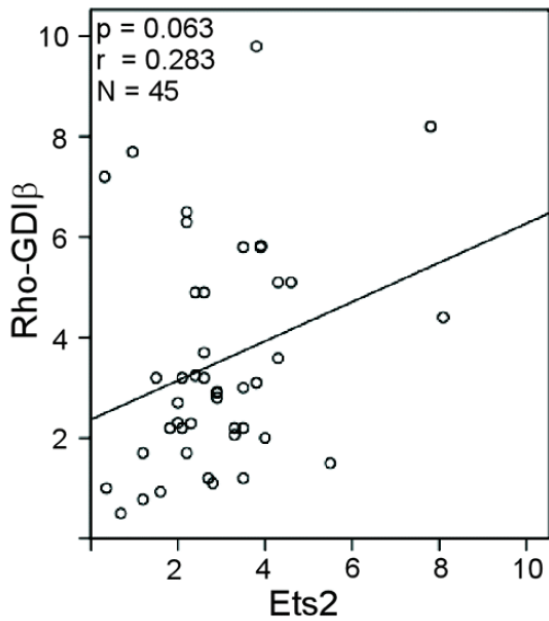


Abb. 4.15: Korrelation von RhoGDI $\beta$  mit Ets2

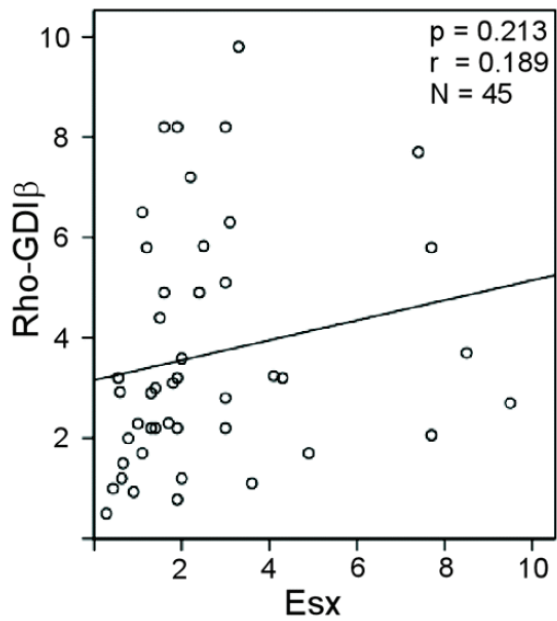


Abb. 4.16: Korrelation von RhoGDI $\beta$  mit Esx

#### 4.2.4 Assoziation von RhoGDI $\beta$ mit kliniko-pathologischen Parametern

Die Expression von RhoGDI $\beta$  ist zumindest im untersuchten Teilkollektiv auf RNA-Ebene invers mit der Anzahl positiver Lymphknoten korreliert (Abb.4.17), wobei zur Bestimmung der Signifikanz die Mediane der RhoGDI $\beta$ -Expression mit Hilfe des Student's t-Test verglichen wurden. Ein signifikanter Zusammenhang mit der TumorgroÙe pT, dem Grading, dem Hormonrezeptorstatus oder dem Menopausenstatus war auf RNA-Ebene nicht feststellbar.

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Gesamtkollektiv ( $N=263$ ) ein signifikanter Zusammenhang zwischen der RhoGDI $\beta$ -Expression und der TumorgroÙe. Ein niedrigeres Tumorstadium geht dabei mit einer h"oheren RhoGDI $\beta$ -RNA-Expression einher. Weitere Korrelationen konnten nicht gefunden werden (Tab.4.3).

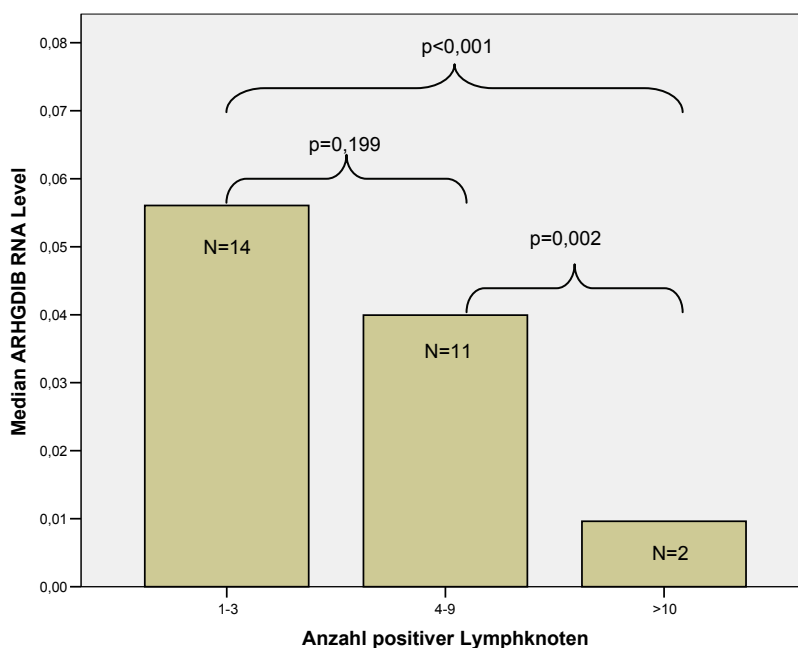


Abb 4.17: Mediane RhoGDI $\beta$ -Expression in Relation zur Anzahl positiver Lymphknoten

Table 1: associations of clinicopathological factors with Rho-GDI $\beta$  expression levels.

Variable	N= 263 <sup>a</sup>	Median (Rho-GDI $\beta$ /HPRT)	Interquartile range	<i>P</i>
Age (years)				
< 50	61	7.95	16.35	
$\geq$ 50	202	9.19	14.46	0.553 <sup>b</sup>
Menopausal status				
Premenopausal	67	7.78	14.46	
Postmenopausal	196	9.32	14.80	0.667 <sup>b</sup>
Nodal category				
Negative	105	9.25	18.82	
< 4 nodes	84	9.48	16.98	
$\geq$ 4 nodes	45	7.01	13.98	0.187 <sup>c</sup>
Tumor type				
Ductal	159	8.52	15.03	
Lobular	31	13.36	16.01	
Other	31	8.34	12.68	0.716 <sup>c</sup>
Tumor size				
pT1	62	11.88	14.42	
pT2	147	8.88	13.07	
pT3/4	50	5.94	16.86	0.014 <sup>d</sup>
Histological grade				
I	11	9.85	8.99	
II	79	9.32	15.96	
III	88	8.11	15.42	0.790 <sup>c</sup>
ER (fmol/mg protein)				
< 10	91	8.34	14.27	
$\geq$ 10	168	9.19	14.40	0.660 <sup>b</sup>
PgR (fmol/mg protein)				
< 10	108	8.40	16.37	
$\geq$ 10	152	8.97	13.46	0.671 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Due to missing values, numbers do not always add up to 263.

<sup>b</sup>*P* for Mann-Whitney U test.

<sup>c</sup>*P* for Kruskal-Wallis test.

<sup>d</sup>*P* for Spearman correlation test.

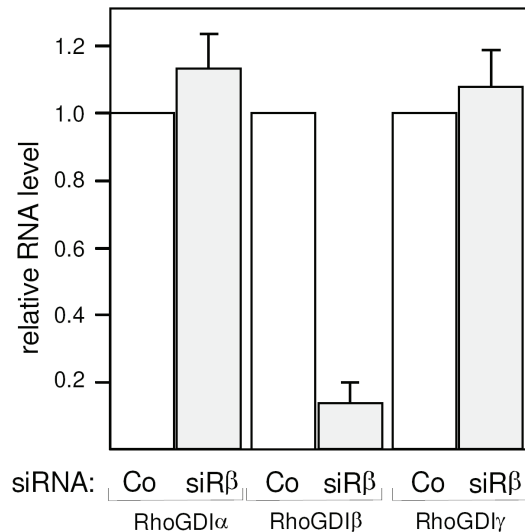
**Tab. 4.3:** Assoziation klinikopathologischer Faktoren mit den Expressionslevel von RhoGDI $\beta$

### 4.3 Mit RhoGDI $\beta$ assoziierte Gene

Zur Untersuchung der durch RhoGDI $\beta$  beeinflussten Gene wurden spezifische siRNAs hergestellt, die zur Unterdrückung der RhoGDI $\beta$ -Expression eingesetzt wird.

#### 4.3.1 Spezifität der verwendeten siRNA

RhoGDI $\beta$ -spezifische siRNA siR $\beta$  supprimiert die RhoGDI $\beta$ -Expression, ohne die Expression von RhoGDI $\alpha$  oder RhoGDI $\gamma$  zu beeinflussen. Lediglich ein unspezifischer, in den Fehlertoleranzen der Q-RT-PCR liegender Anstieg von RhoGDI $\alpha$  und RhoGDI $\gamma$  ist feststellbar, was am ehesten neben dem systemimmanenten Fehler mit einem leichten kompensatorischen Anstieg zu erklären wäre (**Abb.4.18**).



**Abb. 4.18:** Relative Expressionslevel der RhoGDIs bei Einwirken von siR $\beta$  im Vergleich zu siLuc. RhoGDI $\beta$  wird stark supprimiert. RhoGDI $\alpha$  und  $\gamma$  werden nicht in ihrer Expression beeinflusst.

#### 4.3.2 Faktoren aus der Literatur

##### Zellkultur

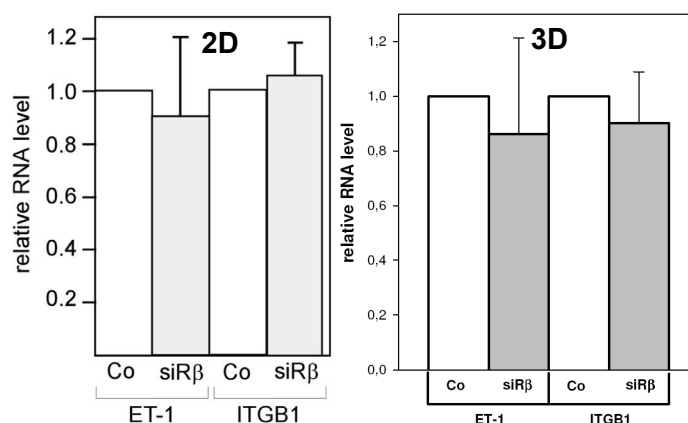
Als Ausgangspunkt der Untersuchung der durch RhoGDI $\beta$  regulierten Gene steht die Verifikation der bereits durch andere Arbeitsgruppen publizierte Daten. Je nach untersuchtem Zelltyp divergieren die Ergebnisse erheblich.

Zhang et al. [448] konnten nach Suppression der RhoGDI $\beta$ -Expression durch siRNA-exprimierende Plasmide eine Beeinflussung der Expression von Integrin  $\beta 1$  (ITGB1) in 3D-Kulturen von MDA-MB-231-Zellen nachweisen, was schließlich auch zu phänotypischen Veränderungen führte. Unter anderem schlossen die Autoren, dass RhoGDI $\beta$  zur Invasivität der Karzinomzellen beiträgt, RhoGDI $\beta$  mithin ein Tumorpromotor ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen keine signifikante Veränderung der Expression von Integrin  $\beta 1$  weder in zwei(2D)- noch in dreidimensionalen (3D) Kulturen von MDA-MB-231-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 4.19**).

Die Arbeitsgruppe um Theoduresco [123; 396] hat im Blasenkarzinom dagegen eine negative Beeinflussung der Endothelin-1-Expression durch RhoGDI $\beta$  festgestellt, was zu einer geringeren Rate an Lungenmetastasen im Mausmodell führte. RhoGDI $\beta$  ist damit im Blasenkarzinom ein Tumorsuppressor.

Im Kontrast zu diesen Befunden konnte in mit siR $\beta$  behandelten MDA-MB-231-Zellen sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultur keine signifikante Veränderung der Endothelin-1-Expression nachgewiesen werden (**Abb.4.19**).



**Abb. 4.19:** Einfluss von siR $\beta$  auf ET-1 und ITGB1 in 2D- und 3D-Kultur. Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen der Expressionslevel.

## Primäres Mammakarzinom

In den untersuchten Brustkrebsproben ist keine signifikante Korrelation zwischen RhoGDI $\beta$  und Endothelin-1 (Abb.4.20) oder Integrin  $\beta$ 1 (Abb.4.21) feststellbar.

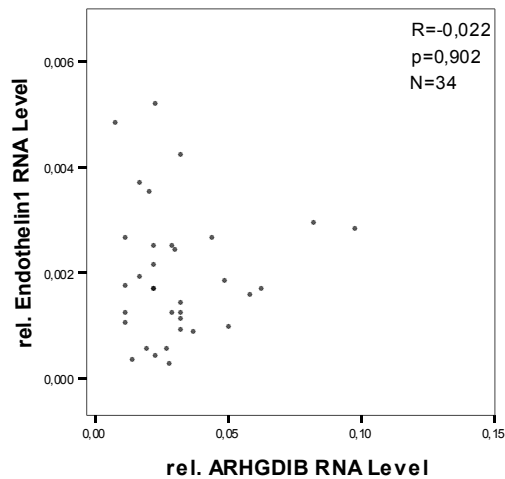


Abb. 4.20: Korrelation von ET-1 mit RhoGDI $\beta$

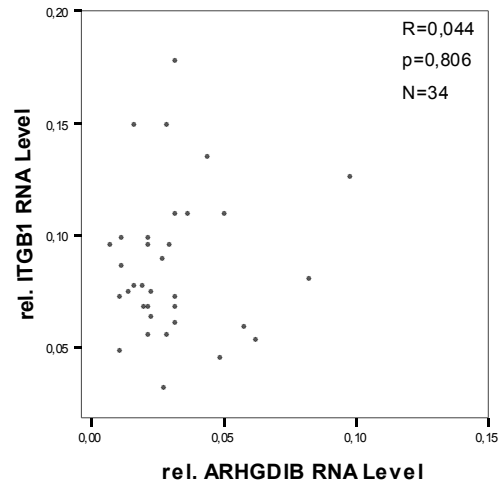


Abb. 4.21: Korrelation von ITGB1 mit RhoGDI $\beta$

### 4.3.3 cDNA-Microarray

Zur Identifikation der durch RhoGDI $\beta$  regulierten Gene wurden cDNA-Microarrays (Affymetrix HG-U133A) durchgeführt (Schunke et al. [351]). Dabei wurde die Expression von 44.928 Genen in mit siLuc behandelten MDA-MB-231-Zellen mit der in Zellen verglichen, die mit siR $\beta$  behandelt wurden. Insgesamt drei unabhängige Experimente wurden analysiert.

Es zeigt sich eine veränderte Expression von lediglich fünf Genen (Tab. 4.4), wobei drei (GTPBP9, Cox-2, COL4A2) durch siR $\beta$  in ihrer Expression verringert wurden. Zwei Gene (FLJ21424, AKAP350C) zeigten dagegen eine erhöhte Expression unter siR $\beta$ .

probe set	gene symbol	gene name	fold induction			
			exp1	exp2	exp3	average $\pm$ SD
genes downregulated in response to siR $\beta$						
201288_at	ARHGDI $\beta$	Rho GDP dissociation inhibitor $\beta$	0.03	0.10	0.13	0.09 $\pm$ 0.05
219293_s_at	PTD004	GTP binding protein 9 (GTPBP9)	0.16	0.19	0.27	0.21 $\pm$ 0.06
204748_at	PTGS2	cyclooxygenase-2 (Cox-2)	0.50	0.31	0.27	0.36 $\pm$ 0.12
211966_at	COL4A2	collagen, type IV, alpha 2	0.44	0.50	0.50	0.48 $\pm$ 0.03
genes upregulated in response to siR $\beta$						
215864_at	FLJ21424		3.70	2.50	4.90	3.70 $\pm$ 1.20
212344_at	AKAP350C	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	2.00	2.60	2.0	2.20 $\pm$ 0.35

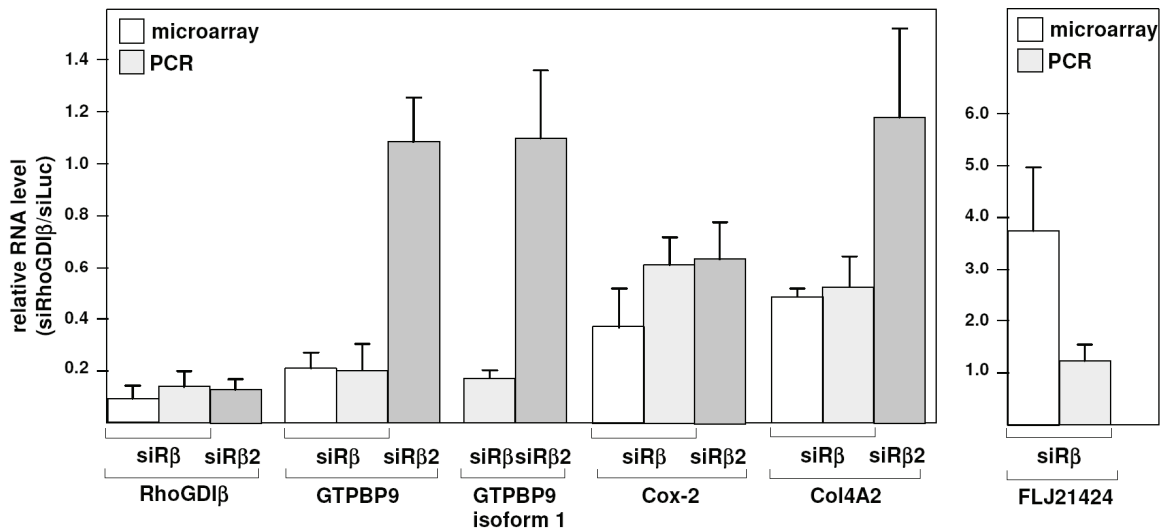
Tab. 4.4: Im Microarray durch siR $\beta$  in ihrer Expression veränderte Gene (aus Schunke et al. [351])

### 4.3.4 Verifikation mit Q-RT-PCR

Zur Verifikation der Microarray-Daten wurden die erhaltenen Gene außer AKAP350C per Q-RT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich bis auf FLJ21424 eine dem Microarray entsprechende RNA-Expression.

Um unspezifische Reaktionen der verwendeten siRNA auszuschließen, wurde nun eine zweite gegen RhoGDI $\beta$  gerichtete siRNA (siR $\beta$ 2) eingesetzt. Trotz gleich guter Unterdrückung der Expression von RhoGDI $\beta$  ist die mit siR $\beta$  bestehende Suppression von GTPBP9 und COL4A2 mit dieser siRNA nicht nachweisbar. Lediglich Cox-2

wurde durch beide siRNA in gleicher Weise beeinflusst. Damit scheint allein diese Expressionsveränderung spezifisch durch RhoGDI $\beta$  zustande zu kommen. Cox-2 wird somit zumindest zum Teil durch RhoGDI $\beta$  reguliert (Abb.4.22).

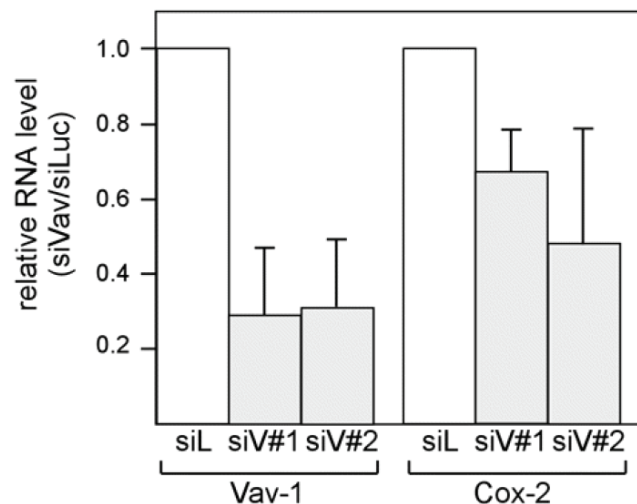


**Abb.4.22:** Verifikation der Microarray-Daten per Q-RT-PCR. Einfluss von siR $\beta$  und siR $\beta$ 2 auf die Expression von GTPBP9/isoform 1, Cox-2 und Col4A2 sowie von siR $\beta$  auf FLJ21424.

#### 4.3.5 Einfluss der Interaktion von RhoGDI $\beta$ mit Vav1 auf die Expression von Cox-2

Da Cox-2 durch RhoGDI $\beta$  reguliert wird, könnte auch Vav1 auf Cox-2 Einfluss haben, da beide zusammen NFAT regulieren können und NFAT seinerseits die Cox-2 Expression zu stimulieren vermag.

Ein wichtiger Hinweis auf die Relevanz von Vav1 für die Cox-2 Expression sind die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Versuchen mit verschiedenen siRNA gegen Vav1, siV#1 und siV#2, (Abb.4.23). Bei jeder der beiden verwendeten siRNAs war eine signifikante Beeinflussung der Expression von Cox-2 feststellbar, so dass unspezifische Effekte der siRNA ausgeschlossen werden können.

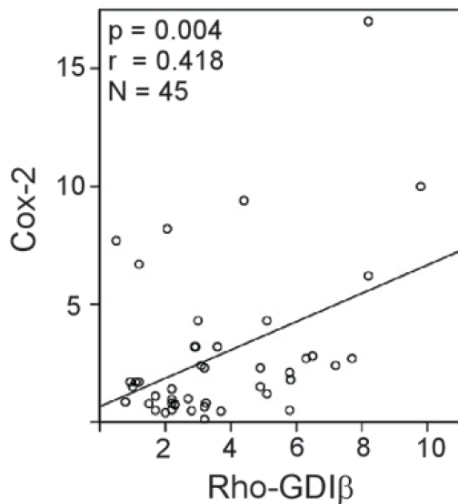


**Abb. 4.23:** Einfluss von siV#1 sowie siV#2 auf die Cox-2 mRNA-Expression.

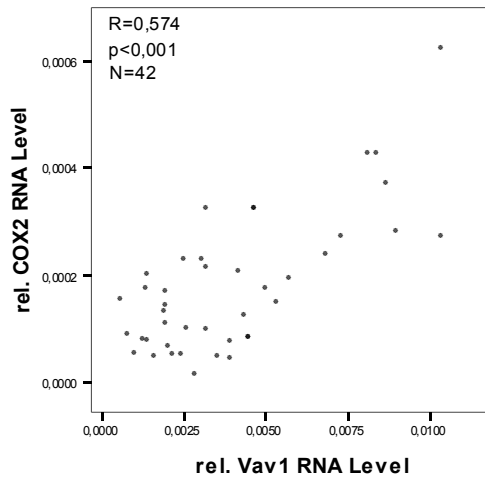
## Primäres Mammakarzinom

Die vorgenannten Ergebnisse und Zusammenhänge wurden nun an bis zu 52 Mammakarzinomproben untersucht. Die RhoGDI $\beta$ -Expression korreliert signifikant mit der von Cox-2 ( $R=0,418$ ), was die in der Zellkultur erhaltenen Daten bestätigt und für das primäre Mammakarzinom validiert (**Abb.4.24**).

Zudem korreliert Cox-2 signifikant und sogar etwas höher mit der Vav1-Expression ( $R=0,574$ ) (**Abb.4.25**), wodurch eine Interaktion von RhoGDI $\beta$  mit Vav1 zur Regulation der Cox-2-Expression möglich erscheint, wobei Vav1 möglicherweise die größere Relevanz zukommt.

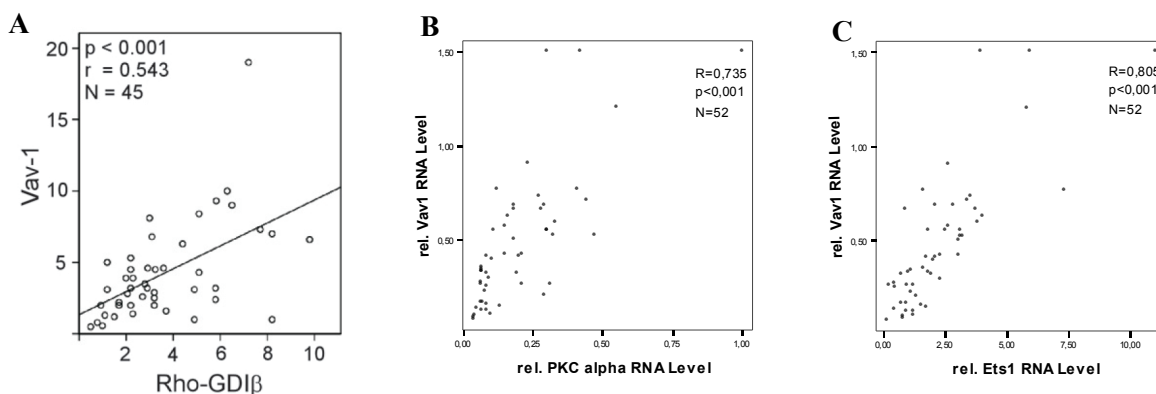


**Abb.4.24:** Korrelation von Cox-2 mit RhoGDI $\beta$



**Abb.4.25:** Korrelation von Cox-2 mit Vav1

RhoGDI $\beta$  ist erstaunlicherweise hoch signifikant ( $R=0,590$ ) mit der Expression von Vav1 korreliert. Vav1 seinerseits ist ebenso mit der Ets1- und PKC $\alpha$ -Expression hoch signifikant korreliert ( $R=0,735$  bzw.  $R=0,805$ ) (**Abb.4.26**).



**Abb.4.26:** Korrelation von Vav1 mit RhoGDI $\beta$  (A), PKC $\alpha$  (B) und Ets1 (C) beim primären Mammakarzinom.



## 4.4 Kaplan-Meier-Kurven

### 4.4.1 Vergleich des Teilkollektivs mit dem Ursprungskollektiv

Trotz der im Folgenden auftretenden Diskrepanzen hinsichtlich verschiedener Signifikanzniveaus zeigt ein Vergleich der klinikopathologischen Parameter des hier genauer untersuchten Teilkollektivs mit dem Ausgangskollektiv eine deutliche Ähnlichkeit der beiden Gruppen, so dass Unterschiede im Wesentlichen auf Zufällen beruhen und allgemein mit der niedrigen Anzahl der untersuchten Patientinnen erklärt werden können. Es zeigen sich zumeist im Teilkollektiv nur knapp signifikante Ergebnisse, die im Ursprungskollektiv keine Signifikanz mehr aufweisen. Gleichwohl könnte dies Hinweise auf einen generellen Trend nahelegen (**Tab. 4.5**).

Variable	N= 263 <sup>a</sup>		N=52 <sup>a</sup>	
Age (years)				
< 50	61	23,19%	12	23,53%
≥ 50	202	76,81%	39	76,47%
Menopausal status				
Premenopausal	67	25,48%	11	21,57%
Postmenopausal	196	74,52%	40	78,43%
Nodal category				
Negative	105	44,87%	23	46,00%
< 4 nodes	84	35,90%	14	28,00%
≥ 4 nodes	45	19,23%	13	26,00%
Tumor type				
Ductal	159	71,95%	41	80,39%
Lobular	31	14,03%	7	13,73%
Other	31	14,03%	3	5,88%

Variable	N= 263 <sup>a</sup>		N=52 <sup>a</sup>	
Tumor size				
pT1	62	23,94%	11	21,57%
pT2	147	56,76%	30	58,82%
pT3/4	50	19,31%	10	19,61%
Histological grade				
I	11	6,18%	1	3,13%
II	79	44,38%	17	53,13%
III	88	49,44%	14	43,75%
ER (fmol/mg protein)				
< 10	91	35,14%	20	40,82%
≥ 10	168	64,86%	29	59,18%
PgR (fmol/mg protein)				
< 10	108	41,54%	20	39,22%
≥ 10	152	58,46%	31	60,78%

<sup>a</sup>Due to missing values, numbers do not always add up to 263 or 52 respectively.

**Tab. 4.5:** Vergleich der klinikopathologischen Parameter des näher untersuchten Teilkollektivs (N=52) mit dem Ursprungskollektiv (N=263)

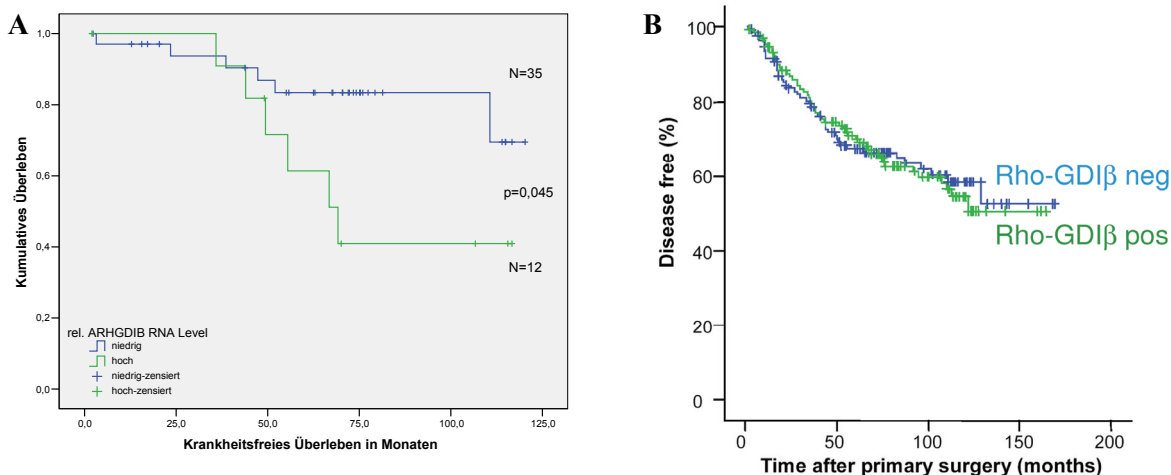
### 4.4.2 Ets1 und PKC $\alpha$

Im untersuchten Kollektiv sind, im Gegensatz zur Gesamtgruppe in der Publikation von Span et al. [375], die Expression von Ets1 und PKC $\alpha$  nicht signifikant mit dem Gesamt- oder krankheitsfreien Überleben assoziiert. Dies gilt für alle untersuchten Cut-Off-Werte.

### 4.4.3 RhoGDI $\beta$

Bei geeigneter Wahl eines Cut-Off ergibt sich im untersuchten Teilkollektiv (N=47) ein knapp signifikanter (p=0,045) Vorteil beim krankheitsfreien Überleben für eine geringere RhoGDI $\beta$ -Expression auf RNA-Ebene (**Abb.4.27 A**). Bei Adjustierung für die Tumorgroße pT ergibt sich noch eine Signifikanz von p=0,091. Die RhoGDI $\beta$ -Expression ist jedoch nicht signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert.

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei einer Analyse des Gesamtkollektivs (N=263), durchgeführt von Paul Span (Nijmegen), keinerlei Unterschied im krankheitsfreien Überleben zwischen Patientinnen mit hoher und niedriger RhoGDI $\beta$ -Expression (**Abb 4.27 B**).

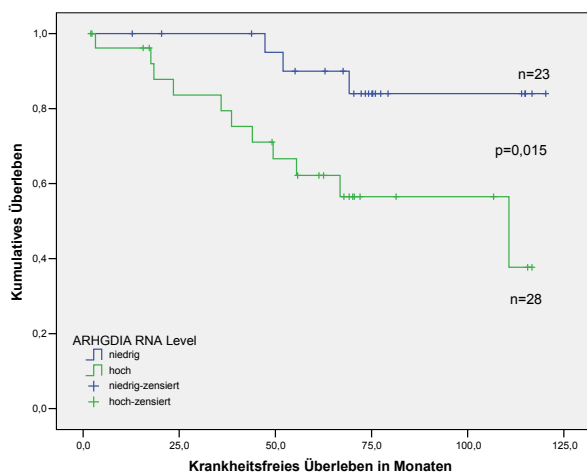


**Abb. 4.27:** Kaplan-Meier-Kurven des krankheitsfreien Überlebens in Abhängigkeit von hoher bzw. niedriger mRNA-Expression von RhoGDIβ für (A) N=47 und (B) N=263.

#### 4.4.4 RhoGDIα

Niedrige RhoGDIα-Level sind auf RNA-Ebene signifikant mit einem Überlebensvorteil hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens korreliert ( $p=0,015$ ) (Abb.4.28). Auch hier zeigt sich immunhistochemisch eine gegenteilige Tendenz (Daten H. Ronneburg). Im Gegensatz zu RhoGDIβ bleibt bei RhoGDIα auch nach Adjustierung für pT dieser Unterschied in der Prognose signifikant ( $p=0,025$ ) erhalten. Allerdings ist auch bei RhoGDIα kein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben feststellbar.

Im Gesamtkollektiv zeigte sich dagegen kein Unterschied im Überleben, jedoch eine signifikante Korrelation mit dem Nodalstatus sowie positivem ER- und PR-Status (Tab. 4.6).



**Abb. 4.28:** Kaplan-Meier-Kurven des krankheitsfreien Überlebens in Abhängigkeit von hoher bzw. niedriger mRNA-Expression von RhoGDIα.

Variable	N= 239 <sup>a</sup>	Median (ARGDHIA/HPRT)	P
Age (years)			
< 50	56	20.26	
≥ 50	187	20.68	0.456 <sup>b</sup>
Menopausal status			
Premenopausal	64	19.17	
Postmenopausal	179	20.97	0.310 <sup>b</sup>
Nodal category			
Negative	92	14.23	
< 4 nodes	80	21.63	
≥ 4 nodes	42	25.02	<0.001 <sup>c</sup>
Tumor type			
Ductal	145	18.51	
Lobular	28	22.63	
Other	27	22.00	0.300 <sup>c</sup>
Tumor size			
pT1	58	19.24	
pT2	134	20.82	
pT3/4	47	20.53	0.887 <sup>c</sup>
Histological grade			
I	11	21.79	
II	72	19.24	
III	84	19.90	
unknown	76	20.97	0.867 <sup>c</sup>
ER (fmol/mg protein)			
< 10	86	22.79	
≥ 10	153	18.90	0.039 <sup>b</sup>
PgR (fmol/mg protein)			
< 10	105	23.10	
≥ 10	135	18.64	0.012 <sup>b</sup>

**Tab. 4.6:** Assoziation klinikopathologischer Faktoren mit den Expressionslevel von RhoGDIα

<sup>a</sup>Due to missing values, numbers do not always add up to 280.  
<sup>b</sup>P for Mann-Whitney U test ; <sup>c</sup>P for Kruskal-Wallis test.

#### 4.4.5 Endothelin-1 und Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptor

Hohe Endothelin-1 RNA Level sind mit einem signifikant ( $p=0,029$ ) schlechteren krankheitsfreien Überleben assoziiert als niedrige (Abb.4.29). Nach Adjustierung für pT verliert sich die Signifikanz. Es zeigt sich auch hier wiederum kein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben.

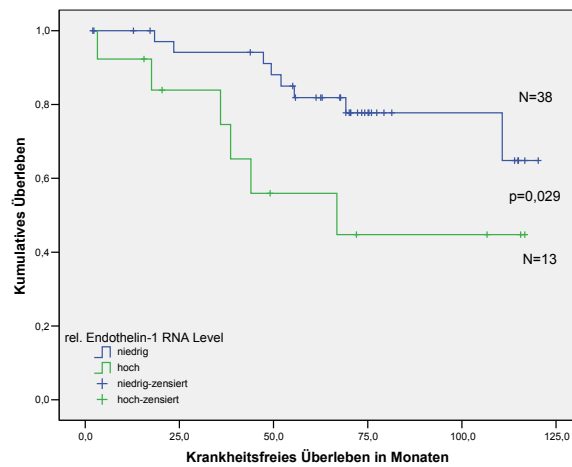


Abb. 4.29: Kaplan-Meier-Kurven des krankheitsfreien Überlebens in Abhängigkeit von hoher bzw. niedriger mRNA-Expression von Endothelin-1.

Die RNA-Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors ist dagegen nicht signifikant mit dem krankheitsfreien oder dem Gesamtüberleben verbunden (Abb.4.30).

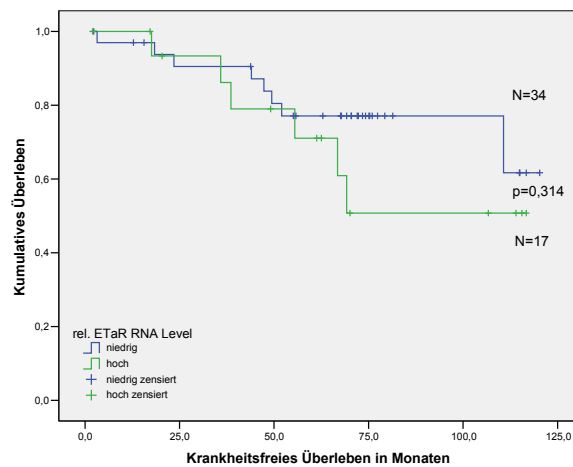
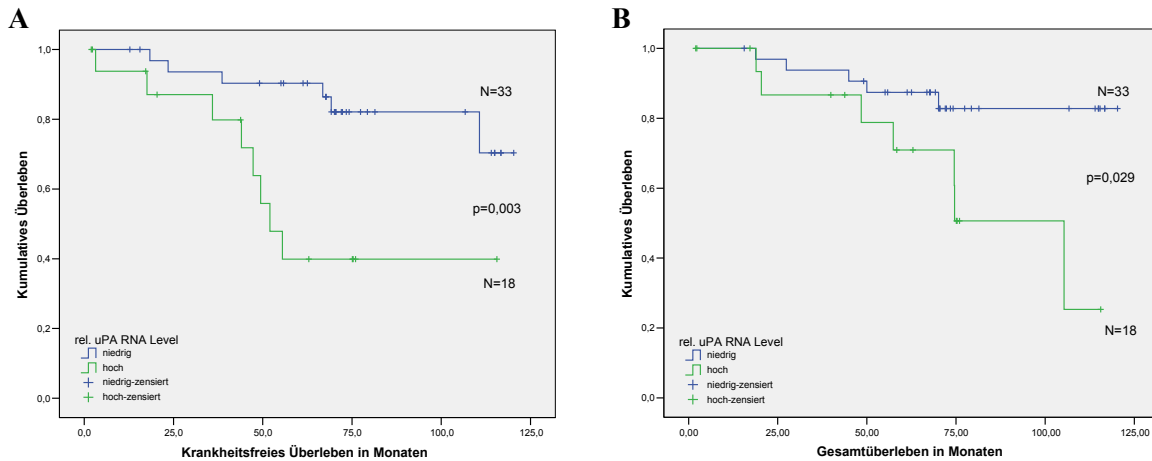


Abb. 4.30: Kaplan-Meier-Kurven des krankheitsfreien Überlebens in Abhängigkeit von hoher bzw. niedriger mRNA-Expression von ET<sub>A</sub>R.

#### 4.4.6 uPA

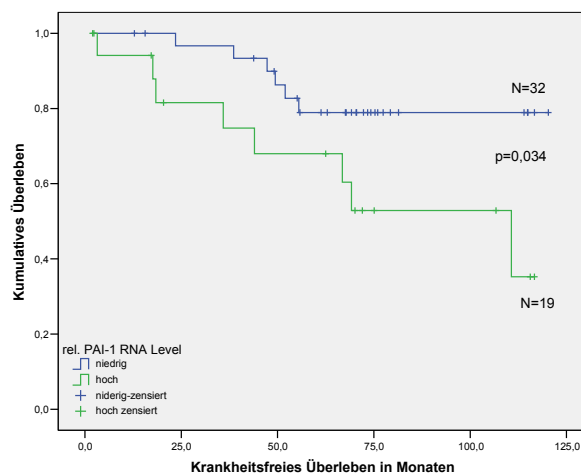
Eine niedrige uPA-Expression bedingt auf RNA-Ebene einen signifikanten Überlebensvorteil hinsichtlich des krankheitsfreien ( $p=0,003$ ), wie auch des Gesamtüberlebens ( $p=0,029$ ) (**Abb.4.31**). Bei Adjustierung für die Tumorgöße (T) ergibt sich für das krankheitsfreie Überleben eine Signifikanz von  $p=0,006$ , hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigt sich dabei jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen hoher und niedriger uPA-Expression.



**Abb. 4.31:** Kaplan-Meier-Kurven des krankheitsfreien Überlebens (**A**) und des Gesamtüberlebens (**B**) in Abhängigkeit von hoher bzw. niedriger mRNA-Expression von uPA.

#### 4.4.7 PAI-1

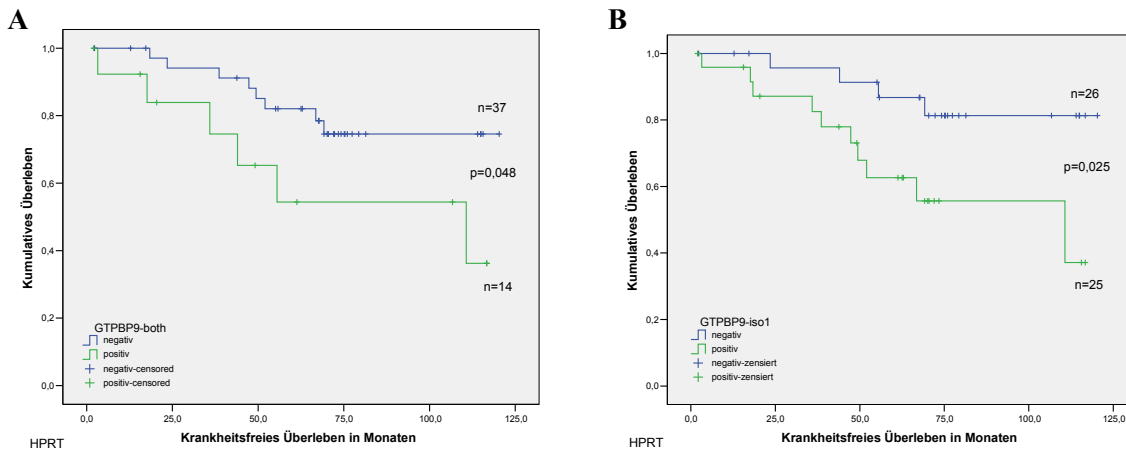
Auch bei der RNA-Expression von PAI-1 zeigt sich ebenso wie bei uPA ein signifikanter Unterschied ( $p=0,034$ ) in den krankheitsfreien Überlebenskurven zwischen hoher und niedriger Expression, wobei letztere einen Überlebensvorteil erkennen lässt (**Abb.4.32**). Andererseits ist nach Adjustierung für pT sowie beim Gesamtüberleben keine Signifikanz feststellbar.



**Abb. 4.32:** Kaplan-Meier-Kurven des krankheitsfreien Überlebens in Abhängigkeit von hoher bzw. niedriger mRNA-Expression von PAI-1.

#### 4.4.8 GTP Binding Protein 9 und GTPBP9 Isoform 1

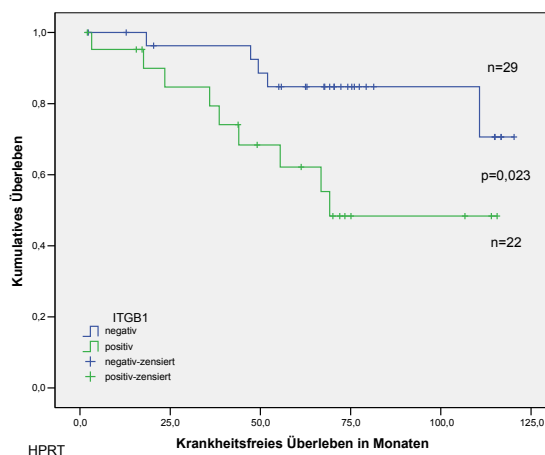
Auch die Expression der durch eine unspezifische Reaktion auf die verwendete siR $\beta$  aufgefallenen Faktoren GTP Binding Protein 9 und dessen Isoform 1 zeigt hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens signifikante Unterschiede. Eine niedrige Expression beider Isoformen ist knapp signifikant mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert ( $p=0,048$ ) (**Abb.4.33 A**). Dieser Unterschied wird bei der ebenfalls untersuchten Isoform 1 noch etwas deutlicher ( $p=0,025$ ) (**Abb.4.33 B**). Zur Allgemeingültigkeit dieser Befunde kann aufgrund der geringen Fallzahl keine Aussage gemacht werden. Die Relevanz der Funktion von GTPBP9 ist noch gänzlich unbekannt.



**Abb. 4.33:** Kaplan-Meier-Kurven des krankheitsfreien Überlebens in Abhängigkeit von hoher bzw. niedriger mRNA-Expression von GTPBP9/Isoform1 und 2 (**A**) bzw. GTPBP9 Isoform 1 (**B**).

#### 4.4.9 Integrin $\beta 1$

Integrin  $\beta 1$  (ITGB1) scheint einen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben zu haben. Eine hohe ITGB1-Expression führt zu einer signifikant ( $p=0,023$ ) schlechteren Prognose als eine niedrigere (**Abb.4.34**). Wiederum einschränkend ist dabei die geringe Zahl der untersuchten Proben.

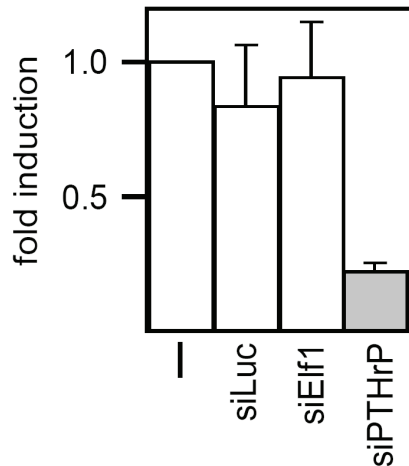


**Abb. 4.34:** Kaplan-Meier-Kurven des krankheitsfreien Überlebens in Abhängigkeit von hoher bzw. niedriger mRNA-Expression von ITGB1.

## 4.5 PTHrP und PTH1R

### 4.5.1 Spezifität von siPTHrP

Zur Untersuchung der Funktion von PTHrP in MDA-MB-231-Zellen wurde eine spezifische siRNA hergestellt, die zu einer ca. 4-5 fachen Abnahme der PTHrP-mRNA-Expression führte. Die zum Vergleich eingesetzten Kontroll-siRNAs gegen Luciferase (siLuc) oder Elf1 (siElf1) zeigten keinen solchen Effekt (**Abb.4.35**).

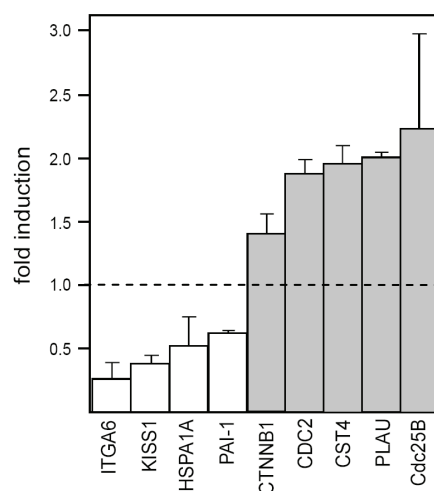


**Abb. 4.35:** Suppression von PTHrP durch siPTHrP in MDA-MB-231-Zellen. siLuc und siElf zeigen keinen Effekt.

Anschließend wurde von drei unabhängigen Experimenten von jeweils mit siPTHrP oder siLuc behandelten MDA-MB-231-Zellen eine Microarray-Analyse mit Hilfe von Affymetrix HG-U133A Chips durchgeführt, wobei 44.928 Gene hinsichtlich ihrer Expression untersucht werden, die eine Veränderung der Expression von über 200 Genen erbrachte [83].

### 4.5.2 Verifikation in der Zellkultur

Einige ausgewählte Gene wurden hinsichtlich ihrer Relevanz im Detail untersucht. Dazu wurden die Microarray-Daten per Q-RT-PCR validiert.



**Abb. 4.36:** Induktion bzw. Suppression ausgewählter Gene durch siPTHrP in MDA-MB-231-Zellen

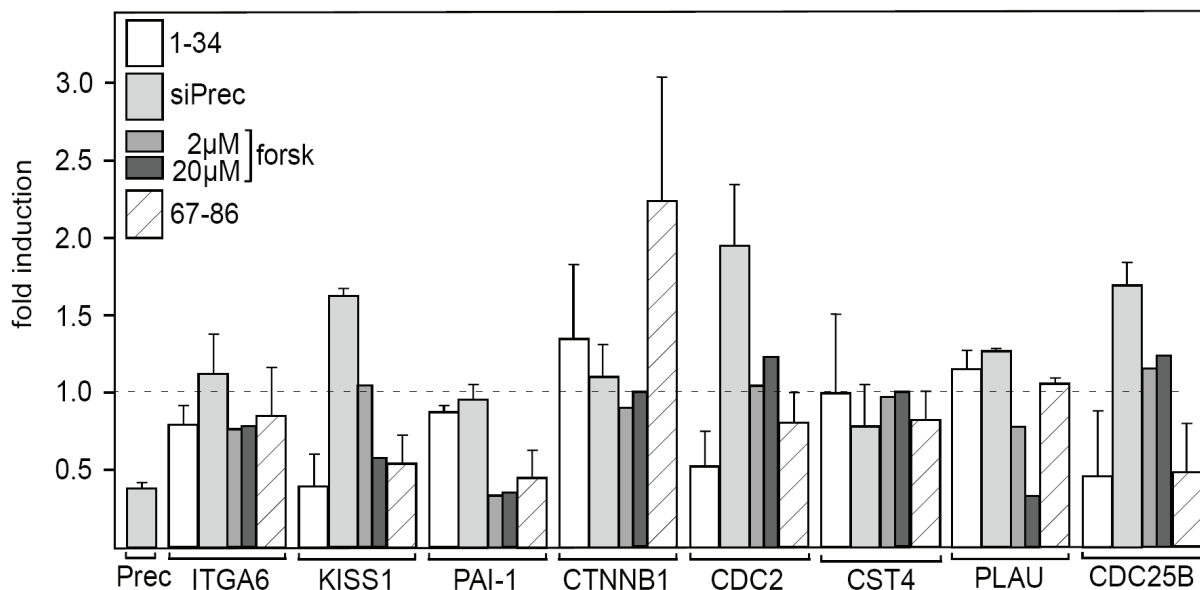
Die Q-RT-PCR bestätigte in allen untersuchten Genen die im Microarray erhaltenen Daten. Von den vier durch siPTHrP im Microarray vermehrt exprimierten Zellzyklusregulatoren Cdc2, Cdc25B, GRCC8 (Tome-1) und CKS2

wurden Cdc2 und Cdc25B näher untersucht. Die weiteren untersuchten Gene spielen für die Tumorprogression eine Rolle. Zu diesen gehören Integrin  $\alpha 6$  (ITGA6), Catenin  $\beta 1$  (CTNNB1), KISS-1, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und uPA (PLAU) (**Abb.4.36**).

#### 4.5.3 PTHrP beeinflusst die Genexpression über verschiedene Signalwege

Zur Untersuchung der Mechanismen, mit denen PTHrP die Expression der untersuchten Gene beeinflusst, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen wurde der Einfluss des Parathormonrezeptors (PTH1R) analysiert, der auch von PTHrP aktiviert wird. Dieser wird spezifisch durch das PTHrP Peptid 1-34 aktiviert. Durch eine spezifische siRNA gegen PTH1R (siPrec) wurde die Expression des Rezeptors vermindert. Zudem wurden Versuche mit Forskolin durchgeführt, welches die Adenylatzyklase aktiviert, um zu eruieren, ob PTHrP über den PTH1R den Protein-Kinase-A/cAMP-Signalweg nutzt [305]. Ein PTHrP-Peptid, welches die Mittelregion (67-86) repräsentiert, wurde eingesetzt, um PTH1R-unabhängige Funktionen von PTHrP zu ergründen [293] (**Abb.4.37**).

Cdc2, Cdc25B und KISS-1 wurden bei Einwirkung von PTHrP(1-34) ca. zweifach herunterreguliert. Wohingegen durch die Suppression von PTH1R durch siPrec die mRNA-Menge dieser Gene erhöht wurde. Damit reagieren Cdc2 und Cdc25B auf siPrec genauso wie in Zellen, die mit siPTHrP behandelt wurden, was nahe legt, dass PTHrP diese Gene zumindest zum Teil über den PTH1 Rezeptor reguliert. Hinsichtlich KISS-1 hat siPTHrP einen umgekehrten Effekt als siPrec oder PTHrP(1-34). Möglicherweise sind andere, durch PTHrP beeinflusste Signalwege daran beteiligt, den PTH1R-abhängigen Effekt aufzuheben. Weder 2 noch 20 $\mu$ M Forskolin hatten einen Einfluss auf Cdc2 oder Cdc25B und KISS-1 wurde nur von hohen Forskolinkonzentrationen in seiner Expression verändert, was vermuten lässt, dass Cdc2 und Cdc25B nicht über einen PKA/cAMP-Signalweg durch PTH1R beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu reagierten PAI-1 und uPA auf Forskolin, nicht jedoch auf PTHrP(1-34) oder siPrec, was zeigt, dass cAMP-abhängige Signalwege für die via PTH1R vermittelten Effekte des PTHrP auf die Genexpression in MDA-MB-231-Zellen nicht relevant sind. PTHrP(67-86) supprimierte die Expression von KISS-1, Cdc25B, PAI-1 und CTNNB1 in gleicher Weise wie siPTHrP mit Ausnahme von Cdc25B.



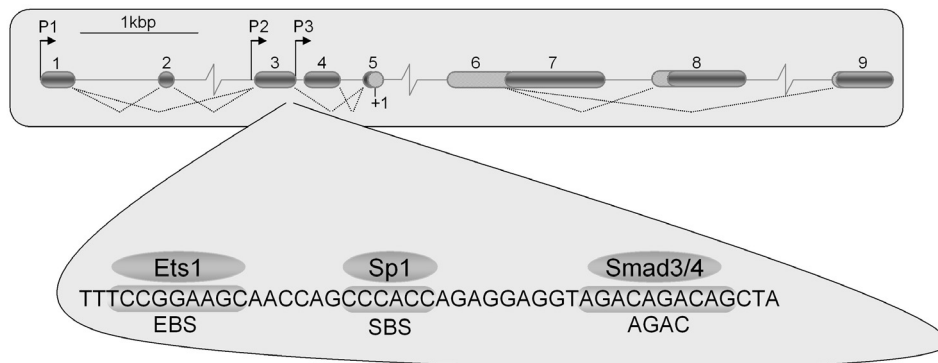
**Abb. 4.37:** Einfluss von siPrec, PTHrP(1-34), PTHrP(67-86) sowie Forskolin (2 $\mu$ M bzw. 20mM) die mRNA-Expression ausgewählter Gene in MDA-MB-231-Zellen

Damit scheint PTHrP die Genexpression in MDA-MB-231-Zellen auf mindestens drei Wegen zu beeinflussen:

1. PTH/PTHrP-Rezeptor abhängig
2. abhängig vom PTHrP-Peptid PTHrP(64-86)
3. abhängig von PTHrP-Mittelregion (unabhängig von PTH1R und PTHrP(67-86)-Peptid)

#### 4.5.4 Einfluss von PTHrP auf die Genexpression in Brustkrebsproben

In 50 Brustkrebsproben wurde die Expression von ITGA6, Cdc2, Cdc25B, CTNNB1, HSPA1A, PAI-1 und uPA bestimmt. Um die Qualität der so erhaltenen Daten zu verifizieren, wurden zudem die Produkte aller PTHrP Promotoren (Exon 6) mit den Transkripten von Exon 3 und Exon 4 verglichen. Exon 3 wird durch Promotor P1/2, Exon 4 durch Promotor P3 exprimiert. P2 und P3 sind die hauptsächlich aktivierten Promotoren von PTHrP [85; 318]. Der P3-Promotor trägt in MDA-MB-231-Zellen 25% der PTHrP-Transkripte bei, was sich unter TGFβ-Einfluss auf 55-75% erhöht [237]. Der P3-Promotor enthält Bindungsstellen für Ets1, welches den Promotor allein nur schwach aktivieren kann, für die TGFβ-Effektoren Smad3/4 sowie für Sp-1, die synergistisch wirken können [86] (**Abb. 4.38**).

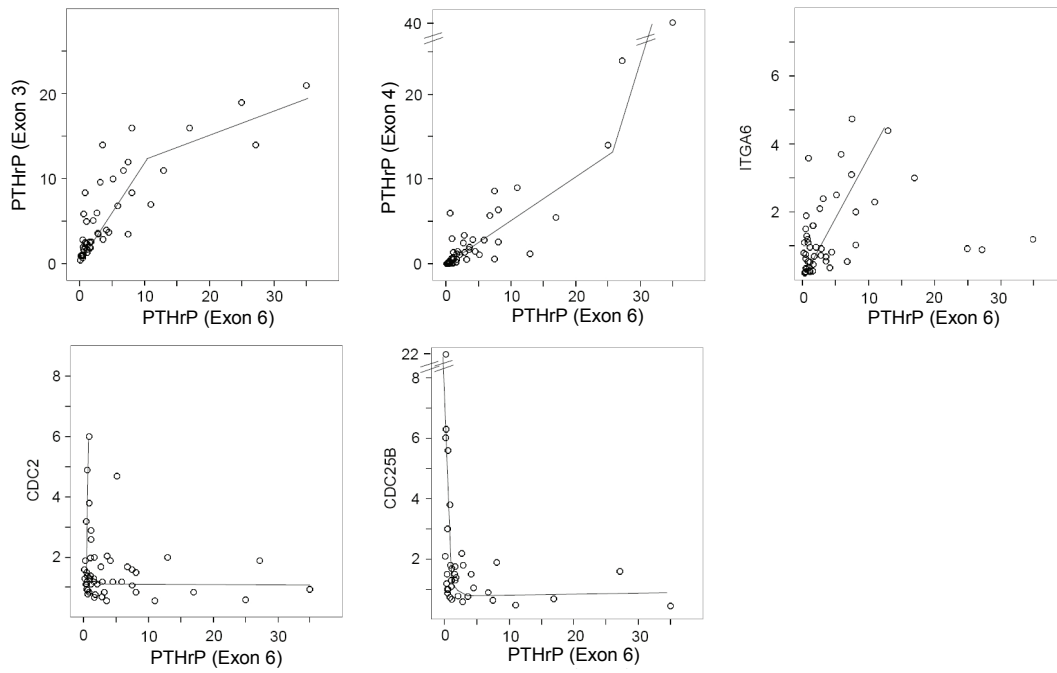


**Abb.4.38:** Aufbau des menschlichen PTHrP-Gens. Die nummerierten Kästchen stehen für Exons. Kodierende Regionen enthalten zusätzlich einen dunklen Streifen. Der Startpunkt der Translation ist mit +1 gekennzeichnet. Splicing-Ereignisse werden durch Linien repräsentiert. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt eine regulatorische Region innerhalb des P3-Promotors. Beispiele für Transkriptionsfaktoren, die an diese Region binden können sind eingezeichnet (aus [86]).  
AGAC = binding motif for Smad proteins, EBS = Ets binding site, SBS = binding site for Sp-like factors.

Beide promotorspezifischen Transkripte korrelieren gut mit der Menge aller PTHrP-Transkripte. Bei hoher Expression von PTHrP scheint jedoch der P3-Promotor tendenziell zu dominieren. Die Expression von ITGA6 korreliert mit PTHrP, wenn die drei Proben mit der höchsten PTHrP-Expression außer acht gelassen werden, die nur eine geringe ITGA6-Expression aufweisen. Dies bestätigt die Daten der Zellkultorexperimente mit siPTHrP, die eine Suppression von ITGA6 ergab. Die Expression von Cdc2 und Cdc25B ist über weite Bereiche der PTHrP-Expression konstant, eine hohe Expression dieser beiden Faktoren findet sich jedoch nur bei sehr geringer PTHrP-Expression. Dies steht im Einklang mit dem in MDA-MB-231-Zellen erbrachten Nachweis, dass PTHrP die Expression von Cdc2 und Cdc25B unterdrückt. Die anderen untersuchten Gene zeigen keine Assoziation mit der PTHrP-Expression was durch andere, überlagernde Effekte oder auch die zu geringe Fallzahl begründet sein mag. Auch spezifische Eigenarten der MDA-MB-231-Zellen könnten eine Erklärung für diese Diskrepanz sein (**Abb.4.39**).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Expression von Cdc2, Cdc25B und ITGA6 im primären Mammakarzinom von PTHrP beeinflusst wird.





**Abb.4.39:** Korrelation von PTHrP Exon 6 (alle Promotoren) mit den Transkripten von Exon 3 (Promotor P1 und P2), von Exon 4 (Promotor P3) sowie mit ITGA6, Cdc2 und Cdc25B beim primären Mammakarzinom.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bestimmung der Ets1-abhängigen Genregulation im primären Mammakarzinom

Lindemann et al. [238] konnten zeigen, dass die Expression und Aktivität von Ets1 durch PKC $\alpha$  beeinflusst wird. Diese Ergebnisse wurden bisher nicht am primären Mammakarzinom validiert. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Expression von PKC $\alpha$  mit der von Ets1 auf mRNA-Ebene korreliert, was die Daten der Zelllinie MDA-MB-231 bestätigt. Dies ist ein wesentlicher Hinweis darauf, dass dieser kausale Zusammenhang nicht nur in dieser Zelllinie besteht, sondern allgemein im Brustkrebs von entscheidender Relevanz ist. Aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Proben konnte jedoch kein Einfluss von Ets1 auf das Überleben festgestellt werden, obwohl dies im Ursprungskollektiv gelang [375].

In einer Vorarbeit zu vorliegender Studie wurden per cDNA-Microarray diverse Gene identifiziert, die durch Ets1 bzw. PKC $\alpha$  in ihrer Expression verändert wurden [413]. Diese Daten waren mit Hilfe von MDA-MB-231-Zellen erarbeitet worden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu überprüfen, inwieweit diese Ergebnisse auf die Biologie des primären Mammakarzinoms übertragbar sind. Dazu wurden 52 Proben des primären Mammakarzinoms auf die mRNA-Expression dieser Faktoren hin untersucht. Viele der gefundenen Faktoren korrelieren auch beim primären Mammakarzinom mit Ets1 und PKC $\alpha$ , bei anderen wiederum gelang dieser Nachweis nicht.

Anhand von MDA-MB-231-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass NAD(P)H:Ubichinon Oxidoreductase 1 (NQO1), Matrix-Metallo-Proteinase 9 (MMP9) und RhoGDI $\beta$  durch Ets1 positiv reguliert werden. Diese Gene stehen im Verdacht, an der Tumorprogression beteiligt zu sein.

NQO1 ist an der Degradation von p53 beteiligt, stabilisiert jedoch mutiertes p53 [12], wie es auch in MDA-MB-231-Zellen vorkommt, wo es zusammen mit Ets1 das Multi-Drug-Resistance-Protein MDR1 induziert [342]. Ein Polymorphismus von NQO1 wird mit einer erhöhten Rate von Bronchialkarzinomen in Verbindung gebracht [385]. Im primären Mammakarzinom korreliert seine Expression hochsignifikant mit der von Ets1, so dass der in der Zellkultur gewonnene Befund eines funktionellen Zusammenhangs von NQO1 und Ets1 auch allgemein auf das Mammakarzinom angewendet werden kann.

MMP9 wird in der Zellkultur von MDA-MB-231-Zellen von Ets1 in seiner Expression heraufreguliert, was mit Daten von Behrens et al. [23] übereinstimmt. Im Gegensatz dazu war keine Korrelation zwischen der Expression von Ets1 und MMP9 im primären Mammakarzinom festzustellen, obwohl in der Promotorregion von MMP9 eine Ets-Binding site nachgewiesen wurde [23]. Offenbar sind an der Regulation von MMP9 noch andere Faktoren beteiligt, die den Einfluss von Ets1 in den Hintergrund treten lassen.

Die etablierten Tumorsuppressorgene Transforming Growth Factor  $\beta$ 2 (TGFB2), Insulin induced Gene 1 (INSIG-1) und Diaphanous homolog 1 (DIAPH1) werden in MDA-MB-231-Zellen negativ von Ets1 reguliert. Im primären Mammakarzinom zeigte sich eine überraschende Konstellation. TGFB2 und DIAPH1 waren signifikant positiv mit der Ets1-Expression korreliert, während INSIG1 keinen signifikanten Zusammenhang mit der Ets1-Expression zeigte.

TGF $\beta$ 2 verhindert den G<sub>2</sub>/S-Übergang im Rahmen der Mitose, indem es CDK4 herunterreguliert und die für den Kernexport notwendige Phosphorylierung des Mitoseinhibitors p27<sup>Kip1</sup> verhindert [211]. Andererseits inhibiert TGF $\beta$ 2 die TNF $\alpha$ -bedingte Apoptose von Prostatakarzinomzellen, indem es NF $\kappa$ B aktiviert [247].

INSIG-1 ist ein Protein der Cholesterinhomeostase der Zelle [186]. CpG-Islands in der Promotorregion des INSIG-1-Gens sind in der Mehrzahl der von Kaneda et al. [198] untersuchten Magenkarzinome methyliert, wodurch auch die mRNA-Expression herabgesetzt ist. Damit könnte INSIG-1 ein möglicher Tumorsuppressor sein.

DIAPH1 treibt die Aktinpolymerisation voran und ist ein Effektor von RhoA [339]. Es stabilisiert Adherens Junctions und vermindert somit die Motilität der Brustkrebszellen [339]. Gründe für die Diskrepanz zwischen den Befunden aus der Zellkultur und dem primären Mammakarzinom können Eigenarten der verwendeten Kultursysteme sein, da eine zweidimensionale Kultur nicht unbedingt die realen Bedingungen im Mammakarzinom wiedergibt. Andererseits kann dies durch das heterogene Patientenkollektiv bedingt sein, welches verschiedene Entwicklungsstadien des Tumors umfasste, in denen die Regulation von DIAPH1 unter anderen Bedingungen stattfand als in der Zellkultur. Letztlich kann diese Korrelation auch auf Zufall beruhen, da eine Kausalität nicht nachweisbar ist.

Sp100 wurde durch siEts1 negativ beeinflusst. Dies wird im primären Mammakarzinom bestätigt, da sich hier eine hochsignifikante Korrelation von Sp100 mit Ets1 zeigt. Sp100 ist ein Modulator der Ets1-Aktivität [441] und colokalisiert mit PML in nuclear bodies [341], deren Zahl wiederum durch Ets1 reguliert wird [441]. Sp100 inhibiert die Ets1-abhängige Expression von MMP1 [441]. Somit reguliert Ets1 selbst seine Aktivität, indem es seinen Inhibitor vermehrt exprimiert.

RUNX1 wird in der Zellkultur unter siEts1 vermehrt exprimiert, dagegen zeigt sich im primären Mammakarzinom eine signifikante positive Korrelation von RUNX1 mit Ets1. RUNX1, oder AML1, ist ein Runt Domain Transkriptionsfaktor [180] und ist in der Embryonalentwicklung für die Angiogenese von herausragender Bedeutung [181] sowie am epigenetischen Gensilencing beteiligt [180]. RUNX1/AML wird in vielen Fällen der akuten myeloischen Leukämie transloziert [180]. RUNX1 besitzt in seiner Promotorregion eine Ets-Bindungsstelle und wird somit direkt von Ets1 reguliert [122]. Interessanterweise benötigt RUNX1 weitere transkriptionelle Koaktivatoren, zu denen auch Ets1 gehört [303]. RUNX1 bindet zudem an den Promotor von E-Cadherin, welches im primären Mammakarzinom geringer exprimiert wird [242].

Insgesamt muss festgestellt werden, dass sich der Einfluss von Ets1 für einige Gene nachweisen ließ, für andere jedoch nicht. Die spezielle Biologie der MDA-MB-231-Zellen kann eine Erklärung für diese Diskrepanz bieten, da diese Zelllinie ER/PR-negativ, Her2/neu-positiv und high Grade ist und somit den im unausgelesenen Patientenkollektiv viel höheren Anteil von ER/PR-positiven Karzinomen mit teils niedrigerem Grading nicht adäquat repräsentiert.

## 5.2 Relevanz der Expression von RhoGDI $\alpha$ beim primären Mammakarzinom

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte RhoGDI $\alpha$  mRNA-Expression signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert ist. Aufgrund der geringen Fallzahl des hier untersuchten Kollektivs kann die erlangte Signifikanz auf Zufall beruhen. Im Ursprungskollektiv konnte hingegen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von RhoGDI $\alpha$  und dem krankheitsfreien oder Gesamtüberleben festgestellt werden. In der parallel zu dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Studie (Daten H. Ronneburg) an einem anderen Kollektiv konnte dagegen nachgewiesen werden, dass eine hohe RhoGDI $\alpha$ -Expression signifikant mit einer besseren Prognose verbunden ist.

Andererseits existieren Hinweise, dass eine hohe RhoGDI $\alpha$ -Expression zu einer vermehrten Chemotherapieresistenz gegenüber Etoposid und Doxorubicin [445] bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 bzw. gegenüber Busulfan und Doxorubicin bei der Nierenzellkarzinomzelllinie HEK-293 führt [314]. In der Zelllinie H157 des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) führt RhoGDI $\alpha$  zu einer Paclitaxel-Resistenz [250]. Die Überexpression von RhoGDI $\alpha$  schützt Karzinomzellen vor Apoptose [89], indem es die „Caspase Cleavage Sites“ von Rac1 vollständig verdeckt [134]. Eine Spaltung von Rac1 ist jedoch für eine Apoptose notwendig [446], um den

antiapoptotischen Effektor von Rac1, die Bad-Kinase [447], zu eliminieren. Auch Cdc42 wird auf diese Weise durch RhoGDI $\alpha$  vor Caspase3-abhängiger Degradation geschützt [89].

Blackhall et al. [31] konnten eine erhöhte RhoGDI $\alpha$ -Expression beim NSCLC mit einer ungünstigeren Prognose assoziieren. RhoGDI $\alpha$  ist in chemotherapieresistenten malignen Melanomzellen [308; 369] wie auch Ovarialkarzinomzellen [127] stark exprimiert. Im invasiven Ovarialkarzinom ist RhoGDI $\alpha$  etwa vierfach höher exprimiert als im Borderline-Ovarialkarzinom oder normalem Ovarialgewebe [191]. Erhöhte Werte finden sich auch im Vergleich zum Normalgewebe beim primären Mammakarzinom und Brustkrebszelllinien [118; 174]. Unklar ist, ob diese Effekte auch durch RhoGDI $\beta$  hervorgerufen werden können.

Im Kontrast dazu, aber in Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Untersuchungen von H. Ronneburg, haben Untersuchungen von Jiang et al. [188] gezeigt, dass eine geringe RhoGDI $\alpha$ -Expression zu einer ungünstigeren Prognose beim Brustkrebs führt. Dies steht im Einklang mit der allgemeinen Funktion von RhoGDIs, nämlich der Inhibition der Migration, was eine Metastasierung hemmen könnte. Welche dieser Befunde schließlich zutrifft kann jedoch auch vom jeweiligen Tumor selbst und seiner nächsten Umgebung (Tumor-„microenvironment“) zusammenhängen. Weitere Forschung zur Aufklärung dieser Diskrepanz ist notwendig. So ist es beispielsweise möglich, dass die RNA-Werte nicht mit der Proteinkonzentration korrelieren, die jedoch für die Funktion des Proteins maßgeblich ist.

### 5.3 Bedeutung von RhoGDI $\beta$

RhoGDI $\beta$  und RhoGDI $\alpha$  sind RhoGDIs, welche im primären Mammakarzinom trotz gleicher biologischer Funktion den Krankheitsverlauf unterschiedlich zu beeinflussen scheinen.

RhoGDI $\beta$  wird im Mammakarzinom von PKC $\alpha$  bzw. Ets1 reguliert. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals in Zellkultur von MDA-MB-231-Zellen und diverser anderer Zelllinien nachgewiesen werden. RhoGDI $\beta$  korreliert zudem hochsignifikant auch im primären Mammakarzinom mit PKC $\alpha$  und Ets1. Einige andere Faktoren, die in der Microarray-Analyse von Vetter et al. [413] gefunden wurden, scheinen MDA-MB-231-zellspezifisch von Ets1 reguliert zu sein. Im primären Mammakarzinom ergibt sich dagegen bei diesen Faktoren keine Korrelation mit Ets1. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Kontrolle der in der Zellkultur gefundenen Regulationsmechanismen auf ihre tatsächliche Relevanz im primären Mammakarzinom.

Durch Chromatin-Immuno-Precipitation (ChIP) konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine funktionelle Ets1-Bindungsstelle in der Promotorregion von RhoGDI $\beta$  nachgewiesen werden. Die Transkription von RhoGDI $\beta$  wird demzufolge direkt durch Ets1 reguliert. Dies konnte in der Zellkultur per siRNA gegen Ets1 wie auch anhand der Korrelation beider Faktoren im primären Mammakarzinom bestätigt werden. Dagegen korreliert RhoGDI $\beta$  nicht mit der Expression von Esx oder Ets2. Damit scheint RhoGDI $\beta$  hochspezifisch durch Ets1 beeinflusst zu werden, so dass die beiden anderen, mit Ets1 eng verwandten Ets-Faktoren keinen Zusammenhang mit der Expression von RhoGDI $\beta$  erkennen lassen. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass Ets1 als etablierter Tumorpromotor [87; 413] ein seiner Funktion nach die Migration inhibierendes Protein [89] positiv beeinflusst. Demnach müssen zusätzliche, bisher unbekannte Eigenschaften und Funktionsweisen von RhoGDI $\beta$  existieren, die für eine Tumorprogression vorteilhaft sind.

Zur weiteren Analyse der Funktion von RhoGDI $\beta$  im Mammakarzinom wurde eine siRNA entworfen, die spezifisch RhoGDI $\beta$  supprimiert, nicht jedoch RhoGDI $\alpha$  oder RhoGDI $\gamma$ . Die Spezifität wurde per Q-RT-PCR verifiziert. Damit können alle weiteren Ergebnisse, die durch Transfektionsexperimente mit siR $\beta$  gewonnen werden, als spezifisch für RhoGDI $\beta$  angesehen werden.

Zunächst wurden bereits vorliegende Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen untersucht.

Zhang et al. [448] haben in Experimenten an MDA-MB-231-Zellen die permanente Suppression von RhoGDI $\beta$  mit siRNA exprimierenden Plasmiden überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von Integrin  $\beta$ 1 von RhoGDI $\beta$  abhängt. Die Unterdrückung von RhoGDI $\beta$  führte zudem zu einer Veränderung des mesenchymalen Phänotyps der MDA-MB-231-Zellen hin zu einer mehr epithelialen Ausprägung.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine dieser Veränderungen festgestellt werden. Die Expression von Integrin  $\beta$ 1 wird durch siRNA gegen RhoGDI $\beta$  in MDA-MB-231-Zellen nicht wesentlich beeinflusst. Zudem konnte keine phänotypische Veränderung gegenüber den mit siLuc (Kontroll-siRNA) behandelten Zellen nachgewiesen werden. Im primären Mammakarzinom korreliert RhoGDI $\beta$  nicht mit Integrin  $\beta$ 1, so dass die von Zhang et al. [448] beobachteten Befunde keine allgemeine Gültigkeit zu haben scheinen. Unterschiedliche Wachstumsbedingungen wie verschiedenes Serum und Medium könnten die abweichenden Ergebnisse erklären. Eine weitere Ursache für die Diskrepanz kann in der verwendeten Methode der Unterdrückung der RhoGDI $\beta$ -Expression liegen. SiRNA exprimierende Plasmide könnten einen anderen Einfluss auf Zelleigenschaften haben, als die hier verwendete transiente Transfektion mit siRNA, zumal durch Plasmide eine permanente Unterdrückung erreicht wird, was schließlich auch zu kompensatorischen Effekten führen kann.

Trotzdem konnte Integrin  $\beta$ 1 als ein wichtiger Faktor im primären Mammakarzinom bestätigt werden, da eine geringe Expression von Integrin  $\beta$ 1 signifikant mit einem längeren progressionsfreien Überleben verbunden ist. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Yao et al. [436], die anhand von 249 untersuchten Brustkrebsproben zeigen konnten, dass eine vermehrte immunhistochemische Integrin  $\beta$ 1-Expression beim primären Mammakarzinom zu einer kürzeren krankheitsfreien wie auch Gesamtüberlebenszeit führt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Untersuchungen an Bronchial- [295] und Pankreaskarzinomen [50] sowie malignen Melanomen [281]. Im Brustkrebs ist Integrin  $\beta$ 1 zudem mit vermehrter Progression und Metastasierung assoziiert [138; 193]. Eine Inhibierung von Integrin  $\beta$ 1 mit Antikörpern führt in der dreidimensionalen Zellkultur von Brustkrebszellen (u.a. MDA-MB-231, SKBR3, MCF-7) zu erhöhter Apoptoserate und verringerter Proliferation [301].

Integrin  $\beta$ 1 ist Bestandteil von heterodimeren Rezeptoren in der Zellmembran, die über das gebundene Fibronectin-1 oder Laminin-1 Kontakt zur extrazellulären Matrix (ECM) herstellen [436]. Signale der ECM werden auf diese Weise in Reaktionen der Zelle umgesetzt, was unter anderem zu vermehrter Proliferation, Apoptose oder Überleben führen kann [34; 149].

Auch eine hohe Expression von Fibronectin-1 bedingt Yao et al. [436] zufolge eine ungünstigere Prognose beim primären Mammakarzinom. Untersuchungen am Bronchialkarzinom haben gezeigt, dass eine Koexpression von Integrin  $\beta$ 1 zusammen mit Fibronectin-1 zu einem kürzeren Überleben und erhöhter Chemotherapieresistenz führt [358]. In der vorliegenden Arbeit konnte dies aufgrund der geringen Fallzahl nicht bestätigt werden. Allerdings korreliert auch hier die Expression von Integrin  $\beta$ 1 signifikant mit der von Fibronectin-1 (Daten nicht gezeigt).

Andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass Integrin  $\beta$ 1 zur Chemo- [71; 159] und Radiotherapieresistenz [68] von Tumoren beiträgt, und somit neben prognostischen auch prädiktive Eigenschaften aufweist. Im Speziellen inhibiert Integrin  $\beta$ 1 die Paclitaxel-induzierte Apoptose von Brustkrebszellen [9].

Die Arbeitsgruppe um Theodorescu [123] hat RhoGDI $\beta$  bei den Untersuchungen am Blasenkarzinom als relevant identifiziert. Ausgangspunkt war dabei die Betrachtung der differentiellen Genexpression in schnell pulmonal metastasierenden Zelllinien gegenüber weniger aggressiven, kaum metastasierenden Zellen. RhoGDI $\beta$  wurde dabei als Faktor erkannt, der die pulmonale Metastasierung unterdrückt. In einer weiteren Publikation [396]

folgte die gleiche Arbeitsgruppe schließlich, dass dies primär durch die Regulation von Endothelin-1 durch RhoGDI $\beta$  bedingt ist.

Endotheline sind Teil der so genannten „Endothelin-Achse“ [279], die aus den Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) sowie den zwei G-Protein-gekoppelten Endothelinrezeptoren ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R besteht. Die Endotheline werden durch Endothelin-converting Enzymes (ECE-1 und ECE-2) aus (Prä)ProEndothelin erzeugt [204]. ET-1 wird hauptsächlich von endothelialen Zellen exprimiert, ET-2 von epithelialen Zellen der Niere und des Intestinums während ET-3 im Gehirn gefunden wird [204]. Im Brustkrebs findet sich eine erhöhte Expression von Endothelin-1 und -2 sowie ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R, während nur geringe Werte von ET-1 und ET<sub>A</sub>R im normalen Brustgewebe gefunden werden [132]. DCIS nehmen dabei eine Zwischenstellung ein [130]. Wülfing et al. [431] haben hingegen in Mammakarzinom-Zelllinien keine Expression von ET<sub>B</sub>R nachweisen können. Im invasiven Mammakarzinom ist die Expression von Endothelin-1, ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R mit einer erhöhten Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) assoziiert [432]. Bei Infiltration der Lymphknoten finden sich auch erhöhte Serumkonzentrationen von Endothelin-1 [147].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorproben enthalten immer auch Anteile von Tumorstroma, was neben Fibroblasten auch Immunzellen und Endothelzellen beinhaltet. Endotheline werden auch in Makrophagen [133] und in endothelialen Zellen exprimiert [16]. Dieser Beitrag zur Gesamtexpression scheint aber auch im Rahmen des Tumor-„Microenvironment“ von Bedeutung für die Tumorzelle zu sein, da Endothelin sowohl auto- als auch parakrine Wirkungen hat [130] und Endothelin selbst die Expression seiner Rezeptoren fördert [131].

Endotheline können die hypoxiebedingte Apoptose verhindern [132] und die Angiogenese im Tumor fördern [16]. Hypoxie fördert zum einen über den Hypoxie induzierbaren Faktor (HIF) 1 $\alpha$  die Endothelin-Expression [431], andererseits wird durch Endothelin die Expression von VEGF via HIF1 $\alpha$  verstärkt [376]. Auch erhöhte Estrogenwerte bedingen einen Anstieg der Endothelin-Expression [431]. Endothelin steigert auch die Invasivität der Mammakarzinomzellen. Makrophagen bilden auf einen Endothelin-Stimulus hin vermehrt MMP-1, -2, -9 und -14, gleichermaßen behandelte MCF-7-Zellen nur MMP-14 [147], wobei bei beiden Zellarten die Expression von TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1) abnimmt [130]. Somit kann die Interaktion von Tumorzellen mit Makrophagen zu einem Remodelling der extrazellulären Matrix beitragen.

Schließlich ist Endothelin-1 auch an der Bildung von Knochenmetastasen beteiligt [140; 278]. Etwa 25% der bei Brustkrebs beobachteten Knochenmetastasen sind osteoblastisch, wohingegen der größere Teil einen osteolytischen Aspekt aufweist [140; 278]. Endothelin-1 stimuliert über ET<sub>A</sub>R Osteoblasten zu einem vermehrten Knochenanbau, wohingegen in osteolytischen Knochenmetastasen Osteoklasten via TGF $\beta$  und RANK/RANKL zum Knochenabbau stimuliert werden. Interessanterweise soll auch Endothelin-1 und -2 die TGF $\beta$ -Expression über ET<sub>A</sub>R induzieren [130].

Die Expression von Endothelin-1 ist in den untersuchten MDA-MB-231-Zellen nicht mit der Expression von RhoGDI $\beta$  assoziiert. Endothelin-1 wird durch die Suppression von RhoGDI $\beta$  nicht beeinflusst. Ebenso ergibt sich im primären Mammakarzinom keine signifikante Korrelation zwischen beiden Faktoren. Der von Titus et al. [396] gefundene Zusammenhang scheint auf das Blasenkarzinom beschränkt zu sein, zumindest besitzt er keine Allgemeingültigkeit.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch Endothelin-1 als prognostischer Faktor bestätigt werden, da eine hohe Endothelin-1-Expression signifikant mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert ist. Eine Einschränkung dieses Befundes ist die sehr geringe Anzahl an untersuchten Proben sowie das heterogene Patientenkollektiv. Dieses Ergebnis zeigt jedoch eine Tendenz, die im Einklang mit Ergebnissen von Hagemann et al. [147] steht. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass hohe ET-1 Serumlevel mit Lymphknotenmetastasen

korrelieren. Positive Lymphknoten bedingen allgemein eine schlechtere Prognose und damit ein kürzeres rezidivfreies Überleben [424]. Hohe Endothelinwerte finden sich anderen Untersuchungen nach vor allem bei größeren Tumoren, hohen Grading und lymphovaskulärer Invasion [429; 430]. Auch dies sind prognostisch ungünstige klinikopathologische Faktoren, so dass in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv ET-1 zufällig als Surrogatmarker fungieren könnte, was zweifellos auch durch die geringe Fallzahl bedingt sein könnte. Andererseits steht dieser Befund im Widerspruch zu Ergebnissen von Wülfing et al. [430], die bei der Untersuchung von 176 Mammakarzinomproben keinen Zusammenhang zwischen der ET-1-Expression und dem rezidivfreien Überleben gefunden haben, wohl aber ET<sub>A</sub>R als prognostischen Faktor etablieren konnten. In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen ein solcher Zusammenhang nicht bestätigt werden, was wiederum durch eine zu geringe Fallzahl begründet sein könnte.

Im Weiteren wurden Veränderungen der Genexpression zwischen MDA-MB-231-Zellen, die mit siR $\beta$  und solchen, die mit siLuc behandelt wurden, mit Hilfe eines Microarray (Affymetrix HGU 133A) verglichen. Es zeigten sich erstaunlich wenige durch siR $\beta$  beeinflusste Gene, nämlich Cyclooxygenase-2 (Cox-2), Kollagen IV $\alpha$ 2 (ColIV $\alpha$ 2), GTP binding protein 9 (GTPBP9) sowie AKAP350C und FLJ21424. Eine Überprüfung per Q-RT-PCR schloss FLJ21424 aus, AKAP350C wurde nicht untersucht. Die übrigen analysierten Gene wurden im Wesentlichen bestätigt. Aufgrund der hohen Homologie der Sequenzen von RhoGDI $\beta$  und GTP binding protein 9 war ein unspezifischer Effekt der siRNA im Bereich des Möglichen. Deshalb wurde eine zweite siRNA gegen RhoGDI $\beta$  (siR $\beta$ 2) entworfen, die schließlich keine Beeinflussung der Expression von GTP binding protein 9 mehr zeigte. Offenbar war eine Kreuzreaktion der siRNA für diese initial beobachtete Suppression verantwortlich. Auch Kollagen IV $\alpha$ 2 zeigte nunmehr keine Reaktion auf die Unterdrückung von RhoGDI $\beta$ . Eine hohe GTPBP9-Expression scheint trotz seiner Unabhängigkeit von der RhoGDI $\beta$ -Expression einen signifikanten negativen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben zu haben. Auch dieser signifikante Zusammenhang kann zufällig aufgrund der geringen Fallzahl aufgetreten sein. Zur Relevanz von GTPBP9 für das primäre Mammakarzinom liegen keinerlei Daten aus der Literatur vor.

Lediglich Cox-2 konnte in MDA-MB-231-Zellen konstant durch beide siRNA gegen RhoGDI $\beta$  supprimiert werden. Auch im primären Mammakarzinom zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen RhoGDI $\beta$  und Cox-2. Dies ist das erste Mal, dass ein solcher Zusammenhang im primären Mammakarzinom nachgewiesen wird.

Bisher sind zwei Cyclooxygenasen bekannt. Cox-1 ist in vielen Geweben konstitutiv aktiv und spielt in einer Reihe physiologischer Vorgänge eine zentrale Rolle [415]. Cox-2 dagegen wird v.a. durch proinflammatorische Zytokine, Hormone und Tumorpromotoren induziert [92]. Erhöhte Cox-2 Werte finden sich auch in vielen malignen und prämaligen Geweben [397; 423].

Cyclooxygenasen bilden aus Arachidonsäure Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), welches über das instabile Prostaglandin H<sub>2</sub> mit Hilfe spezifischer Prostaglandinsynthasen zu PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub> (Prostazyklin) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) metabolisiert wird [416]. Prostaglandin E<sub>2</sub> ist das wichtigste in Tumoren produzierte proinflammatorische Lipid, welches u.a. in Colon- [322], Magen- [404], Prostata- [99] und Mammakarzinomen [331] gebildet wird. Auch Thromboxan A<sub>2</sub> soll angiogen wirken [309]. Seine biologische Wirkung entfaltet PGE<sub>2</sub> auto- und parakrin [42] über seine vier bisher bekannten G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptoren EP1-4.

Zum Beispiel ist EP1 in der Lage, über IP3 den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel anzuheben [418], womit auch denkbar wäre, dass Calcineurin-abhängige Signalwege wie der über NFAT aktiviert werden könnten und somit ein selbstverstärkendes System entsteht. EP2 dagegen ist in der Lage, cAMP-abhängige Signalwege zu induzieren und

somit auch über ein cAMP responsive element (CRE) im Cox-2 Promotor einen positiven Feedback-Loop zu bilden. Die Stimulation von EP2 [372], aber auch EP1 [381], vermag die Expression von VEGF und damit die Angiogenese positiv zu beeinflussen. EP1 und EP2 werden im Mausmodell der Cox-2-abhängigen Carcinogenese vermehrt, EP3 dagegen geringer exprimiert wird als in Normalgeweben [57].

Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigt sich mit der Rolle von Cox-2 im Brustkrebs. Es seien hier nur einige genannt, die neben der mit Cox-2 verbundenen Prognose auch Einblicke in die zugrunde liegende Biologie der Cox-2-Wirkung bieten. Dabei fällt auf, dass Cox-2 neben seiner Assoziation mit dem Estrogenrezeptor auch mit Her2/neu verbunden zu sein scheint.

Liu et al. [241] konnten am Mausmodell nachweisen, dass allein die Cox-2-Überexpression Brustkrebs erzeugen kann. Cox-2 inhibiert die Apoptose in Brustkrebszellen [241; 368]. Andererseits konnte Barnes et al. [19] in den ER-negativen MDA-MB-231-Zellen keine Apoptosezunahme bei Ausschaltung von Cox-2 finden.

Eine vermehrte Cox-2-Expression erhöht die Motilität und Invasivität von Brustkrebszellen [368] und induziert gleichzeitig pro-uPA. In Colonkarzinomzellen konnten Nishikawa et al. [282] zeigen, dass die Inhibition von Cox-2 mit Hilfe von NS398 zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation sowie der uPA mRNA-Expression führt. In einem cornealen Modell induziert eine hohe Cox-2-Expression einen Anstieg der Expression von uPA sowie der Matrix-Metallo-Proteinasen MMP1 und MMP9 [296]. Da sowohl Cox-2 als auch uPA [75] MMPs aktivieren, könnten Cox-2 und uPA die Tumorinvasion synergistisch modulieren [270]. Schließlich fanden Minisini et al. [270] immunhistochemisch eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Cox-2 mit der von uPA und PAI-1 beim Brustkrebs. Auch im vorliegenden Kollektiv konnte eine signifikante Korrelation ( $R=0,560$ ;  $p<0,001$ ;  $N=52$ ) von Cox-2 mit der Expression von PAI-1, nicht jedoch mit uPA festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine große Studie von Ristimäki et al. [324] zur Expression von Cox-2 zeigte, dass 37,4% von 1576 untersuchten Mammakarzinomen Cox-2 vermehrt exprimieren. Dabei ist eine hohe Expression mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert. Cox-2 findet sich vermehrt bei großen Tumoren, high Grade, Hormonrezeptornegativität, Her2/neu-Überexpression, positivem Nodalstatus sowie duktiler Histologie. Bei dieser Patientenkollektiv zeigt sich in der Subgruppe der ER-positiven, Her2/neu-negativen Mammakarzinome mit hoher Cox-2-Expression eine besonders ungünstige Prognose [324].

Der mRNA-Level von Cox-1 und Cox-2 zusammen korreliert mit dem Aromatase-(CYP19)-mRNA-Level im Mammakarzinom [44]. Dabei bewirkt das von den Brustkrebszellen gebildete PGE<sub>2</sub> eine auto- und parakrine Aktivierung der EP-Rezeptoren, was wiederum zur vermehrten Transkription des Aromatase codierenden Gens CYP19 sowohl in der Zelle selbst als auch im Stroma führt. Dies bedingt einen nachfolgenden Anstieg der Estrogen- und Testosteronproduktion [42]. Allein durch Unterdrückung der Cox-2-Expression mit Hilfe von siRNA konnte dies verhindert werden. Daraus schließen die Autoren, dass eine spezifische Cox-2-Inhibition vor allem in ER-positivem Brustkrebs erfolgreich sein könnte.

Andererseits fanden mehrere Arbeitsgruppen Hinweise auf einen Cross-talk zwischen Cox-2 und Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). So induziert EGFR über MAPK und AP-1 die Cox-2-Transkription [74]. Cox-2 wiederum vermag zum Beispiel über PGE<sub>2</sub> einen cAMP-abhängigen Signalweg zu aktivieren, was zu einer vermehrten Expression von Amphiregulin führt, welches seinerseits ein Ligand des EGFR ist [359].

Im Einklang damit konnte Witton et al. [422] nachweisen, dass gerade ER-negative Tumoren mit hoher Cox-2-Expression ein ungünstiges Outcome bedingen. Benoit et al. [26] haben zudem gezeigt, dass Her2/neu nicht nur zur Induktion von Cox-2 führt, sondern eine hohe Cox-2- bzw. PGE<sub>2</sub>-Produktion wiederum eine erhöhte Her2/neu-Expression bewirkt.



In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Cox-2-Expression und dem Überleben gefunden werden, wiederum vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl.

Schließlich hat Cox-2 auch Einfluss auf die Metastasierung. In Skelettmetastasen des primären Mammakarzinoms wird Cox-2 vermehrt exprimiert [367]. Brustkrebszellen können im Zuge der Skelettmetastasierung Stroma und Osteoblasten zur PGE<sub>2</sub>-Produktion anregen [292], welches wiederum via RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) [232] sowie direkt [120] Osteoklasten stimuliert. Schließlich hat die Arbeitsgruppe um Massagué [143; 271] Cox-2 neben EREG, MMP1, und MMP2 als ein Gen identifiziert, welches an der Intra- und Extravasation von Brustkrebszellen während der pulmonalen Metastasierung beteiligt ist.

Somit kommen RhoGDI $\beta$  zwei diametrale Eigenschaften zu. Zum Einen inhibiert es als RhoGDI die Migration, zum Anderen fördert es die Expression des prokarzinogenen Faktors Cox-2. Diese widerstrebenden Funktionen zeigen sich auch in der Kaplan-Meier-Kurve. Beide Eigenschaften scheinen sich gegenseitig aufzuheben, so dass bei 263 auf mRNA-Ebene untersuchten Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen hoher und niedriger RhoGDI $\beta$ -Expression im krankheitsfreien wie auch im Gesamtüberleben festgestellt werden kann. Zum gleichen Ergebnis kommen die immunhistochemischen Untersuchungen von H. Ronneburg. Im individuellen Tumor dagegen kann die eine oder andere Funktion jedoch abhängig von weiteren Begleitfaktoren überwiegen.

### 5.3.1 Bedeutung der Interaktion von RhoGDI $\beta$ mit Vav1

Eine wesentliche Frage ist, wie RhoGDI $\beta$  die Cox-2 Expression beeinflusst. Anhand von Lymphozyten haben Groyzman et al. [135] gezeigt, dass Vav1 den Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT), einen Transkriptionsfaktor, aktiviert. Eine Überexpression von RhoGDI $\beta$  dagegen supprimiert die NFAT-Aktivierung. Wenn jedoch sowohl Vav1 als auch RhoGDI $\beta$  vermehrt exprimiert werden, so verstärkt sich synergistisch der aktivierende Effekt von Vav1 auf die NFAT-Aktivierung. Entscheidend für eine maximale NFAT-Aktivierung scheint dabei ein Gleichgewicht von Vav1 und RhoGDI $\beta$  zu sein.

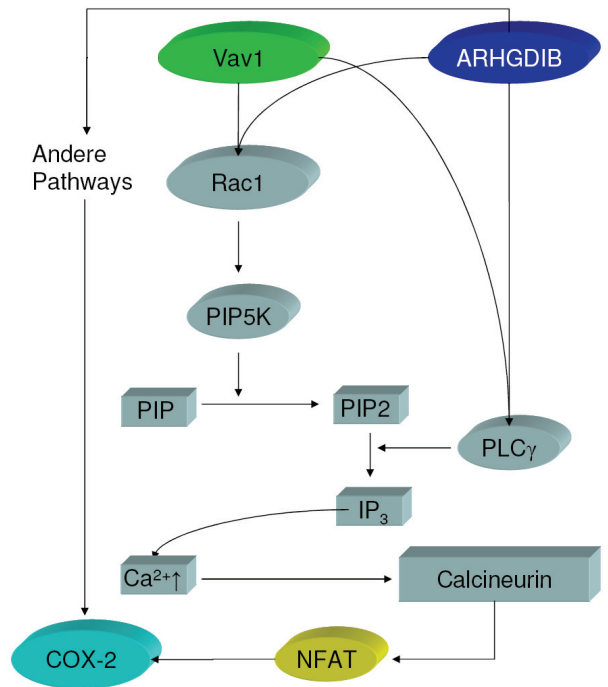
Yiu et al. [438] konnten zudem zeigen, dass NFAT die Invasivität von Brustkrebszellen durch die Erhöhung der Cox-2 Expression reguliert. Damit könnte eine Möglichkeit der Regulation von Cox-2 durch RhoGDI $\beta$  über einen Synergismus mit Vav1 zu einer Aktivierung von NFAT führen, welches seinerseits die Cox-2 Expression erhöht.

Im primären Mammakarzinom korreliert RhoGDI $\beta$  hoch signifikant mit Vav1. Damit scheint tatsächlich ein Synergismus eine mögliche Ursache dieser Beeinflussung der Cox-2-Expression sowohl durch RhoGDI $\beta$  als auch Vav1 zu sein. Bei Unterdrückung der Vav1-Expression mit Hilfe spezifischer siRNA zeigt sich analog zu Experimenten mit siR $\beta$  und in ähnlichem Maße eine Abnahme der Cox-2-Expression. Je nach Effektivität der verwendeten siRNA gegen Vav1 nimmt analog die Cox-2 Expression in verschiedenem Ausmaß ab. Vav1 korreliert ebenfalls hoch signifikant mit Cox-2 im primären Mammakarzinom. Diese Assoziation ist zudem stärker als die von RhoGDI $\beta$  mit Cox-2, was möglicherweise bedeuten könnte, dass RhoGDI $\beta$  im Wesentlichen die Aktivität von Vav1 fördert.

Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass in den verwendeten Brustkrebsproben niemals reine Brustkrebszellen vorhanden sind, sondern immer auch verschieden hohe Anteile von Lymphozyten, in denen regelmäßig eine erhöhte Expression von RhoGDI $\beta$  und Vav1 festgestellt wird [135]. Die im primären Mammakarzinom gefundene Korrelation zwischen Vav1 und RhoGDI $\beta$  scheint relativ spezifisch für das Mammakarzinom und hämatopoetische Zelllinien zu sein, da sich bei fünf untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien

kein Zusammenhang zwischen der Expression von RhoGDI $\beta$  und Vav1 nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt). So konnte in ES2-Zellen zwar eine relativ hohe RhoGDI $\beta$ -Expression festgestellt werden, jedoch war per Q-RT-PCR keine Expression von Vav1 detektierbar. Dies zeigt, dass eine funktionelle Interaktion beider Faktoren nicht zwangsläufig auftritt und so je nach Zelltyp auch voneinander unabhängige Funktionen in den Vordergrund treten können.

Vav1 und RhoGDI $\beta$  aktivieren NFAT. Die NFAT-Aktivität wird durch die subzelluläre Lokalisation bestimmt. Im inaktiven Zustand ist NFAT ein hyperphosphoryliertes zytosolisches Protein [201]. NFAT wird durch Calcineurin, welches selbst durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert wird, dephosphoryliert [291], wodurch Kernlokalisationsmotive exponiert werden, aufgrund derer NFAT in den Kern importiert wird [362]. Dort interagiert es unter anderem mit AP-1 (activator protein 1) [184], einem Heterodimer, welches aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Onkogenfamilien zusammengesetzt ist. Schließlich wird NFAT durch PKA (Protein Kinase A) und GSK3 (Glykogen Synthase Kinase 3) rephosphoryliert und aus dem Kern exportiert [22]. Vav1 ist in der Lage, die NFAT-Aktivierung über seine Funktion als RhoGEF, aber auch unabhängig davon zu regulieren. Vav1 aktiviert Rac, welches seinerseits PIP5K (Phosphatidyl-inositol-4-phosphat-5-Kinase) aktiviert, die aus PIP (Phosphatidyl-inositol-4-phosphat) schließlich PIP2 (Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat) bildet [59]. PIP2 ist ein Substrat von PLC $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ ), welches durch das gebildete IP $_3$  (Inositol-1,4,5-triphosphat) die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum initiiert (**Abb. 5.1**). Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass der Calciumstrom in die Zelle auch unabhängig von Rac und der GEF-Aktivität von Vav1 induziert werden kann und dadurch NFAT stimuliert wird [201; 425]. Die physische Interaktion des Amino-Terminus von Vav1 mit RhoGDI $\beta$  erhöht den aktivierenden Effekt auf PLC $\gamma$  [135] und verstärkt somit die NFAT-Stimulation [136]. Das vollständige Vav1-Protein ist dabei Voraussetzung; oncVav1 (onkogenes Vav1) besitzt den für Protein-Protein-Interaktionen wichtigen Amino-Terminus nicht, wodurch es auch zu keiner Ca $^{2+}$ -Freisetzung und damit zu keiner NFAT-Aktivierung kommt [135; 425]. Diese Erkenntnisse zur NFAT-Aktivierung durch Vav1 stammen vorwiegend aus Arbeiten an T-Zellen, in denen Vav1 an der intrazellulären Signalübertragung des T-Zell-Rezeptors wesentlichen Anteil hat. In eigenen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass gegen RhoGDI $\beta$  oder Vav1 gerichtete siRNA die intrazelluläre Lokalisation von NFAT beeinflusst. In mit siR $\beta$  oder siV#1 behandelten MDA-MB-231-Zellen ist eine bestimmte, vermutlich aktive Form des NFAT-Proteins im Kern nur in sehr geringen Mengen im Vergleich zu Kontrollzellen nachweisbar, auch ein Luciferase-Reporter-Assay zeigt unter siR $\beta$  eine signifikant geringere Aktivität der Luciferase verglichen mit Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden.



**Abb. 5.1:** Vereinfachtes Modell zur Hypothese der Regulation der Cox-2-Expression durch Vav1 und RhoGDI $\beta$  via NFAT in T-Lymphozyten

### 5.3.2 TGF $\beta$ als Einflussfaktor der Expression von Cox-2

Es existieren Hinweise darauf, dass die Expression von Cox-2 auch durch TGF $\beta$  stimuliert wird [166]. Dies soll zu einer vermehrten Knochenmetastasierung beitragen, da die Knochenmatrix TGF $\beta$  sezerniert und ihrerseits durch das von Cox-2 produzierte PGE<sub>2</sub> zur TGF $\beta$ -Produktion angeregt wird. Eigene Versuche zur Stimulation von Cox-2 durch TGF $\beta$  ergaben eine erhöhte Expression, die nicht durch siR $\beta$  beeinflusst werden konnte (Daten nicht gezeigt). Damit scheint RhoGDI $\beta$  vor allem in Abwesenheit von TGF $\beta$  einen Einfluss auf die Cox-2 Expression im Brustkrebs zu haben. Zum anderen kann dies ein Hinweis darauf sein, dass TGF $\beta$  einen anderen Weg der Stimulation der Cox-2 Expression nutzt, als über NFAT. Rodriguez-Barbero et al. [330] konnten in mesangialen Zellen nachweisen, dass TGF $\beta$  die Cox-2-Expression via p38/MAPK und PI3K beeinflusst, einem bisher kaum mit TGF $\beta$  in Verbindung gebrachten Signaltransduktionsweg, was zuvor von Chin et al. [62] ebenfalls in mesangialen Zellen erstmalig gezeigt wurde. TGF $\beta$  reguliert über 500 Gene, u.a. PTHrP [237] vor allem über diverse Smad-Proteine, die zusammen mit Cofaktoren die Transkription initiieren [259]. Die Expression von Cox-2 selbst wird im Wesentlichen über die Transkriptionsfaktoren ras/raf/MEK/MAPK [383], AP-1 (activator protein 1)[383; 433], NF $\kappa$ B [73], PEA3 [383] und NFAT [128] reguliert.

### 5.4 Bedeutung von PTHrP

PTHrP wurde als humoraler Faktor der malignitätsassoziierten Hypercalcämie entdeckt [129], die besonders bei Brustkrebs, aber auch beim Prostatakarzinom auftreten kann. Ausgelöst wird dies durch eine Homologie zum Parathormon, wodurch es am Parathormonrezeptor (PTH1R) aktivierend wirkt [197], jedoch bei carcinogener Expression keine Rückkopplung erfährt.

Bis jetzt ist nur ein PTHrP-Rezeptor bekannt, PTH1R, der mit der N-terminalen Domäne von PTHrP interagiert. Vermutlich existieren jedoch auch Rezeptoren für andere Domänen, da auch PTHrP ohne die N-terminale Domäne nach außen sezerniert wird [426] und von dort zelluläre Funktionen verändert [248], so zum Beispiel die Calciummobilisation über einen PKC-abhängigen Signaltransduktionsweg [293] beim Plattenepithelkarzinom.

Es gibt Hinweise darauf, dass PTHrP in Brustkrebszellen direkt die Proliferation, Invasivität und Sensitivität gegenüber proapoptotischen Stimuli reguliert [103; 170; 398]. Um diesen Umstand näher zu untersuchen wurde ein Microarray von MDA-MB-231-Zellen durchgeführt, die entweder mit siPTHrP oder mit Kontroll-siRNA behandelt wurden. Die untersuchten MDA-MB-231-Zellen produzieren PTHrP und sind ein etabliertes Modellsystem für diesen Faktor [25; 437]. Drei unabhängige Experimente wurden gemeinsam ausgewertet und ergaben, dass durch die Herabregulation von PTHrP die Expression von mehr als 200 Genen beeinflusst wird [83]. Zuvor wurde per Q-RT-PCR die Effizienz der erreichten Suppression verifiziert. Unter den verändert exprimierten Genen zeigen sich vier Annexin-Gene, vier Metallothionin-Gene sowie etliche Gene der Ubiquitylierung und proteosomalen Degradation. Interessanterweise fanden sich auch vier Zellzyklus-regulierende Gene, nämlich Cdc2, Cdc25B, GRCC8 sowie CKS2, die durch siPTHrP induziert wurden. Bis auf das letztgenannte sind diese Gene an der Initiation des G<sub>2</sub>/M-Übergangs beteiligt. Des Weiteren fielen auch einige Gene auf, die an der Tumorprogression beteiligt sind.

Einige dieser Gene wurden zur genaueren Analyse ihrer Relevanz, aber auch der Art der Regulation durch PTHrP ausgewählt. Dazu wurden MDA-MB-231-Zellen mit siPTHrP, mit siRNA gegen den Parathormorezeptor PTH1R (siPrec), PTHrP(1-34), PTHrP(67-86) sowie Forskolin, einem Adenylatzyklaseaktivator, behandelt.

Es existieren drei verschiedene Isoformen von PTHrP [85], die nach Abspaltung der Prä-Pro-Sequenz und posttranslationaler Spaltung eine oder mehrere Domänen enthalten. Dies sind die N-terminale (PTHrP 1-36), die mittlere (PTHrP 38-94) sowie die C-terminale (PTHrP 107-139) Domäne. Die N-terminale Domäne ist für die Wirkung von PTHrP am Parathormonrezeptor verantwortlich. Die Aktivierung dieses Rezeptors führt abhängig vom Zelltyp zu einer Aktivierung von Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) oder von  $Ca^{2+}$ -abhängigen Signalwegen [53; 256]. Die Mittelregion ist durch eine „nuclear localization sequence“ (NLS) [260] sowie eine Importin- $\beta$  Bindungsregion [221] kerngängig. Zudem ist eine Phosphorylierungsregion identifiziert worden, die einen Kernimport bei Phosphorylierung verhindert. Diese Phosphorylierung geschieht zellzyklusabhängig über *cdc2/CDK2* [221]. Die C-terminale Domäne, das Osteostatin, antagonisiert durch Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin [67] die Wirkung der N-terminalen Domäne von PTHrP, indem es zur Internalisation und Inaktivierung von PTH1R beiträgt [107].

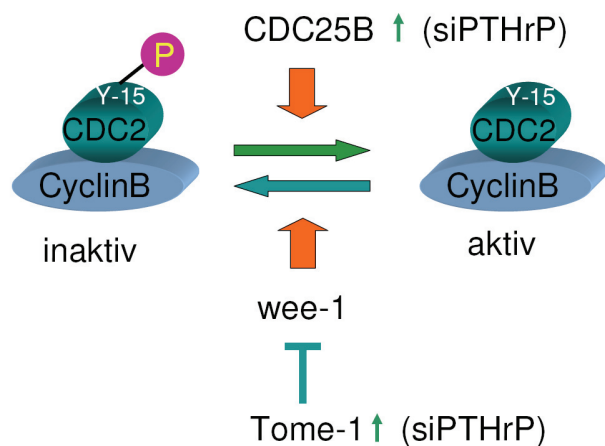
PTHrP ist in der Lage, über seine N-terminal gelegene PTH-like Domäne den Parathormonrezeptor (PTH1R) zu aktivieren [197] und dadurch verschiedene Signalwege anzusteuern. So soll PTHrP den PKA/cAMP-Signalweg [256], aber auch den PKC- [254] oder andere Calcium-abhängige Signalwege [53] induzieren.

PTHrP reguliert in MDA-MB-231-Zellen *Cdc2* und *Cdc25B* über den Parathormonrezeptor PTH1R. Dabei zeigte sich kein Einfluss des Adenylatzyklaseaktivators Forskolin, was nahe legt, dass *Cdc2* und *Cdc25B* nicht über einen cAMP-abhängigen Signalweg reguliert werden. Eine andere Möglichkeit besteht in einer PKC-abhängigen Signaltransduktion, jedoch ist Protein Kinase C in MDA-MB-231-Zellen konstitutiv aktiv [238; 306], wodurch dieser Regulationsweg unwahrscheinlich ist. Eine dritte Alternative ist die Regulation über einen  $Ca^{2+}$ -abhängigen Weg. Im fortgeschrittenen Brustkrebs ist dieser Signalweg das wichtigste Ziel von PTH1R [53]. Tatsächlich hat Calcium einen negativen Einfluss auf *Cdc2*, indem es die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II aktiviert [179].

*Cdc2* (CDK1) bildet zusammen mit Cyclin B einen Komplex, der den Eintritt in die Mitose initiiert [88]. *Cdc2* wird in vielen Mammakarzinomen vermehrt exprimiert [208]. *Cdc25B* (cell division cycle 25B) aktiviert diesen Komplex durch Dephosphorylierung von *Cdc2* [54; 233]. GRCC8 (Tome-1, trigger of mitotic entry 1) aktiviert indirekt *Cdc2*, indem es zur Degradation von *wee-1* beiträgt [14], einem Inhibitor des *Cdc2*/CyclinB-Komplexes (**Abb. 5.2**).

CKS2 schließlich wird für das zielgerichtete Wirken des Komplexes an einem speziellen Substrat benötigt [353]. PTHrP verhindert damit nicht nur die Expression von *Cdc2* sondern steuert auch regulatorische Proteine und *Cdc2*-Substrate. Interessanterweise ist auch PTHrP ein Substrat von *Cdc2* [221]. Somit könnte die Herabregulation der Expression wie auch der Aktivität von *Cdc2* dazu beitragen, den Level von PTHrP im Kern auf einem hohen Niveau zu halten, um auf diesem Wege unter anderem die Integrin  $\alpha 6$ -Expression zu regulieren.

KISS-1 wird durch siPrec und siPTHrP verschieden reguliert, was bedeutet, dass verschiedene Signalwege an der Regulation von KISS-1 beteiligt sind, wobei je nach Zelltyp ein anderer überwiegt und damit KISS-1 entscheidend beeinflusst. KISS-1 ist ein ursprünglich als Metastasensuppressor [420] entdecktes Protein, welches



**Abb. 5.2:** Schema der Einflussfaktoren des Aktivitätszustands des *Cdc2*/CyclinB-Komplexes

jedoch zwischenzeitlich auch als Tumorpromotor identifiziert wurde. So bewirkt eine hohe KISS-1 Expression eine schlechte Prognose im Brustkrebs [258].

Catenin  $\beta 1$  (CTNNB1) wird durch PTHrP(67-86) beeinflusst, was von Kulkarni et al. [218] auch in UMR106-Zellen bestätigt wurde, hier allerdings beeinflusst durch PTHrP(1-34) und cAMP-abhängige Signalwege. PTHrP(67-86) besitzt keine Importin  $\beta$ -Bindungsstelle und kann deshalb nicht in den Kern transportiert werden, hat jedoch auch eine biologische Aktivität. Man nimmt an, dass PTHrP(67-86) an einen membranständigen, G-Proteingekoppelten Rezeptor bindet, der nicht mit PTH1R identisch ist, und einen Calcium-abhängigen Signalweg aktiviert [158; 293].

In SqCC/Y1 Zellen erhöhen beide PTHrP-Peptide, PTHrP(1-34) und PTHrP(67-86), den intrazellulären Calciumspiegel, was zumindest in MDA-MB-231-Zellen eher unwahrscheinlich ist, da bis auf KISS-1 und Cdc25B verschiedene Gene durch diese Peptide reguliert werden, so dass in MDA-MB-231-Zellen auch unterschiedliche Signalwege beeinflusst werden.

Interessanterweise hat PTHrP(67-86) ähnliche Effekte wie siPTHrP auf die Expression von KISS-1, PAI-1 und CTNNB1, jedoch verschiedene auf Cdc25B. Möglicherweise behindert PTHrP(67-86) spezifische Signalwege, die bestimmte Gene regulieren.

PTHrP(1-34) und PTHrP(67-86) haben in MDA-MB-231-Zellen in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus MCF-7-Zellen [361] keinen Einfluss auf die Integrin  $\alpha 6$ (ITGA6)-Expression. Offenbar ist für die Integrin  $\alpha 6$ -Regulation die vollständige Mittelregion von PTHrP mit einer intakten Kernlokalisationssequenz essentiell. Integrin  $\alpha 6$  bindet Laminin, ein Protein der extrazellulären Matrix und ist für die Zelladhäsion, Migration und Proliferation von Bedeutung [187; 277]. Zudem bewirkt eine hohe Integrin  $\alpha 6$ -Expression eine schlechte Prognose im Brustkrebs [116].

Die Bestimmung der Expression von PTHrP, ITGA6, Cdc2, Cdc25B, uPA, PAI-1, CTNNB1, CST4 und HSPA1A in 50 Brustkrebsproben zeigte, dass nur ITGA6, Cdc2 und Cdc25B im primären Mammakarzinom von PTHrP reguliert werden. Dies verdeutlicht, wie wichtig es ist, die in der Zellkultur gewonnenen Daten auf ihre Relevanz im primären Mammakarzinom hin zu untersuchen.

uPA und PAI-1 konnten jedoch im vorliegenden Kollektiv als Prognosefaktoren auch auf mRNA-Ebene eingesetzt werden. So ist eine erhöhte Expression von uPA oder PAI-1 signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben, hohe uPA-Werte zusätzlich auch mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert.

Die Messung von uPA/PAI-1 erfolgt hauptsächlich auf Proteinebene per ELISA. Immunhistochemische Methoden [108] und mRNA-Messungen [95; 96; 112; 377] korrelieren nur schwach mit der Proteinkonzentration und zeigen einen allgemein schlechteren Zusammenhang mit dem Überleben. Trotzdem scheint zumindest ein hoher PAI-1-, nicht jedoch der uPA-mRNA-Gehalt, relativ gut mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert zu sein, wie die vorliegende Arbeit, aber auch Leissner et al. [226] zeigen. Viele Studien haben wegen dieser Inkonstanz und fehlender Korrelation zwischen PAI-1 mRNA- und Proteingehalt [15] die Bestimmung der Proteinkonzentration vorgezogen.

Ein wichtiger Schritt der Metastasierung ist die aktive Degradation der ECM (extrazellulären Matrix) und der Basalmembran [38], wobei das uPA-System bestehend aus uPA (urokinase-type Plasminogen Activator), uPAR (membranständiger uPA-Rezeptor), PAI(Plasminogen-Aktivator-Inhibitor)-1 und -2 eine wichtige Rolle spielt [93; 317].

uPA, ein Mitglied der Serinproteasefamilie, ist ein 50 kDa großes sekretiertes Protein, welches in Fibroblasten, Monozyten, Neutrophilen, Epithelien und Karzinomzellen gebildet wird [148]. Es wandelt Plasminogen in Plasmin

um [178], welches wiederum Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) aktiviert, aber auch selbst Bestandteile der ECM wie Laminin, Fibronectin und Fibrin degradiert [75]. An uPAR gebundenes uPA aktiviert dabei Plasmin stärker [148]. uPA wird im Brustkrebs von Tumorzellen [91], aber auch von Fibroblasten des Stromas gebildet, die durch die Tumorzellen zur uPA-Produktion angeregt werden [280]. Auch eine hohe uPA-Expression der Fibroblasten bewirkt eine schlechte Prognose [91]. Seine Wirkung beruht neben der direkten Beteiligung an den Vorgängen der Invasion auch auf einer Freisetzung von TGF $\beta$  und Fibroblast Growth Factor (FGF) aus der ECM [7] und bewirkt somit auch eine vermehrte Migration, Chemotaxis und Angiogenese [148].

PAI-1 inhibiert uPA durch Bildung von 1:1-Komplexen. Andererseits bindet es selbst an Vitronectin und moduliert unabhängig von uPA die Adhäsion und Migration und ist an der Angiogenese beteiligt [245]. Eine hohe PAI-2-Expression scheint dagegen – auch bei hohem uPA – mit einer guten Prognose assoziiert zu sein [95].

uPA wurde 1988 als prognostischer Marker beim Mammakarzinom entdeckt [94]. Sein prognostischer Wert wurde seitdem von mehr als 20 Gruppen bestätigt. Darunter ist auch eine Studie des EORTC mit mehr als 8000 Patienten [244]. Eine hohe PAI-1-Expression wurde erstmals 1993 von Jänicke et al. [196] – damals überraschend – mit einer schlechten Prognose assoziiert, was später bestätigt wurde [113]. PAI-1 ist auch im Lymphknoten-negativen Brustkrebs ein unabhängiger prognostischer und prädiktiver Marker [152; 244]. Im männlichen Brustkrebs ist eine hohe PAI-1 Expression sogar der bisher einzige unabhängige prognostische Marker für ein schlechtes Outcome [264]. Die beste prognostische Aussagekraft hat jedoch die Kombination von uPA und PAI-1 [154]. Jänicke et al. [195] sowie Harbeck et al. [153; 155] konnten schließlich zeigen, dass die Kombination der beiden Parameter zu einer noch besseren Risikoabschätzung beiträgt. So führt eine hohe uPA- oder PAI-1-Protein-Expression zu einer schlechteren Prognose beim primären Mammakarzinom, wobei Patientinnen mit hohen Werten auch bei negativem Lymphknotenstatus von einer Chemotherapie besonders profitieren [195]. Damit haben uPA und PAI-1 auch prädiktiven Charakter.

Andererseits haben Urban et al. [406] anhand einer Population von 898 Patientinnen nachweisen können, dass die mRNA-Expression von uPA eine Prognose von Her-2-positiven Patientinnen erlaubt. So bedingen Her-2- positive/uPA-positive Tumoren ein schlechteres metastasenfreies Überleben als Her2- positive/uPA-negative, welche im Übrigen keinen Unterschied zu – unabhängig vom uPA-Status – Her-2-negativen Tumoren hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens zeigen.

## 5.5 Schlussbetrachtung

Ets1 ist ein zentraler Tumorpromotor im primären Mammakarzinom. Eine hohe Ets1-Expression führt zu einer ungünstigen Prognose. Ets1 reguliert unter anderem die Expression von RhoGDI $\beta$  und trägt wesentlich zur Stimulation der PTHrP-Expression bei. RhoGDI $\beta$  ist ein Inhibitor der RhoGTPase-abhängigen Migration, fördert jedoch Cox-2, einen beim Brustkrebs etablierten Tumorpromotor. PTHrP seinerseits stimuliert im Wesentlichen die Expression von Integrin  $\alpha$ 6, welches ebenfalls eine schlechte Prognose beim primären Mammakarzinom bewirkt. Ets1 trägt somit direkt und indirekt unter anderem über RhoGDI $\beta$  und PTHrP zur Tumorprogression bei.

## 6 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Ets1 spielt eine Rolle bei der Progression des Mammakarzinoms. Einige Ets1-Zielgene, wie MMPs, uPA, PTHrP, wurden bereits ermittelt. Um weitere Ets1-Zielgene zu identifizieren, wurden in der invasiven Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 Ets1 durch RNA-Interferenz unterdrückt und Änderungen im Genexpressionsprofil mit Hilfe von cDNA-Microarrays untersucht. Unter den Ets1-responsiven Genen war RhoGDI $\beta$ , ein Inhibitor der Rho-GTPase-abhängigen Migration. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war, den Zusammenhang zwischen Ets1 und RhoGDI $\beta$  anhand von Zelllinien und primären Mammakarzinomen zu verifizieren und die Bedeutung von RhoGDI $\beta$  in Brustkrebszellen zu untersuchen. In einer weiteren Microarray-Analyse wurde nach Zielgenen des Ets1-responsiven Genes PTHrP gesucht. Aus dieser Untersuchung ergab sich das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit, die Suche nach Korrelationen zwischen der Expression von PTHrP und seinen potenziellen Zielgenen in primären Mammakarzinombiopsien.

Anhand von Mammakarzinombiopsien konnte eine Korrelation zwischen der RhoGDI $\beta$ - und der Ets1-Expression nachgewiesen werden. Untersuchungen mit Hilfe der Chromatin-Immuno-Präzipitation zeigten zudem, dass Ets1 an den Promotorbereich des RhoGDI $\beta$ -Genes bindet. Dies legt den Schluss nahe, dass die Expression von RhoGDI $\beta$  direkt durch Ets1 positiv reguliert wird. Bei der Suche nach der Funktion von RhoGDI $\beta$  in Brustkrebszellen zeigte sich einerseits, dass RhoGDI $\beta$  die zelluläre Migration inhibiert, andererseits ergab eine cDNA-Microarray-Studie, dass RhoGDI $\beta$  den Tumorpromoter Cox-2 aktiviert. Dies konnte durch Q-RT-PCR und Westernblotanalyse bestätigt werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass RhoGDI $\beta$  vermutlich synergistisch mit Vav1 den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert, was dann die Expression von Cox-2 induziert. Sowohl die Expression von RhoGDI $\beta$  als auch die von Vav-1 korreliert mit der von Cox-2. Trotz des aktivierenden Effektes von RhoGDI $\beta$  auf den Tumorpromotor Cox-2 konnte kein Einfluss von RhoGDI $\beta$  auf das krankheitsfreie oder das Gesamtüberleben nachgewiesen werden.

RhoGDI $\beta$  hat damit zwei entgegenstehende Eigenschaften auf die Tumorentwicklung, nämlich zum Einen eine migrationshemmende Wirkung als RhoGDI, zum Anderen eine die Tumorprogression fördernde Wirkung über die Stimulation der Cox-2-Expression. Damit trägt Ets1 indirekt auch über RhoGDI $\beta$  zum Tumorprogress bei, indem es die Expression von Cox-2 reguliert. Die hohe Expression eines engen Verwandten von RhoGDI $\beta$ , nämlich RhoGDI $\alpha$ , bedingt zumindest auf immunhistochemischer Ebene eine bessere Prognose. Auf mRNA-Ebene dagegen scheint seine Expression keinen Einfluss auf das Überleben zu haben.

Bei der Suche nach Zielgenen des Ets1-responsiven PTHrP-Gens konnte einige Tumor-relevante Gene identifiziert werden. Neben ITGA6, PAI-1, uPA und KISS-1, auch die Zellzyklusregulatoren Cdc2 und Cdc25B. Im primären Mammakarzinom konnte eine signifikante Korrelation nur für die Expression von ITGA6, Cdc2 und Cdc25B mit der von PTHrP nachgewiesen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Vielzahl der Zusammenhänge verdeutlicht die erstaunliche Komplexität der mannigfaltigen Regulationsmechanismen von Ets-abhängigen Faktoren, die direkt oder indirekt zur Progression speziell des primären Mammakarzinoms beitragen. Das Verständnis der Bedeutung der Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren und der durch sie regulierten Gene beim Brustkrebs ist die unabdingbare Voraussetzung zur Erforschung und erfolgreichen Behandlung dieser Erkrankung, was letztlich den betroffenen Patientinnen zu Gute kommt.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Adamson, P., Etienne, S., Couraud, P. O., Calder, V., Greenwood, J.: Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol* 162 (1999) 2964-73.
2. Adra, C. N., Manor, D., Ko, J. L., Zhu, S., Horiuchi, T., Van Aelst, L., Cerione, R. A., Lim, B.: RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 4279-84.
3. Akisawa, N., Nishimori, I., Iwamura, T., Onishi, S., Hollingsworth, M.A.: High levels of ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 258 (1999) 395-400.
4. Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., Pestell, R.G.: Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270 (1995) 23589-97.
5. Allenspach, E. J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A. G., Cannon, J. L., Takahashi, S. M., Morgan, R., Burkhardt, J. K., Sperling, A.I.: ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15 (2001) 739-50.
6. American Cancer Society: *Cancer Facts and Figures: 2003*. American Cancer Society, Atlanta, 2003
7. Andreasen, P. A., Kj oller, L., Christensen, L., Duffy, M.J.: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72 (1997) 1-22.
8. Andrulis, I. L., Bull, S. B., Blackstein, M. E., Sutherland, D., Mak, C., Sidlofsky, S., Pritzker, K. P., Hartwick, R. W., 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., McCreedy, D.: 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 (1998) 1340-9.
9. Aoudjit, F., Vuori, K.: Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 20 (2001) 4995-5004.
10. Aparicio, O., Geisberg, J. V., Struhl, K.: Chromatin Immunoprecipitation for Determining the Association of Proteins with Specific Genomic Sequences In Vivo. *Current Protocols in Cell Biology* Unit 17.7 (2003) DOI: 10.1002/0471143030.cb1707s23.
11. Arbeitsgemeinschaft Bev lkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland: *Krebs in Deutschland. 4. Auflage; Arbeitsgemeinschaft Bev lkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbr cken, 2004*
12. Asher, G., Lotem, J., Tsvetkov, P., Reiss, V., Sachs, L., Shaul, Y.: P53 hot-spot mutants are resistant to ubiquitin-independent degradation by increased binding to NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 15065-70.
13. Assender, J. W., Gee, J. M. W., Lewis, I., Ellis, I. O., Robertson, J. F. R., Nicholson, R.I.: Protein kinase C isoform expression as a predictor of disease outcome on endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Pathol* 60 (2007) 1216-21.
14. Ayad, N. G., Rankin, S., Murakami, M., Jebanathirajah, J., Gygi, S., Kirschner, M.W.: Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* 113 (2003) 101-13.
15. Bader, M., Laczynska, E., Gehrmann, M., Munnes, M., Thomssen, C., J nicke, F., M ller, V.: Correlation between protein and RNA tissue concentration of invasion factors urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). *Kongre band zu 27th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium* 88 (2004) 197.
16. Bagnato, A., Spinella, F.: Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 14 (2003) 44-50.
17. Band, P. R., Le, N. D., Fang, R., Deschamps, M.: Carcinogenic and endocrine disrupting effects of cigarette smoke and risk of breast cancer. *Lancet* 360 (2002) 1044-9.
18. Bardou, V., Arpino, G., Elledge, R. M., Osborne, C. K., Clark, G.M.: Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21 (2003) 1973-9.
19. Barnes, N. L. P., Warnberg, F., Farnie, G., White, D., Jiang, W., Anderson, E., Bundred, N.J.: Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *Br J Cancer* 96 (2007) 575-82.
20. Barrett, J. M., Puglia, M. A., Singh, G., Tozer, R.G.: Expression of Ets-related transcription factors and matrix metalloproteinase genes in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 72 (2002) 227-32.
21. Bartolom , R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., S nchez-Mateos, P., Bustelo, X. R., Teixid , J.: Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res* 66 (2006) 248-58.
22. Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P., Crabtree, G.R.: Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275 (1997) 1930-4.
23. Behrens, P., Rothe, M., Wellmann, A., Krischler, J., Wernert, N.: The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* 194 (2001) 43-50.
24. Beier, F., Ali, Z., Mok, D., Taylor, A. C., Leask, T., Albanese, C., Pestell, R. G., LuValle, P.: TGFbeta and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression. *Mol Biol Cell* 12 (2001) 3852-63.
25. Bendre, M. S., Montague, D. C., Peery, T., Akel, N. S., Gaddy, D., Suva, L.J.: Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 33 (2003) 28-37.
26. Benoit, V., Relic, B., Leval Xd, X. D., Chariot, A., Merville, M., Bours, V.: Regulation of HER-2 oncogene expression by cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oncogene* 23 (2004) 1631-5.
27. Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L., Moses, H.L.: Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12 (2001) 27-36.



28. Bi, F., Debreceeni, B., Zhu, K., Salani, B., Eva, A., Zheng, Y.: Autoinhibition mechanism of proto-Dbl. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 1463-74.
29. Birch, M. A., Carron, J. A., Scott, M., Fraser, W. D., Gallagher, J.A.: Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor expression and mitogenic responses in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 72 (1995) 90-5.
30. Bishop, A. L., Hall, A.: Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2 (2000) 241-55.
31. Blackhall, F. H., Wigle, D. A., Jurisica, I., Pintilie, M., Liu, N., Darling, G., Johnston, M. R., Keshavjee, S., Waddell, T., Winton, T., Shepherd, F. A., Tsao, M.: Validating the prognostic value of marker genes derived from a non-small cell lung cancer microarray study. *Lung Cancer* 46 (2004) 197-204.
32. Böcker W., Kunze K.-D.: Mamma. In: Böcker W., Denk H., Heitz P.U. (Hrsg.): Pathologie. 2. Auflage; Urban und Fischer, München, Jena, 2001
33. Boland, G. P., Butt, I. S., Prasad, R., Knox, W. F., Bundred, N.J.: COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer* 90 (2004) 423-9.
34. Boudreau, N., Werb, Z., Bissell, M.J.: Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 3509-13.
35. Boulukos, K. E., Pognonec, P., Rabault, B., Begue, A., Ghysdael, J.: Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol Cell Biol* 9 (1989) 5718-21.
36. Bourmeyster, N., Stasia, M. J., Garin, J., Gagnon, J., Boquet, P., Vignais, P.V.: Copurification of rho protein and the rho-GDP dissociation inhibitor from bovine neutrophil cytosol. Effect of phosphoinositides on rho ADP-ribosylation by the C3 exoenzyme of *Clostridium botulinum*. *Biochemistry* 31 (1992) 12863-9.
37. Bouzahzah, B., Albanese, C., Ahmed, F., Pixley, F., Lisanti, M. P., Segall, J. D., Condeelis, J., Joyce, D., Minden, A., Der, C. J., Chan, A., Symons, M., Pestell, R.G.: Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. *Mol Med* 7 (2001) 816-30.
38. Boyd, D.: Invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 15 (1996) 77-89.
39. Braga, V. M., Betson, M., Li, X., Lamarche-Vane, N.: Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol Biol Cell* 11 (2000) 3703-21.
40. Bratthauer, G. L., Moinfar, F., Stamatakos, M. D., Mezzetti, T. P., Shekitka, K. M., Man, Y., Tavassoli, F.A.: Combined E-cadherin and high molecular weight cytokeratin immunoprofile differentiates lobular, ductal, and hybrid mammary intraepithelial neoplasias. *Hum Pathol* 33 (2002) 620-7.
41. Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F., Gulbins, E.: Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153. *J Biol Chem* 272 (1997) 22173-81.
42. Brueggemeier, R. W., Diaz-Cruz, E. S., Li, P., Sugimoto, Y., Lin, Y. C., Shapiro, C.L.: Translational studies on aromatase, cyclooxygenases, and enzyme inhibitors in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95 (2005) 129-36.
43. Brueggemeier, R. W., Quinn, A. L., Parrett, M. L., Joarder, F. S., Harris, R. E., Robertson, F.M.: Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett* 140 (1999) 27-35.
44. Brueggemeier, R. W., Richards, J. A., Petrel, T.A.: Aromatase and cyclooxygenases: enzymes in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86 (2003) 501-7.
45. Brunet, N., Morin, A., Olofsson, B.: RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain. *Traffic* 3 (2002) 342-57.
46. Budman, D. R., Soong, R., Calabro, A., Tai, J., Diasio, R.: Identification of potentially useful combinations of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase antagonists with conventional cytotoxic agents using median effect analysis. *Anticancer Drugs* 17 (2006) 921-8.
47. Buerger, H., Mommers, E. C., Littmann, R., Simon, R., Diallo, R., Poremba, C., Dockhorn-Dworniczak, B., van Diest, P. J., Boecker, W.: 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 (2001) 165-70.
48. Bustelo, X. R.: Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 1461-77.
49. Bustelo, X. R.: Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* 20 (2001) 6372-81.
50. Böttger, T. C., Maschek, H., Lobo, M., Gottwohl, R. G., Brenner, W., Junginger, T.: Prognostic value of immunohistochemical expression of beta-1 integrin in pancreatic carcinoma. *Oncology* 56 (1999) 308-13.
51. Cammarano, M. S., Minden, A.: Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways. *J Biol Chem* 276 (2001) 25876-82.
52. Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantinidou, D., Ali, S., Nakshatri, H.: Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276 (2001) 9817-24.
53. Cataisson, C., Lieberherr, M., Cros, M., Gauville, C., Graulet, A. M., Cotton, J., Calvo, F., de Vernejoul, M. C., Foley, J., Bouizar, Z.: Parathyroid hormone-related peptide stimulates proliferation of highly tumorigenic human SV40-immortalized breast epithelial cells. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 2129-39.
54. Cazales, M., Schmitt, E., Montembault, E., Dozier, C., Prigent, C., Ducommun, B.: CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* 4 (2005) 1233-8.
55. Cerione, R. A.: Cdc42: new roads to travel. *Trends Cell Biol* 14 (2004) 127-32.
56. Chang, C. H., Scott, G. K., Kuo, W. L., Xiong, X., Suzdaltseva, Y., Park, J. W., Sayre, P., Erny, K., Collins, C., Gray, J. W., Benz, C.C.: ESX: a structurally unique Ets overexpressed early during human breast tumorigenesis. *Oncogene* 14 (1997) 1617-22.
57. Chang, S., Liu, C. H., Conway, R., Han, D. K., Nithipatikom, K., Trifan, O. C., Lane, T. F., Hla, T.: Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 591-6.
58. Chang, S., Parker, S. L., Pham, T., Buzdar, A. U., Hursting, S.D.: Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute, 1975-1992. *Cancer* 82 (1998) 2366-72.

59. Chatah, N. E., Abrams, C.S.: G-protein-coupled receptor activation induces the membrane translocation and activation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase I alpha by a Rac- and Rho-dependent pathway. *J Biol Chem* 276 (2001) 34059-65.
60. Chen, Z., Fisher, R. J., Riggs, C. W., Rhim, J. S., Lautenberger, J.A.: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res* 57 (1997) 2013-9.
61. Chiariello, M., Marinissen, M. J., Gutkind, J.S.: Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases. *Nat Cell Biol* 3 (2001) 580-6.
62. Chin, B. Y., Mohsenin, A., Li, S. X., Choi, A. M., Choi, M.E.: Stimulation of pro-alpha(1)(I) collagen by TGF-beta(1) in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 280 (2001) F495-504.
63. Chuang, T. H., Bohl, B. P., Bokoch, G.M.: Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation. *J Biol Chem* 268 (1993) 26206-11.
64. Chumbalkar, V. C., Subhashini, C., Dhople, V. M., Sundaram, C. S., Jagannadham, M. V., Kumar, K. N., Srinivas, P. N. B. S., Mythili, R., Rao, M. K., Kulkarni, M. J., Hegde, S., Hegde, A. S., Samual, C., Santosh, V., Singh, L., Sirdeshmukh, R.: Differential protein expression in human gliomas and molecular insights. *Proteomics* 5 (2005) 1167-77.
65. Clark, G. M., Osborne, C. K., McGuire, W.L.: Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* 2 (1984) 1102-9.
66. Claus, E. B., Chu, P., Howe, C. L., Davison, T. L., Stern, D. F., Carter, D., DiGiovanna, M.P.: Pathobiologic findings in DCIS of the breast: morphologic features, angiogenesis, HER-2/neu and hormone receptors. *Exp Mol Pathol* 70 (2001) 303-16.
67. Conlan, L. A., Martin, T. J., Gillespie, M.T.: The COOH-terminus of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) interacts with beta-arrestin 1B. *FEBS Lett* 527 (2002) 71-5.
68. Cordes, N., Beinke, C., Plasswilm, L., van Beuningen, D.: Irradiation and various cytotoxic drugs enhance tyrosine phosphorylation and beta(1)-integrin clustering in human A549 lung cancer cells in a substratum-dependent manner in vitro. *Strahlenther Onkol* 180 (2004) 157-64.
69. Cristofanilli, M., Buzdar, A. U., Hortobágyi, G.N.: Update on the management of inflammatory breast cancer. *Oncologist* 8 (2003) 141-8.
70. Crowe, J. P. J., Gordon, N. H., Hubay, C. A., Shenk, R. R., Zollinger, R. M., Brumberg, D. J., McGuire, W. L., Shuck, J.M.: Estrogen receptor determination and long term survival of patients with carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 173 (1991) 273-8.
71. Damiano, J. S.: Integrins as novel drug targets for overcoming innate drug resistance. *Curr Cancer Drug Targets* 2 (2002) 37-43.
72. Danen, E. H., Sonneveld, P., Sonnenberg, A., Yamada, K.M.: Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression. *J Cell Biol* 151 (2000) 1413-22.
73. Dannenberg, A. J., Lippman, S. M., Mann, J. R., Subbaramaiah, K., DuBois, R.N.: Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol* 23 (2005) 254-66.
74. Dannenberg, A. J., Subbaramaiah, K.: Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell* 4 (2003) 431-6.
75. Danø, K., Andreasen, P. A., Grøndahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L. S., Skriver, L.: Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44 (1985) 139-266.
76. Davidson, B., Risberg, B., Goldberg, I., Nesland, J. M., Berner, A., Tropé, C. G., Kristensen, G. B., Bryne, M., Reich, R.: Ets-1 mRNA expression in effusions of serous ovarian carcinoma patients is a marker of poor outcome. *Am J Surg Pathol* 25 (2001) 1493-500.
77. Dawson, A. E., Austin, R. E. J., Weinberg, D.S.: Nuclear grading of breast carcinoma by image analysis. Classification by multivariate and neural network analysis. *Am J Clin Pathol* 95 (1991) S29-37.
78. De Placido, S., Carlomagno, C., De Laurentiis, M., Bianco, A.R.: c-erbB2 expression predicts tamoxifen efficacy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1998) 55-64.
79. DeKok, J. B., Roelofs, R. W., Giesendorf, B. A., Pennings, J. L., Waas, E. T., Feuth, T., Swinkels, D. W., Span, P.N.: Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85 (2005) 154-9.
80. DerMardirossian, C., Bokoch, G.M.: GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15 (2005) 356-63.
81. DerMardirossian, C., Schnelzer, A., Bokoch, G.M.: Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol Cell* 15 (2004) 117-27.
82. Diab, S. G., Clark, G. M., Osborne, C. K., Libby, A., Allred, D. C., Elledge, R.M.: Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol* 17 (1999) 1442-8.
83. Dittmer, A., Vetter, M., Schunke, D., Span, P. N., Sweep, F., Thomssen, C., Dittmer, J.: Parathyroid hormone-related protein regulates tumor-relevant genes in breast cancer cells. *J Biol Chem* 281 (2006) 14563-72.
84. Dittmer, J.: The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2 (2003) 29.
85. Dittmer, J.: The importance of PTHrP for cancer development. *Gene Ther Mol Biol* 8 (2004) 451-464.
86. Dittmer, J.: Mechanisms involved in the Regulation of PTHrP Expression. In: C. Luparello (Ed.): *Novel Aspects of PTHrP Physiopathology*; Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, USA, 2007
87. Dittmer, J., Vetter, M., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Kölbl, H.: Importance of ets1 proto-oncogene for breast cancer progression. *Zentralbl Gynakol* 126 (2004) 269-71.
88. Dorée, M., Hunt, T.: From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 115 (2002) 2461-4.
89. Dovas, A., Couchman, J.R.: RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 390 (2005) 1-9.
90. Droufakou, S., Deshmane, V., Roylance, R., Hanby, A., Tomlinson, I., Hart, I.R.: Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer* 92 (2001) 404-8.

91. Dublin, E., Hanby, A., Patel, N. K., Liebman, R., Barnes, D.: Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma. Fibroblastic expression has strong associations with tumor pathology. *Am J Pathol* 157 (2000) 1219-27.
92. Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., Lipsky, P.E.: Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12 (1998) 1063-73.
93. Duffy, M. J.: Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 48 (2002) 1194-7.
94. Duffy, M. J.: The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 10 (2004) 39-49.
95. Duggan, C., Kennedy, S., Kramer, M. D., Barnes, C., Elvin, P., McDermott, E., O'Higgins, N., Duffy, M.J.: Plasminogen activator inhibitor type 2 in breast cancer. *Br J Cancer* 76 (1997) 622-7.
96. Duggan, C., Maguire, T., McDermott, E., O'Higgins, N., Fennelly, J. J., Duffy, M.J.: Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 61 (1995) 597-600.
97. Dunbar, M. E., Young, P., Zhang, J. P., McCaughern-Carucci, J., Lanske, B., Orloff, J. J., Karaplis, A., Cunha, G., Wysolmerski, J.J.: Stromal cells are critical targets in the regulation of mammary ductal morphogenesis by parathyroid hormone-related protein. *Dev Biol* 203 (1998) 75-89.
98. Eckel, K. L., Tentler, J. J., Cappetta, G. J., Diamond, S. E., Gutierrez-Hartmann, A.: The epithelial-specific ETS transcription factor ESX/ESE-1/Elf-3 modulates breast cancer-associated gene expression. *DNA Cell Biol* 22 (2003) 79-94.
99. Edwards, J., Mukherjee, R., Munro, A. F., Wells, A. C., Almushatat, A., Bartlett, J.M.S.: HER2 and COX2 expression in human prostate cancer. *Eur J Cancer* 40 (2004) 50-5.
100. Engers, R., Springer, E., Michiels, F., Collard, J. G., Gabbert, H.E.: Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* 276 (2001) 41889-97.
101. Ernster, V. L., Barclay, J.: Increases in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast in relation to mammography: a dilemma. *J Natl Cancer Inst Monogr* (1997) 151-6.
102. Etienne-Manneville, S., Hall, A.: Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420 (2002) 629-35.
103. Falzon, M., Du, P.: Enhanced growth of MCF-7 breast cancer cells overexpressing parathyroid hormone-related peptide. *Endocrinology* 141 (2000) 1882-92.
104. Fauré, J., Dagher, M.C.: Interactions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI). *Biochimie* 83 (2001) 409-14.
105. Feng, Y., Goulet, A., Nelson, M.A.: Identification and characterization of the human Cdc212 gene promoter. *Gene* 330 (2004) 75-84.
106. Fernandez-Zapico, M. E., Gonzalez-Paz, N. C., Weiss, E., Savoy, D. N., Molina, J. R., Fonseca, R., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Urrutia, R., Billadeau, D.D.: Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell* 7 (2005) 39-49.
107. Ferrari, S. L., Behar, V., Chorev, M., Rosenblatt, M., Bisello, A.: Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is protein kinase C-dependent and involves beta-arrestin2. Real-time monitoring by fluorescence microscopy. *J Biol Chem* 274 (1999) 29968-75.
108. Ferrier, C. M., de Witte, H. H., Straatman, H., van Tienoven, D. H., van Geloof, W. L., Rietveld, F. J., Sweep, C. G., Ruiter, D. J., van Muijen, G.N.: Comparison of immunohistochemistry with immunoassay (ELISA) for the detection of components of the plasminogen activation system in human tumour tissue. *Br J Cancer* 79 (1999) 1534-41.
109. Fidler, I. J.: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50 (1990) 6130-8.
110. Fisher, E. R., Kenny, J. P., Sass, R., Dimitrov, N. V., Siderits, R. H., Fisher, B.: Medullary cancer of the breast revisited. *Breast Cancer Res Treat* 16 (1990) 215-29.
111. Fitzgibbons, P. L., Page, D. L., Weaver, D., Thor, A. D., Allred, D. C., Clark, G. M., Ruby, S. G., O'Malley, F., Simpson, J. F., Connolly, J. L., Hayes, D. F., Edge, S. B., Lichter, A., Schnitt, S.J.: Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124 (2000) 966-78.
112. Foekens, J. A., Buessecker, F., Peters, H. A., Krainick, U., van Putten, W. L., Look, M. P., Klijn, J. G., Kramer, M.D.: Plasminogen activator inhibitor-2: prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res* 55 (1995) 1423-7.
113. Foekens, J. A., Schmitt, M., van Putten, W. L., Peters, H. A., Kramer, M. D., Jänicke, F., Klijn, J.G.: Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 12 (1994) 1648-58.
114. Forget, M., Desrosiers, R. R., Gingras, D., Béliveau, R.: Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem J* 361 (2002) 243-54.
115. Fox, S. B., Smith, K., Hollyer, J., Greenall, M., Hastrich, D., Harris, A.L.: The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res Treat* 29 (1994) 41-9.
116. Friedrichs, K., Ruiz, P., Franke, F., Gille, I., Terpe, H. J., Imhof, B.A.: High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res* 55 (1995) 901-6.
117. Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M., Kaina, B.: Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* 87 (2002) 635-44.
118. Fritz, G., Just, I., Kaina, B.: Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 81 (1999) 682-7.
119. Frost, J. A., Steen, H., Shapiro, P., Lewis, T., Ahn, N., Shaw, P. E., Cobb, M.H.: Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO J* 16 (1997) 6426-38.
120. Fujita, D., Yamashita, N., Iita, S., Amano, H., Yamada, S., Sakamoto, K.: Prostaglandin E2 induced the differentiation of osteoclasts in mouse osteoblast-depleted bone marrow cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68 (2003) 351-8.
121. Georgian-Smith, D., Lawton, T.J.: Calcifications of lobular carcinoma in situ of the breast: radiologic-pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 176 (2001) 1255-9.

122. Ghozi, M. C., Bernstein, Y., Negreanu, V., Levanon, D., Groner, Y.: Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 1935-40.
123. Gildea, J. J., Seraj, M. J., Oxford, G., Harding, M. A., Hampton, G. M., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Conaway, M. R., Theodorescu, D.: RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer. *Cancer Res* 62 (2002) 6418-23.
124. Gilles, C., Polette, M., Birembaut, P., Br nner, N., Thompson, E.W.: Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 15 (1997) 519-26.
125. Gjerstorff, M. F., Benoit, V. M., Laenkholm, A., Nielsen, O., Johansen, L. E., Ditzel, H.J.: Identification of genes with altered expression in medullary breast cancer vs. ductal breast cancer and normal breast epithelia. *Int J Oncol* 28 (2006) 1327-35.
126. Goltzman, D., Karaplis, A. C., Kremer, R., Rabbani, S.A.: Molecular basis of the spectrum of skeletal complications of neoplasia. *Cancer* 88 (2000) 2903-8.
127. Goto, T., Takano, M., Sakamoto, M., Kondo, A., Hirata, J., Kita, T., Tsuda, H., Tenjin, Y., Kikuchi, Y.: Gene expression profiles with cDNA microarray reveal RhoGDI as a predictive marker for paclitaxel resistance in ovarian cancers. *Oncol Rep* 15 (2006) 1265-71.
128. Gregorio, R., I niguez, M. A., Fresno, M., Alemany, S.: Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J Biol Chem* 276 (2001) 27003-9.
129. Grill, V., Rankin, W., Martin, T.J.: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and hypercalcaemia. *Eur J Cancer* 34 (1998) 222-9.
130. Grimshaw, M. J.: Endothelins in breast tumour cell invasion. *Cancer Lett* 222 (2005) 129-38.
131. Grimshaw, M. J., Hagemann, T., Ayhan, A., Gillett, C. E., Binder, C., Balkwill, F.R.: A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer Res* 64 (2004) 2461-8.
132. Grimshaw, M. J., Naylor, S., Balkwill, F.R.: Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol Cancer Ther* 1 (2002) 1273-81.
133. Grimshaw, M. J., Wilson, J. L., Balkwill, F.R.: Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur J Immunol* 32 (2002) 2393-400.
134. Grizot, S., Faur , J., Fieschi, F., Vignais, P. V., Dagher, M. C., Pebay-Peyroula, E.: Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *Biochemistry* 40 (2001) 10007-13.
135. Groysman, M., Hornstein, I., Alcover, A., Katzav, S.: Vav1 and Ly-GDI two regulators of Rho GTPases, function cooperatively as signal transducers in T cell antigen receptor-induced pathways. *J Biol Chem* 277 (2002) 50121-30.
136. Groysman, M., Russek, C. S., Katzav, S.: Vav, a GDP/GTP nucleotide exchange factor, interacts with GDIs, proteins that inhibit GDP/GTP dissociation. *FEBS Lett* 467 (2000) 75-80.
137. Guasch, R. M., Scambler, P., Jones, G. E., Ridley, A.J.: RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 4761-71.
138. Gui, G. P., Wells, C. A., Browne, P. D., Yeomans, P., Jordan, S., Puddefoot, J. R., Vinson, G. P., Carpenter, R.: Integrin expression in primary breast cancer and its relation to axillary nodal status. *Surgery* 117 (1995) 102-8.
139. Guillemot, J. C., Kruskal, B. A., Adra, C. N., Zhu, S., Ko, J. L., Burch, P., Nocka, K., Seetoo, K., Simons, E., Lim, B.: Targeted disruption of guanosine diphosphate-dissociation inhibitor for Rho-related proteins, GDID4: normal hematopoietic differentiation but subtle defect in superoxide production by macrophages derived from in vitro embryonal stem cell differentiation. *Blood* 88 (1996) 2722-31.
140. Guise, T. A.: Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 88 (2000) 2892-8.
141. Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T., Mundy, G.R.: Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98 (1996) 1544-9.
142. Gullick, W. J., Love, S. B., Wright, C., Barnes, D. M., Gusterson, B., Harris, A. L., Altman, D.G.: c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 63 (1991) 434-8.
143. Gupta, G. P., Nguyen, D. X., Chiang, A. C., Bos, P. D., Kim, J. Y., Nadal, C., Gomis, R. R., Manova-Todorova, K., Massagu , J.: Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446 (2007) 765-70.
144. Gupta, S. K., Douglas-Jones, A. G., Fenn, N., Morgan, J. M., Mansel, R.E.: The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). *Cancer* 80 (1997) 1740-5.
145. Gusterson, B. A., Gelber, R. D., Goldhirsch, A., Price, K. N., S ve-S derborgh, J., Anbazhagan, R., Styles, J., Rudenstam, C. M., Golouh, R., Reed, R., et al.: Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 10 (1992) 1049-56.
146. Hadden, J. W.: The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Int J Immunopharmacol* 21 (1999) 79-101.
147. Hagemann, T., Binder, C., Binder, L., Pukrop, T., Tr mper, L., Grimshaw, M.J.: Expression of endothelins and their receptors promotes an invasive phenotype of breast tumor cells but is insufficient to induce invasion in benign cells. *DNA Cell Biol* 24 (2005) 766-76.
148. Han, B., Nakamura, M., Mori, I., Nakamura, Y., Kakudo, K.: Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer (Review). *Oncol Rep* 14 (2005) 105-12.
149. Hannigan, G., Troussard, A. A., Dedhar, S.: Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 51-63.
150. Hansen, S. H., Zegers, M. M., Woodrow, M., Rodriguez-Viciano, P., Chardin, P., Mostov, K. E., McMahon, M.: Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 9364-75.
151. Harada, N., Mizoi, T., Kinouchi, M., Hoshi, K., Ishii, S., Shiiba, K., Sasaki, I., Matsuno, S.: Introduction of antisense CD44S CDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 91 (2001) 67-75.

152. Harbeck, N., Dettmar, P., Thomssen, C., Berger, U., Ulm, K., Kates, R., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H., Schmitt, M.: Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *Br J Cancer* 80 (1999) 419-26.
153. Harbeck, N., Kates, R. E., Look, M. P., Meijer-Van Gelder, M. E., Klijn, J. G. M., Krüger, A., Kiechle, M., Jänicke, F., Schmitt, M., Foekens, J.A.: 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 (2002) 4617-22.
154. Harbeck, N., Kates, R. E., Schmitt, M.: 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 (2002) 1000-7.
155. Harbeck, N., Kates, R. E., Schmitt, M., Gauger, K., Kiechle, M., Janicke, F., Thomassen, C., Look, M. P., Foekens, J.A.: Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clin Breast Cancer* 5 (2004) 348-52.
156. Harris, J. R., Lippman, M. E., Morrow, M., Osborne, C.K.: *Diseases of the Breast*. 3rd edition; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004
157. Harvey, J. M., Clark, G. M., Osborne, C. K., Allred, D.C.: Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17 (1999) 1474-81.
158. Hastings, R. H., Quintana, R. A., Sandoval, R., Burton, D. W., Deftos, L.J.: Amino-terminal and midmolecule parathyroid hormone-related protein, phosphatidylcholine, and type II cell proliferation in silica-injured lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285 (2003) L1312-22.
159. Hazlehurst, L. A., Damiano, J. S., Buyuksal, I., Pledger, W. J., Dalton, W.S.: Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene* 19 (2000) 4319-27.
160. Henderson, I. C., Patek, A.J.: The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1998) 261-88.
161. Henderson, M. A., Danks, J. A., Slavin, J. L., Byrnes, G. B., Choong, P. F. M., Spillane, J. B., Hopper, J. L., Martin, T.J.: Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis. *Cancer Res* 66 (2006) 2250-6.
162. Henderson, M., Danks, J., Moseley, J., Slavin, J., Harris, T., McKinlay, M., Hopper, J., Martin, T.: Parathyroid hormone-related protein production by breast cancers, improved survival, and reduced bone metastases. *J Natl Cancer Inst* 93 (2001) 234-7.
163. Henson, D. E., Ries, L., Freedman, L. S., Carriaga, M.: Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer* 68 (1991) 2142-9.
164. Hilsenbeck, S. G., Ravdin, P. M., de Moor, C. A., Chamness, G. C., Osborne, C. K., Clark, G.M.: Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1998) 227-37.
165. Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheiderei, C., Strauss, M.: NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 2690-8.
166. Hiraga, T., Myoui, A., Choi, M. E., Yoshikawa, H., Yoneda, T.: Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* 66 (2006) 2067-73.
167. Hirai, A., Nakamura, S., Noguchi, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Tatsuno, I., Oeda, T., Tahara, K., Terano, T., Narumiya, S., Kohn, L. D., Saito, Y.: Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J Biol Chem* 272 (1997) 13-6.
168. Hiraki, A., Ueoka, H., Bessho, A., Segawa, Y., Takigawa, N., Kiura, K., Eguchi, K., Yoneda, T., Tanimoto, M., Harada, M.: Parathyroid hormone-related protein measured at the time of first visit is an indicator of bone metastases and survival in lung carcinoma patients with hypercalcemia. *Cancer* 95 (2002) 1706-13.
169. Hiraoka, K., Kaibuchi, K., Ando, S., Musha, T., Takaishi, K., Mizuno, T., Asada, M., Ménard, L., Tomhave, E., Didsbury, J., et al.: Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, smg GDS and rho GDI, are active on multiple small GTP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 182 (1992) 921-30.
170. Hoey, R. P., Sanderson, C., Iddon, J., Brady, G., Bundred, N. J., Anderson, N.G.: The parathyroid hormone-related protein receptor is expressed in breast cancer bone metastases and promotes autocrine proliferation in breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 88 (2003) 567-73.
171. Hoffman, G. R., Cerione, R.A.: Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett* 513 (2002) 85-91.
172. Hoffman, G. R., Nassar, N., Cerione, R.A.: Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* 100 (2000) 345-56.
173. Holland, R., Peterse, J. L., Millis, R. R., Eusebi, V., Faverly, D., van de Vijver, M. J., Zafrani, B.: Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol* 11 (1994) 167-80.
174. Hondermarck, H., Vercoutter-Edouart, A. S., Révillion, F., Lemoine, J., el-Yazidi-Belkoura, I., Nurcombe, V., Peyrat, J.P.: Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling. *Proteomics* 1 (2001) 1216-32.
175. Huseby, R. A., Ownby, H. E., Brooks, S., Russo, J.: 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 (1990) 79-84.
176. Hübbel, V. F., Rhiem, K., Warm, M., Mallmann, P., Schmutzler, R.K.: Aktuelle Entwicklung der Inzidenz und Mortalität beim Mammakarzinom *Gynäkologe* 36 (2003) 746-752.
177. Ioannidis, J. P. A.: Microarrays and molecular research: noise discovery? *Lancet* 365 (2005) 454-5.
178. Irigoyen, J. P., Muñoz-Cánoves, P., Montero, L., Koziczak, M., Nagamine, Y.: The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 56 (1999) 104-32.

179. Ito, J., Kawano, N., Hirabayashi, M., Shimada, M.: The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on the inactivation of MAP kinase and p34cdc2 kinase during fertilization and activation in pig oocytes. *Reproduction* 128 (2004) 409-15.
180. Ito, Y.: Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene* 23 (2004) 4198-208.
181. Iwatsuki, K., Tanaka, K., Kaneko, T., Kazama, R., Okamoto, S., Nakayama, Y., Ito, Y., Satake, M., Takahashi, S., Miyajima, A., Watanabe, T., Hara, T.: Runx1 promotes angiogenesis by downregulation of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Oncogene* 24 (2005) 1129-37.
182. Jacobs, T. W., Pliss, N., Kouria, G., Schnitt, S.J.: Carcinomas in situ of the breast with indeterminate features: role of E-cadherin staining in categorization. *Am J Surg Pathol* 25 (2001) 229-36.
183. Jaffe, A. B., Hall, A.: Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* 84 (2002) 57-80.
184. Jain, J., Valge-Archer, V. E., Sinskey, A. J., Rao, A.: The AP-1 site at -150 bp, but not the NF-kappa B site, is likely to represent the major target of protein kinase C in the interleukin 2 promoter. *J Exp Med* 175 (1992) 853-62.
185. Jaiyesimi, I. A., Buzdar, A. U., Hortobagyi, G.: Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 10 (1992) 1014-24.
186. Janowski, B. A.: The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 12675-80.
187. Jauliac, S., López-Rodríguez, C., Shaw, L. M., Brown, L. F., Rao, A., Toker, A.: The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 4 (2002) 540-4.
188. Jiang, W. G., Watkins, G., Lane, J., Cunnick, G. H., Douglas-Jones, A., Mokbel, K., Mansel, R.E.: Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 6432-40.
189. Jinawath, N., Furukawa, Y., Hasegawa, S., Li, M., Tsunoda, T., Satoh, S., Yamaguchi, T., Imamura, H., Inoue, M., Shiozaki, H., Nakamura, Y.: Comparison of gene-expression profiles between diffuse- and intestinal-type gastric cancers using a genome-wide cDNA microarray. *Oncogene* 23 (2004) 6830-44.
190. Jo, M., Thomas, K. S., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P., Gonias, S.L.: Cooperativity between the Ras-ERK and Rho-Rho kinase pathways in urokinase-type plasminogen activator-stimulated cell migration. *J Biol Chem* 277 (2002) 12479-85.
191. Jones, M. B., Krutzsch, H., Shu, H., Zhao, Y., Liotta, L. A., Kohn, E. C., Petricoin, E.F.3.: Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2 (2002) 76-84.
192. Joneson, T., Bar-Sagi, D.: Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 5892-901.
193. Jonjić, N., Lucin, K., Krstulja, M., Iternicka, Z., Mustać, E.: Expression of beta-1 integrins on tumor cells of invasive ductal breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 189 (1993) 979-84.
194. Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J. U., Lee, R. J., Segall, J. E., Westwick, J. K., Der, C. J., Pestell, R.G.: Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* 274 (1999) 25245-9.
195. Jänicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., Sweep, C. G., Selbmann, H. K., Graeff, H., Schmitt, M.: 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* 93 (2001) 913-20.
196. Jänicke, F., Schmitt, M., Pache, L., Ulm, K., Harbeck, N., Höfler, H., Graeff, H.: Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24 (1993) 195-208.
197. Jüppner, H., Abou-Samra, A. B., Freeman, M., Kong, X. F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L. F. J., Hock, J., Potts, J. T. J., Kronenberg, H. M., et al.: A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254 (1991) 1024-6.
198. Kaneda, A., Kaminishi, M., Nakanishi, Y., Sugimura, T., Ushijima, T.: Reduced expression of the insulin-induced protein 1 and p41 Arp2/3 complex genes in human gastric cancers. *Int J Cancer* 100 (2002) 57-62.
199. Karaplis, A. C., Deckelbaum, R.A.: Role of PTHrP and PTH-1 receptor in endochondral bone development. *Front Biosci* 3 (1998) d795-803.
200. Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L., Kronenberg, H. M., Mulligan, R.C.: Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* 8 (1994) 277-89.
201. Katzav, S.: Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood* 103 (2004) 2443-51.
202. Katzav, S., Martin-Zanca, D., Barbacid, M.: vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J* 8 (1989) 2283-90.
203. Kawashima-Ohya, Y., Satakeda, H., Kuruta, Y., Kawamoto, T., Yan, W., Akagawa, Y., Hayakawa, T., Noshiro, M., Okada, Y., Nakamura, S., Kato, Y.: Effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on expressions of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in growth plate chondrocyte cultures. *Endocrinology* 139 (1998) 2120-7.
204. Kedzierski, R. M., Yanagisawa, M.: Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41 (2001) 851-76.
205. Keller, G., Vogelsang, H., Becker, I., Hutter, J., Ott, K., Candidus, S., Grundei, T., Becker, K. F., Mueller, J., Siewert, J. R., Höfler, H.: Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* 155 (1999) 337-42.
206. Kenny, F. S., Hui, R., Musgrove, E. A., Gee, J. M., Blamey, R. W., Nicholson, R. I., Sutherland, R. L., Robertson, J.F.: Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 2069-76.
207. Kettunen, E., Nissén, A. M., Ollikainen, T., Taavitsainen, M., Tapper, J., Mattson, K., Linnainmaa, K., Knuutila, S., El-Rifai, W.: Gene expression profiling of malignant mesothelioma cell lines: cDNA array study. *Int J Cancer* 91 (2001) 492-6.
208. Keyomarsi, K., Pardee, A.B.: Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 1112-6.
209. Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., Werb, Z.: Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280 (1998) 898-902.
210. Kim, K. J., Huh, S. J., Yang, J., Park, W., Nam, S. J., Kim, J. H., Lee, J. H., Kang, S. S., Lee, J. E., Kang, M. K., Park, Y. J., Nam, H.R.: Treatment results and prognostic factors of early breast cancer treated with a breast conserving operation and radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 35 (2005) 126-33.

211. Kim, T. Y., Kim, W. I., Smith, R. E., Kay, E.P.: Differential activity of TGF-beta2 on the expression of p27Kip1 and Cdk4 in actively cycling and contact inhibited rabbit corneal endothelial cells. *Mol Vis* 7 (2001) 261-70.
212. Kimura, M., Yanagita, Y., Fujisawa, T., Koida, T.: Study of time-course changes in annual recurrence rates for breast cancer: data analysis of 2,209 patients for 10 years post-surgery. *Breast Cancer Res Treat* 106 (2007) 407-11.
213. King, C. R., Kraus, M. H., Aaronson, S.A.: Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229 (1985) 974-6.
214. Kleer, C. G., van Golen, K. L., Zhang, Y., Wu, Z., Rubin, M. A., Merajver, S.D.: Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol* 160 (2002) 579-84.
215. Kline, J. B., Moore, D. J., Clevenger, C.V.: Activation and association of the Tec tyrosine kinase with the human prolactin receptor: mapping of a Tec/Vav1-receptor binding site. *Mol Endocrinol* 15 (2001) 832-41.
216. Korsching, E., Packeisen, J., Agelopoulos, K., Eisenacher, M., Voss, R., Isola, J., van Diest, P. J., Brandt, B., Boecker, W., Buerger, H.: Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 82 (2002) 1525-33.
217. Krebsregister: Brustkrebsinzidenz und Mortalität. Krebsregister, Münster, 2003
218. Kulkarni, N. H., Halladay, D. L., Miles, R. R., Gilbert, L. M., Frolik, C. A., Galvin, R. J. S., Martin, T. J., Gillespie, M. T., Onyia, J.E.: Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone. *J Cell Biochem* 95 (2005) 1178-90.
219. Laakso, M., Tanner, M., Nilsson, J., Wiklund, T., Erikstein, B., Kellokumpu-Lehtinen, P., Malmström, P., Wilking, N., Bergh, J., Isola, J.: Basolateral carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res* 12 (2006) 4185-91.
220. Lagios, M. D.: Heterogeneity of duct carcinoma in situ (DCIS): relationship of grade and subtype analysis to local recurrence and risk of invasive transformation. *Cancer Lett* 90 (1995) 97-102.
221. Lam, M. H., House, C. M., Tiganis, T., Mitchelhill, K. I., Sarcevic, B., Cures, A., Ramsay, R., Kemp, B. E., Martin, T. J., Gillespie, M.T.: Phosphorylation at the cyclin-dependent kinases site (Thr85) of parathyroid hormone-related protein negatively regulates its nuclear localization. *J Biol Chem* 274 (1999) 18559-66.
222. Lam, M. H., Olsen, S. L., Rankin, W. A., Ho, P. W., Martin, T. J., Gillespie, M. T., Moseley, J.M.: PTHrP and cell division: expression and localization of PTHrP in a keratinocyte cell line (HaCaT) during the cell cycle. *J Cell Physiol* 173 (1997) 433-46.
223. Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., Bertoglio, J.: Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* 15 (1996) 510-9.
224. Leal, C. B., Schmitt, F. C., Bento, M. J., Maia, N. C., Lopes, C.S.: Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer* 75 (1995) 2123-31.
225. Leffers, H., Nielsen, M. S., Andersen, A. H., Honoré, B., Madsen, P., Vandekerckhove, J., Celis, J.E.: Identification of two human Rho GDP dissociation inhibitor proteins whose overexpression leads to disruption of the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 209 (1993) 165-74.
226. Leissner, P., Verjat, T., Bachelot, T., Paye, M., Krause, A., Puisieux, A., Mougin, B.: Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer* 6 (2006) 216.
227. Lelias, J. M., Adra, C. N., Wulf, G. M., Guillemot, J. C., Khagad, M., Caput, D., Lim, B.: cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 1479-83.
228. Lelièvre, E., Lionneton, F., Soncin, F., Vandebunder, B.: The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 33 (2001) 391-407.
229. Lenburg, M. E., Liou, L. S., Gerry, N. P., Frampton, G. M., Cohen, H. T., Christman, M.F.: Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* 3 (2003) 31.
230. Leonard, D., Hart, M. J., Platko, J. V., Eva, A., Henzel, W., Evans, T., Cerione, R.A.: The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem* 267 (1992) 22860-8.
231. Lester, S.C., Cotran, R.S.: The Breast. In: Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. (Eds.): Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 6th edition; Elsevier Saunders, Philadelphia, 1999
232. Li, X., Tomita, M., Pilbeam, C. C., Breyer, R. M., Raisz, L.G.: Prostaglandin receptor EP2 mediates PGE2 stimulated hypercalcemia in mice in vivo. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 67 (2002) 173-80.
233. Lim, H. H., Surana, U.: Tome-1, weel1, and the onset of mitosis: coupled destruction for timely entry. *Mol Cell* 11 (2003) 845-6.
234. Lin, M., van Golen, K.L.: Rho-regulatory proteins in breast cancer cell motility and invasion. *Breast Cancer Res Treat* 84 (2004) 49-60.
235. Lincoln, D. W. 2., Bove, K.: The transcription factor Ets-1 in breast cancer. *Front Biosci* 10 (2005) 506-11.
236. Lincoln, D. W. 2., Phillips, P. G., Bove, K.: Estrogen-induced Ets-1 promotes capillary formation in an in vitro tumor angiogenesis model. *Breast Cancer Res Treat* 78 (2003) 167-78.
237. Lindemann, R. K., Ballschieter, P., Nordheim, A., Dittmer, J.: Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism. *J Biol Chem* 276 (2001) 46661-70.
238. Lindemann, R. K., Braig, M., Ballschieter, P., Guise, T. A., Nordheim, A., Dittmer, J.: Protein kinase Calpha regulates Ets1 transcriptional activity in invasive breast cancer cells. *Int J Oncol* 22 (2003) 799-805.
239. Linforth, R., Anderson, N., Hoey, R., Nolan, T., Downey, S., Brady, G., Ashcroft, L., Bundred, N.: Coexpression of parathyroid hormone related protein and its receptor in early breast cancer predicts poor patient survival. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 3172-7.

240. Liu, A. X., Rane, N., Liu, J. P., Prendergast, G.C.: RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 6906-12.
241. Liu, C. H., Chang, S. H., Narko, K., Trifan, O. C., Wu, M. T., Smith, E., Haudenschild, C., Lane, T. F., Hla, T.: Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 276 (2001) 18563-9.
242. Liu, Y., Lee, W., Wang, C., Chao, T., Chen, Y., Chen, J.H.: Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene* 24 (2005) 8277-90.
243. Longenecker, K., Read, P., Derewenda, U., Dauter, Z., Liu, X., Garrard, S., Walker, L., Somlyo, A. V., Nakamoto, R. K., Somlyo, A. P., Derewenda, Z.S.: How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (1999) 1503-15.
244. Look, M. P., van Putten, W. L. J., Duffy, M. J., Harbeck, N., Christensen, I. J., Thomssen, C., Kates, R., Spyrtos, F., Fernö, M., Eppenberger-Castori, S., Sweep, C. G. J. F., Ulm, K., Peyrat, J., Martin, P., Magdelenat, H., Brünner, N., Duggan, C., Lisboa, B. W., Bendahl, P., Quillien, V., Daver, A., Ricolleau, G., Meijer-van Gelder, M. E., Manders, P., Fiets, W. E., Blankenstein, M. A., Broët, P., Romain, S., Daxenbichler, G., Windbichler, G., Cufer, T., Borstnar, S., Kueng, W., Beex, L. V. A. M., Klijn, J. G. M., O'Higgins, N., Eppenberger, U., Jänicke, F., Schmitt, M., Foekens, J.A.: 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 (2002) 116-28.
245. Loskutoff, D. J., Curriden, S. A., Hu, G., Deng, G.: Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS* 107 (1999) 54-61.
246. Loveday, R. L., Greenman, J., Simcox, D. L., Speirs, V., Drew, P. J., Monson, J. R., Kerin, M.J.: Genetic changes in breast cancer detected by comparative genomic hybridisation. *Int J Cancer* 86 (2000) 494-500.
247. Lu, T., Burdelya, L. G., Swiatkowski, S. M., Boiko, A. D., Howe, P. H., Stark, G. R., Gudkov, A.V.: Secreted transforming growth factor beta2 activates NF-kappaB, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 7112-7.
248. Luparello, C., Romanotto, R., Tipa, A., Sirchia, R., Olmo, N., López de Silanes, I., Turnay, J., Lizarbe, M. A., Stewart, A.F.: Midregion parathyroid hormone-related protein inhibits growth and invasion in vitro and tumorigenesis in vivo of human breast cancer cells. *J Bone Miner Res* 16 (2001) 2173-81.
249. Luparello, C., Sirchia, R., Pupello, D.: PTHrP [67-86] regulates the expression of stress proteins in breast cancer cells inducing modifications in urokinase-plasminogen activator and MMP-1 expression. *J Cell Sci* 116 (2003) 2421-30.
250. MacKeigan, J. P., Clements, C. M., Lich, J. D., Pope, R. M., Hod, Y., Ting, J.P.: Proteomic profiling drug-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma: identification of RS/DJ-1 and RhoGDIalpha. *Cancer Res* 63 (2003) 6928-34.
251. MacLean, H. E., Guo, J., Knight, M. C., Zhang, P., Cobrinik, D., Kronenberg, H.M.: The cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) mediates proliferative actions of PTHrP in chondrocytes. *J Clin Invest* 113 (2004) 1334-43.
252. Mack, L., Kerkvliet, N., Doig, G., O'Malley, F.P.: Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma in situ of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erb B2, bcl-2, and ki-67. *Hum Pathol* 28 (1997) 974-9.
253. Madaule, P., Axel, R.: A novel ras-related gene family. *Cell* 41 (1985) 31-40.
254. Maioli, E., Fortino, V.: The complexity of parathyroid hormone-related protein signalling. *Cell Mol Life Sci* 61 (2004) 257-62.
255. Maluf, H. M., Swanson, P. E., Koerner, F.C.: Solid low-grade in situ carcinoma of the breast: role of associated lesions and E-cadherin in differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 25 (2001) 237-44.
256. Mannstadt, M., Jüppner, H., Gardella, T.J.: Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* 277 (1999) F665-75.
257. Marshall, L. M., Hunter, D. J., Connolly, J. L., Schnitt, S. J., Byrne, C., London, S. J., Colditz, G.A.: Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of lobular and ductal types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6 (1997) 297-301.
258. Martin, T. A., Watkins, G., Jiang, W.G.: KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 22 (2005) 503-11.
259. Massagué, J., Seoane, J., Wotton, D.: Smad transcription factors. *Genes Dev* 19 (2005) 2783-810.
260. Massfelder, T., Dann, P., Wu, T. L., Vasavada, R., Helwig, J. J., Stewart, A.F.: Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 13630-5.
261. Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., Tsukita, S.: Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140 (1998) 647-57.
262. Mattot, V., Vercamer, C., Soncin, F., Calmels, T., Huguët, C., Fafeur, V., Vandenbunder, B.: Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organization into capillary-like structures. *Oncogene* 19 (2000) 762-72.
263. Mehta, D., Rahman, A., Malik, A.B.: Protein kinase C-alpha signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem* 276 (2001) 22614-20.
264. Meijer-van Gelder, M. E., Look, M. P., Bolt-de Vries, J., Peters, H. A., Klijn, J. G., Foekens, J.A.: Clinical relevance of biologic factors in male breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 68 (2001) 249-60.
265. Mendelsohn, J., Baselga, J.: The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19 (2000) 6550-65.
266. Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J. K., Giancotti, F.G.: Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* 8 (2001) 115-27.
267. Michiels, S., Koscielny, S., Hill, C.: Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 365 (2005) 488-92.
268. Middleton, L. P., Palacios, D. M., Bryant, B. R., Krebs, P., Otis, C. N., Merino, M.J.: Pleomorphic lobular carcinoma: morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 24 (2000) 1650-6.
269. Miki, T., Yano, S., Hanibuchi, M., Kanematsu, T., Muguruma, H., Sone, S.: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is responsible for production of bone metastasis, but not visceral metastasis, by human small cell lung cancer SBC-5 cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Int J Cancer* 108 (2004) 511-5.



270. Minisini, A. M., Fabbro, D., Di Loreto, C., Pestrin, M., Russo, S., Cardellino, G. G., Andretta, C., Damante, G., Puglisi, F.: Markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 128 (2007) 112-7.
271. Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L., Massagué, J.: Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436 (2005) 518-24.
272. Moon, S. Y., Zheng, Y.: Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13 (2003) 13-22.
273. Moore, E., Magee, H., Coyne, J., Gorey, T., Dervan, P.A.: Widespread chromosomal abnormalities in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. Comparative genomic hybridization study of pure high-grade DCIS. *J Pathol* 187 (1999) 403-9.
274. Moores, S. L., Selfors, L. M., Fredericks, J., Breit, T., Fujikawa, K., Alt, F. W., Brugge, J. S., Swat, W.: Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 6364-73.
275. Morgan, H., Tumber, A., Hill, P.A.: Breast cancer cells induce osteoclast formation by stimulating host IL-11 production and downregulating granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Int J Cancer* 109 (2004) 653-60.
276. Moscow, J. A., He, R., Gnarr, J. R., Knutsen, T., Weng, Y., Zhao, W. P., Whang-Peng, J., Linehan, W. M., Cowan, K.H.: Examination of human tumors for rhoA mutations. *Oncogene* 9 (1994) 189-94.
277. Mukhopadhyay, R., Theriault, R. L., Price, J.E.: Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 17 (1999) 325-32.
278. Mundy, G. R.: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 584-93.
279. Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B., Nisen, P.: The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 110-6.
280. Nielsen, B. S., Sehested, M., Duun, S., Rank, F., Timshel, S., Rygaard, J., Johnsen, M., Danø, K.: Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer. *Lab Invest* 81 (2001) 1485-501.
281. Nikkola, J., Vihinen, P., Vlaykova, T., Hahka-Kemppinen, M., Heino, J., Pyrhönen, S.: Integrin chains beta1 and alpha5 as prognostic factors in human metastatic melanoma. *Melanoma Res* 14 (2004) 29-37.
282. Nishikawa, M., Stapleton, P. P., Freeman, T. A., Gaughan, J. P., Matsuda, T., Daly, J.M.: NS-398 inhibits tumor growth and liver metastasis of colon cancer through induction of apoptosis and suppression of the plasminogen activation system in a mouse model. *J Am Coll Surg* 199 (2004) 428-35.
283. Nishizaki, T., Chew, K., Chu, L., Isola, J., Kallioniemi, A., Weidner, N., Waldman, F.M.: Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 74 (1997) 513-7.
284. Nobes, C. D., Lauritzen, I., Mattei, M. G., Paris, S., Hall, A., Chardin, P.: A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 141 (1998) 187-97.
285. Nomanbhoy, T., Cerione, R.A.: Fluorescence assays of Cdc42 interactions with target/effector proteins. *Biochemistry* 38 (1999) 15878-84.
286. Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M., Burridge, K.: Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem* 276 (2001) 33305-8.
287. Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D., Graves, B.J.: Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev* 6 (1992) 975-90.
288. O'Brien, L. E., Jou, T. S., Pollack, A. L., Zhang, Q., Hansen, S. H., Yurchenco, P., Mostov, K.E.: Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat Cell Biol* 3 (2001) 831-8.
289. O'Neill, P. A., Shaaban, A. M., West, C. R., Dodson, A., Jarvis, C., Moore, P., Davies, M. P. A., Sibson, D. R., Foster, C.S.: Increased risk of malignant progression in benign proliferating breast lesions defined by expression of heat shock protein 27. *Br J Cancer* 90 (2004) 182-8.
290. Oda, N., Abe, M., Sato, Y.: ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. *J Cell Physiol* 178 (1999) 121-32.
291. Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J. P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P. G., Rao, A.: Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6 (2000) 539-50.
292. Ono, K., Akatsu, T., Murakami, T., Kitamura, R., Yamamoto, M., Shinomiya, N., Rokutanda, M., Sasaki, T., Amizuka, N., Ozawa, H., Nagata, N., Kugai, N.: Involvement of cyclo-oxygenase-2 in osteoclast formation and bone destruction in bone metastasis of mammary carcinoma cell lines. *J Bone Miner Res* 17 (2002) 774-81.
293. Orloff, J. J., Ganz, M. B., Nathanson, M. H., Moyer, M. S., Kats, Y., Mitnick, M., Behal, A., Gasalla-Herraiz, J., Isaacs, C.M.: A midregion parathyroid hormone-related peptide mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol trisphosphate in a squamous carcinoma cell line. *Endocrinology* 137 (1996) 5376-85.
294. Osborne, C. K., Bardou, V., Hopp, T. A., Chamness, G. C., Hilsenbeck, S. G., Fuqua, S. A. W., Wong, J., Allred, D. C., Clark, G. M., Schiff, R.: Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95 (2003) 353-61.
295. Oshita, F., Kameda, Y., Hamanaka, N., Saito, H., Yamada, K., Noda, K., Mitsuda, A.: High expression of integrin beta1 and p53 is a greater poor prognostic factor than clinical stage in small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 27 (2004) 215-9.
296. Ottino, P., Bazan, H.E.: Corneal stimulation of MMP-1, -9 and uPA by platelet-activating factor is mediated by cyclooxygenase-2 metabolites. *Curr Eye Res* 23 (2001) 77-85.
297. Overbeck, A. F., Brtva, T. R., Cox, A. D., Graham, S. M., Huff, S. Y., Khosravi-Far, R., Quilliam, L. A., Solski, P. A., Der, C.J.: Guanine nucleotide exchange factors: activators of Ras superfamily proteins. *Mol Reprod Dev* 42 (1995) 468-76.
298. Page, D. L., Dupont, W. D., Rogers, L. W., Rados, M.S.: Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 55 (1985) 2698-708.
299. Page, D. L., Kidd, T. E. J., Dupont, W. D., Simpson, J. F., Rogers, L.W.: Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. *Hum Pathol* 22 (1991) 1232-9.
300. Page, D. L., Schuyler, P. A., Dupont, W. D., Jensen, R. A., Plummer, W. D. J., Simpson, J.F.: Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. *Lancet* 361 (2003) 125-9.

301. Park, C. C., Zhang, H., Pallavicini, M., Gray, J. W., Baehner, F., Park, C. J., Bissell, M.J.: Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res* 66 (2006) 1526-35.
302. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., Botstein, D.: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406 (2000) 747-52.
303. Perry, C., Eldor, A., Soreq, H.: Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners. *Leuk Res* 26 (2002) 221-8.
304. Pervaiz, S., Cao, J., Chao, O. S., Chin, Y. Y., Clément, M.V.: Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* 20 (2001) 6263-8.
305. Philbrick, W. M., Wysolmerski, J. J., Galbraith, S., Holt, E., Orloff, J. J., Yang, K. H., Vasavada, R. C., Weir, E. C., Broadus, A. E., Stewart, A.F.: Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76 (1996) 127-73.
306. Platet, N., Prévostel, C., Derocq, D., Joubert, D., Rochefort, H., Garcia, M.: Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int J Cancer* 75 (1998) 750-6.
307. Platko, J. V., Leonard, D. A., Adra, C. N., Shaw, R. J., Cerione, R. A., Lim, B.: A single residue can modify target-binding affinity and activity of the functional domain of the Rho-subfamily GDP dissociation inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 2974-8.
308. Poland, J., Schadendorf, D., Lage, H., Schnölzer, M., Celis, J. E., Sinha, P.: Study of therapy resistance in cancer cells with functional proteome analysis. *Clin Chem Lab Med* 40 (2002) 221-34.
309. Pradono, P., Tazawa, R., Maemondo, M., Tanaka, M., Usui, K., Saijo, Y., Hagiwara, K., Nukiwa, T.: Gene transfer of thromboxane A(2) synthase and prostaglandin I(2) synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 62 (2002) 63-6.
310. Pufall, M. A., Lee, G. M., Nelson, M. L., Kang, H., Velyvis, A., Kay, L. E., McIntosh, L. P., Graves, B.J.: Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region. *Science* 309 (2005) 142-5.
311. Rajan, P. B., Scott, D. J., Perry, R. H., Griffith, C.D.: p53 protein expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 42 (1997) 283-90.
312. Rebecchi, M. J., Scarlata, S.: Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27 (1998) 503-28.
313. Regazzi, R., Vallar, L., Ullrich, S., Ravazzola, M., Kikuchi, A., Takai, Y., Wollheim, C.B.: Characterization of small-molecular-mass guanine-nucleotide-binding regulatory proteins in insulin-secreting cells and PC12 cells. *Eur J Biochem* 208 (1992) 729-37.
314. Reimer, J., Bien, S., Sonnemann, J., Beck, J. F., Wieland, T., Kroemer, H. K., Ritter, C.A.: Reduced expression of Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor- $\alpha$  modulates the cytotoxic effect of busulfan in HEK293 cells. *Anticancer Drugs* 18 (2007) 333-40.
315. Reis-Filho, J. S., Lakhani, S.R.: The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res* 5 (2003) 313-9.
316. Ren, X. D., Kiosses, W. B., Schwartz, M.A.: Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18 (1999) 578-85.
317. Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H., Schmitt, M.: Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* 13 (1998) 893-906.
318. Richard, V., Rosol, T. J., Foley, J.: PTHrP gene expression in cancer: do all paths lead to Ets? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 15 (2005) 115-32.
319. Ridley, A. J.: Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 11 (2001) 471-7.
320. Ridley, A. J.: Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114 (2001) 2713-22.
321. Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., Hall, A.: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70 (1992) 401-10.
322. Rigas, B., Goldman, I. S., Levine, L.: Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 122 (1993) 518-23.
323. Rihet, S., Vielh, P., Camonis, J., Goud, B., Chevillard, S., de Gunzburg, J.: Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 (2001) 733-8.
324. Ristimäki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H., Isola, J.: Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62 (2002) 632-5.
325. Robert-Koch-Institut: Brustkrebsinzidenz und -mortalität in Deutschland. Robert-Koch-Institut, Berlin, 2003
326. Robert-Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 25: Brustkrebs; Robert-Koch-Institut, Berlin, 2005
327. Robles, A. I., Rodriguez-Puebla, M. L., Glick, A. B., Trempus, C., Hansen, L., Sicinski, P., Tennant, R. W., Weinberg, R. A., Yuspa, S. H., Conti, C.J.: Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo. *Genes Dev* 12 (1998) 2469-74.
328. Rochlitz, C. F., Scott, G. K., Dodson, J. M., Liu, E., Dollbaum, C., Smith, H. S., Benz, C.C.: Incidence of activating ras oncogene mutations associated with primary and metastatic human breast cancer. *Cancer Res* 49 (1989) 357-60.
329. Rodenhuis, S.: ras and human tumors. *Semin Cancer Biol* 3 (1992) 241-7.
330. Rodriguez-Barbero, A., Dorado, F., Velasco, S., Pandiella, A., Banas, B., López-Novoa, J.M.: TGF- $\beta$ 1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells. *Kidney Int* 70 (2006) 901-9.
331. Rolland, P. H., Martin, P. M., Jacquemier, J., Rolland, A. M., Toga, M.: Prostaglandin in human breast cancer: Evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 64 (1980) 1061-70.

332. Rosen, P. P., Braun, D. W. J., Lyngholm, B., Urban, J. A., Kinne, D.W.: Lobular carcinoma in situ of the breast: preliminary results of treatment by ipsilateral mastectomy and contralateral breast biopsy. *Cancer* 47 (1981) 813-9.
333. Rosen, P. P., Groshen, S., Saigo, P. E., Kinne, D. W., Hellman, S.: 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 (1989) 1239-51.
334. Rossman, K. L., Der, C. J., Sondek, J.: GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 167-80.
335. Roylance, R., Gorman, P., Hanby, A., Tomlinson, I.: Allelic imbalance analysis of chromosome 16q shows that grade I and grade III invasive ductal breast cancers follow different genetic pathways. *J Pathol* 196 (2002) 32-6.
336. Roylance, R., Gorman, P., Harris, W., Liebmann, R., Barnes, D., Hanby, A., Sheer, D.: Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* 59 (1999) 1433-6.
337. Rudas, M., Neumayer, R., Gnant, M. F., Mittelböck, M., Jakesz, R., Reiner, A.: p53 protein expression, cell proliferation and steroid hormone receptors in ductal and lobular in situ carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 33 (1997) 39-44.
338. Sahai, E., Marshall, C.J.: RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 133-42.
339. Sahai, E., Marshall, C.J.: ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol* 4 (2002) 408-15.
340. Sahai, E., Olson, M. F., Marshall, C.J.: Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* 20 (2001) 755-66.
341. Salomoni, P., Pandolfi, P.P.: The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108 (2002) 165-70.
342. Sampath, J., Sun, D., Kidd, V. J., Grenet, J., Gandhi, A., Shapiro, L. H., Wang, Q., Zambetti, G. P., Schuetz, J.D.: Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *J Biol Chem* 276 (2001) 39359-67.
343. Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Collard, J.G.: Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* 143 (1998) 1385-98.
344. Sapino, A., Frigerio, A., Peterse, J. L., Arisio, R., Coluccia, C., Bussolati, G.: Mammographically detected in situ lobular carcinomas of the breast. *Virchows Arch* 436 (2000) 421-30.
345. Sasaki, T., Kato, M., Takai, Y.: Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21. *J Biol Chem* 268 (1993) 23959-63.
346. Sasaoka, T., Langlois, W. J., Leitner, J. W., Draznin, B., Olefsky, J.M.: The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J Biol Chem* 269 (1994) 32621-5.
347. Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D., Gierschik, P.: The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat Struct Biol* 7 (2000) 122-6.
348. Scherle, P., Behrens, T., Staudt, L.M.: Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 7568-72.
349. Schmidt, A., Hall, A.: Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16 (2002) 1587-609.
350. Schmitt, M., Thomssen, C., Ulm, K., Seiderer, A., Harbeck, N., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H.: 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 (1997) 306-11.
351. Schunke, D., Span, P., Ronneburg, H., Dittmer, A., Vetter, M., Holzhausen, H., Kantelhardt, E., Krenkel, S., Müller, V., Sweep, F. C. G. J., Thomssen, C., Dittmer, J.: Cyclooxygenase-2 is a target gene of rho GDP dissociation inhibitor beta in breast cancer cells. *Cancer Res* 67 (2007) 10694-702.
352. Schön, D., Bertz, J., Görsch, B., Haberland, J., Kurth, B.: [Federal Cancer Reporting Unit. Surveillance program for cancer registration in Germany] *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 47 (2004) 429-36.
353. Seeliger, M. A., Schymkowitz, J. W. H., Rousseau, F., Wilkinson, H. R., Itzhaki, L.S.: Folding and association of the human cell cycle regulatory proteins cksh1 and cksh2. *Biochemistry* 41 (2002) 1202-10.
354. Seftor, E. A., Meltzer, P. S., Schattman, G. C., Gruman, L. M., Hess, A. R., Kirschmann, D. A., Seftor, R. E. B., Hendrix, M.J.C.: Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 44 (2002) 17-27.
355. Seidel, J. J., Graves, B.J.: An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors. *Genes Dev* 16 (2002) 127-37.
356. Sementchenko, V. I., Watson, D.K.: Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 19 (2000) 6533-48.
357. Seraj, M. J., Harding, M. A., Gildea, J. J., Welch, D. R., Theodorescu, D.: The relationship of BRMS1 and RhoGDI2 gene expression to metastatic potential in lineage related human bladder cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 18 (2000) 519-25.
358. Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield, I., Donnelly, S. C., Strieter, R., Haslett, C.: Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 5 (1999) 662-8.
359. Shao, J., Lee, S. B., Guo, H., Evers, B. M., Sheng, H.: Prostaglandin E2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin. *Cancer Res* 63 (2003) 5218-23.
360. Shaw, R. J., Paez, J. G., Curto, M., Yaktine, A., Pruitt, W. M., Saotome, I., O'Bryan, J. P., Gupta, V., Ratner, N., Der, C. J., Jacks, T., McClatchey, A.I.: The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell* 1 (2001) 63-72.
361. Shen, X., Qian, L., Falzon, M.: PTH-related protein enhances MCF-7 breast cancer cell adhesion, migration, and invasion via an intracrine pathway. *Exp Cell Res* 294 (2004) 420-33.
362. Shibasaki, F., Hallin, U., Uchino, H.: Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem (Tokyo)* 131 (2002) 1-15.
363. Silverstein, M. J., Lagios, M. D., Craig, P. H., Waisman, J. R., Lewinsky, B. S., Colburn, W. J., Poller, D.N.: A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 77 (1996) 2267-74.

364. Simpson, J. F., Gray, R., Dressler, L. G., Cobau, C. D., Falkson, C. I., Gilchrist, K. W., Pandya, K. J., Page, D. L., Robert, N.J.: 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 (2000) 2059-69.
365. Simpson, P. T., Gale, T., Fulford, L. G., Reis-Filho, J. S., Lakhani, S.R.: The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ. *Breast Cancer Res* 5 (2003) 258-62.
366. Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Gale, T., Lakhani, S.R.: Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 205 (2005) 248-54.
367. Singh, B., Berry, J. A., Shoher, A., Ayers, G. D., Wei, C., Lucci, A.: COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene* 26 (2007) 3789-96.
368. Singh, B., Berry, J. A., Shoher, A., Ramakrishnan, V., Lucci, A.: COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Int J Oncol* 26 (2005) 1393-9.
369. Sinha, P., Kohl, S., Fischer, J., Hütter, G., Kern, M., Köttgen, E., Dietel, M., Lage, H., Schnölzer, M., Schadendorf, D.: Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 21 (2000) 3048-57.
370. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L.: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344 (2001) 783-92.
371. Snyder, J. T., Rossman, K. L., Baumeister, M. A., Pruitt, W. M., Siderovski, D. P., Der, C. J., Lemmon, M. A., Sondek, J.: Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins. *J Biol Chem* 276 (2001) 45868-75.
372. Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., Taketo, M.M.: Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in *Apc(Delta 716)* knockout mice. *Nat Med* 7 (2001) 1048-51.
373. Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Eystein Lønning, P., Børresen-Dale, A.L.: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 10869-74.
374. Sotiriou, C., Neo, S., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L., Liu, E.T.: Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 10393-8.
375. Span, P. N., Manders, P., Heuvel, J. J., Thomas, C. M. G., Bosch, R. R., Beex, L. V. A. M., Sweep, C.G.J.: Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 21 (2002) 8506-9.
376. Spinella, F., Rosanò, L., Di Castro, V., Natali, P. G., Bagnato, A.: Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 277 (2002) 27850-5.
377. Spyrtos, F., Bouchet, C., Tozlu, S., Labroquere, M., Vignaud, S., Becette, V., Lidereau, R., Bieche, I.: Prognostic value of uPA, PAI-1 and PAI-2 mRNA expression in primary breast cancer. *Anticancer Res* 22 (2002) 2997-3003.
378. Stewart, T. H., Heppner, G.H.: Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitology* 115 Suppl (1997) S141-53.
379. Stierer, M., Rosen, H., Weber, R., Hanak, H., Auerbach, L., Spona, J., Tüchler, H.: 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 (1995) 11-21.
380. Stierer, M., Rosen, H., Weber, R., Hanak, H., Spona, J., Tüchler, H.: Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg* 218 (1993) 13-21.
381. Su, J., Shih, J., Yen, M., Jeng, Y., Chang, C., Hsieh, C., Wei, L., Yang, P., Kuo, M.: Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 64 (2004) 554-64.
382. Subauste, M. C., Von Herrath, M., Benard, V., Chamberlain, C. E., Chuang, T. H., Chu, K., Bokoch, G. M., Hahn, K.M.: Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J Biol Chem* 275 (2000) 9725-33.
383. Subbaramaiah, K., Norton, L., Gerald, W., Dannenberg, A.J.: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* 277 (2002) 18649-57.
384. Subramanian, B., Axelrod, D.E.: Progression of heterogeneous breast tumors. *J Theor Biol* 210 (2001) 107-19.
385. Sunaga, N., Kohno, T., Yanagitani, N., Sugimura, H., Kunitoh, H., Tamura, T., Takei, Y., Tsuchiya, S., Saito, R., Yokota, J.: Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (2002) 730-8.
386. Suwa, H., Ohshio, G., Imamura, T., Watanabe, G., Arii, S., Imamura, M., Narumiya, S., Hiai, H., Fukumoto, M.: Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer* 77 (1998) 147-52.
387. Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S., Takai, Y.: Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 272 (1997) 23371-5.
388. Takai, N., Miyazaki, T., Fujisawa, K., Nasu, K., Miyakawa, I.: Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma. *Cancer* 89 (2000) 2059-67.
389. Takai, N., Miyazaki, T., Nishida, M., Nasu, K., Miyakawa, I.: c-Ets1 is a promising marker in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Med* 9 (2002) 287-92.
390. Tanaka, K., Oda, N., Iwasaka, C., Abe, M., Sato, Y.: Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J Cell Physiol* 176 (1998) 235-44.

391. Tanaka, T., Tatsuno, I., Noguchi, Y., Uchida, D., Oeda, T., Narumiya, S., Yasuda, T., Higashi, H., Kitagawa, M., Nakayama, K., Saito, Y., Hirai, A.: Activation of cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) in growth-stimulated rat astrocytes. Geranylgeranylated Rho small GTPase(s) are essential for the induction of cyclin E gene expression. *J Biol Chem* 273 (1998) 26772-8.
392. Tapper, J., Kettunen, E., El-Rifai, W., Seppälä, M., Andersson, L. C., Knuutila, S.: Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 128 (2001) 1-6.
393. Theodorescu, D., Sapinoso, L. M., Conaway, M. R., Oxford, G., Hampton, G. M., Frierson, H.F.J.: Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 3800-6.
394. Thomas, R. J., Guise, T. A., Yin, J. J., Elliott, J., Horwood, N. J., Martin, T. J., Gillespie, M.T.: Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 140 (1999) 4451-8.
395. Thor, A. D., Berry, D. A., Budman, D. R., Muss, H. B., Kute, T., Henderson, I. C., Barcos, M., Cirincione, C., Edgerton, S., Allred, C., Norton, L., Liu, E.T.: erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90 (1998) 1346-60.
396. Titus, B., Frierson, H. F. J., Conaway, M., Ching, K., Guise, T., Chirgwin, J., Hampton, G., Theodorescu, D.: Endothelin axis is a target of the lung metastasis suppressor gene RhoGDI2. *Cancer Res* 65 (2005) 7320-7.
397. Tong, B. J., Tan, J., Tajeda, L., Das, S. K., Chapman, J. A., DuBois, R. N., Dey, S.K.: Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-delta in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia* 2 (2000) 483-90.
398. Tovar Sepulveda, V. A., Shen, X., Falzon, M.: Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143 (2002) 596-606.
399. Trojanowska, M.: Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene* 19 (2000) 6464-71.
400. Truong, N. U., deB Edwardes, M. D., Papavasiliou, V., Goltzman, D., Kremer, R.: Parathyroid hormone-related peptide and survival of patients with cancer and hypercalcemia. *Am J Med* 115 (2003) 115-21.
401. Tsunoda, T., Koga, H., Yokomizo, A., Tatsugami, K., Eto, M., Inokuchi, J., Hirata, A., Masuda, K., Okumura, K., Naito, S.: Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. *Oncogene* 24 (2005) 1396-402.
402. Tu, S., Wu, W. J., Wang, J., Cerione, R.A.: Epidermal growth factor-dependent regulation of Cdc42 is mediated by the Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278 (2003) 49293-300.
403. Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J., Takai, Y.: Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem* 265 (1990) 9373-80.
404. Uefuji, K., Ichikura, T., Mochizuki, H.: Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 135-8.
405. Umekita, Y., Ohi, Y., Sagara, Y., Yoshida, H.: Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 98 (2002) 415-8.
406. Urban, P., Vuaroqueaux, V., Labuhn, M., Delorenzi, M., Wirapati, P., Wight, E., Senn, H., Benz, C., Eppenberger, U., Eppenberger-Castori, S.: Increased expression of urokinase-type plasminogen activator mRNA determines adverse prognosis in ErbB2-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 24 (2006) 4245-53.
407. Valter, M. M., Hügel, A., Huang, H. J., Cavenee, W. K., Wiestler, O. D., Pietsch, T., Wernert, N.: Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* 59 (1999) 5608-14.
408. Van Golen, K. L., Davies, S., Wu, Z. F., Wang, Y., Bucana, C. D., Root, H., Chandrasekharappa, S., Strawderman, M., Ethier, S. P., Merajver, S.D.: A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoC GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 2511-9.
409. Van Golen, K. L., Wu, Z. F., Qiao, X. T., Bao, L. W., Merajver, S.D.: RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 60 (2000) 5832-8.
410. Van Golen, K. L., Wu, Z. F., Qiao, X. T., Bao, L., Merajver, S.D.: RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia* 2 (2000) 418-25.
411. Van't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A. M., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., Friend, S.H.: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 (2002) 530-6.
412. Vargas, S. J., Gillespie, M. T., Powell, G. J., Southby, J., Danks, J. A., Moseley, J. M., Martin, T.J.: Localization of parathyroid hormone-related protein mRNA expression in breast cancer and metastatic lesions by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 7 (1992) 971-9.
413. Vetter, M., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Manns, J., Wesselborg, S., Thomssen, C., Dittmer, J.: Ets1 is an effector of protein kinase Calpha in cancer cells. *Oncogene* 24 (2005) 650-61.
414. Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., Bos, J.L.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319 (1988) 525-32.
415. Wang, D., Dubois, R.N.: Prostaglandins and cancer. *Gut* 55 (2006) 115-22.
416. Wang, D., Mann, J. R., DuBois, R.N.: The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 128 (2005) 1445-61.
417. Wasylyk, B., Hahn, S. L., Giovane, A.: The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211 (1993) 7-18.
418. Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S., Ichikawa, A.: Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 268 (1993) 20175-8.
419. Watson, D. K., McWilliams-Smith, M. J., Nunn, M. F., Duesberg, P. H., O'Brien, S. J., Papas, T.S.: The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 7294-8.

420. Welch, D. R., Steeg, P. S., Rinker-Schaeffer, C.W.: Molecular biology of breast cancer metastasis. Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Res* 2 (2000) 408-16.
421. Weyerstahl T., Genz T.: Erkrankungen der Mamma. In: Stauber M., Weyerstahl T. (Hrsg.): Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Auflage; Thieme, Stuttgart, New York, 2005
422. Witton, C. J., Hawe, S. J. K., Cooke, T. G., Bartlett, J.M.S.: Cyclooxygenase 2 (COX2) expression is associated with poor outcome in ER-negative, but not ER-positive, breast cancer. *Histopathology* 45 (2004) 47-54.
423. Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H., Ristimäki, A.: Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58 (1998) 4997-5001.
424. Woodward, W. A., Vinh-Hung, V., Ueno, N. T., Cheng, Y. C., Royce, M., Tai, P., Vlastos, G., Wallace, A. M., Hortobagyi, G. N., Nieto, Y.: Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24 (2006) 2910-6.
425. Wu, J., Katzav, S., Weiss, A.: A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 4337-46.
426. Wu, T. L., Vasavada, R. C., Yang, K., Massfelder, T., Ganz, M., Abbas, S. K., Care, A. D., Stewart, A.F.: Structural and physiologic characterization of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein. *J Biol Chem* 271 (1996) 24371-81.
427. Wysolmerski, J. J., Dann, P. R., Zelazny, E., Dunbar, M. E., Insogna, K. L., Guise, T. A., Perkins, A.S.: Overexpression of parathyroid hormone-related protein causes hypercalcemia but not bone metastases in a murine model of mammary tumorigenesis. *J Bone Miner Res* 17 (2002) 1164-70.
428. Wysolmerski, J. J., Philbrick, W. M., Dunbar, M. E., Lanske, B., Kronenberg, H., Broadus, A.E.: Rescue of the parathyroid hormone-related protein knockout mouse demonstrates that parathyroid hormone-related protein is essential for mammary gland development. *Development* 125 (1998) 1285-94.
429. Wülfing, P., Diallo, R., Kersting, C., Wülfing, C., Poremba, C., Greb, R. R., Böcker, W., Kiesel, L.: Endothelin-1, Endothelin-A- and Endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep* 11 (2004) 791-6.
430. Wülfing, P., Diallo, R., Kersting, C., Wülfing, C., Poremba, C., Rody, A., Greb, R. R., Böcker, W., Kiesel, L.: Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 4125-31.
431. Wülfing, P., Götte, M., Sonntag, B., Kersting, C., Schmidt, H., Wülfing, C., Buerger, H., Greb, R., Böcker, W., Kiesel, L.: Overexpression of Endothelin-A-receptor in breast cancer: regulation by estradiol and cobalt-chloride induced hypoxia. *Int J Oncol* 26 (2005) 951-60.
432. Wülfing, P., Kersting, C., Tio, J., Fischer, R., Wülfing, C., Poremba, C., Diallo, R., Böcker, W., Kiesel, L.: Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 2393-400.
433. Xie, W., Herschman, H.R.: v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J Biol Chem* 270 (1995) 27622-8.
434. Yang, B. S., Hauser, C. A., Henkel, G., Colman, M. S., Van Beveren, C., Stacey, K. J., Hume, D. A., Maki, R. A., Ostrowski, M.C.: Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 538-47.
435. Yang, F. C., Kapur, R., King, A. J., Tao, W., Kim, C., Borneo, J., Breese, R., Marshall, M., Dinauer, M. C., Williams, D.A.: Rac2 stimulates Akt activation affecting BAD/Bcl-XL expression while mediating survival and actin function in primary mast cells. *Immunity* 12 (2000) 557-68.
436. Yao, E. S., Zhang, H., Chen, Y., Lee, B., Chew, K., Moore, D., Park, C.: Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res* 67 (2007) 659-64.
437. Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G. R., Guise, T.A.: TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103 (1999) 197-206.
438. Yiu, G. K., Toker, A.: NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 281 (2006) 12210-7.
439. Yoneda, T., Williams, P. J., Hiraga, T., Niewolna, M., Nishimura, R.: A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 16 (2001) 1486-95.
440. Yonemura, S., Matsui, T., Tsukita, S., Tsukita, S.: Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci* 115 (2002) 2569-80.
441. Yordy, J. S., Li, R., Sementchenko, V. I., Pei, H., Muise-Helmericks, R. C., Watson, D.K.: SP100 expression modulates ETS1 transcriptional activity and inhibits cell invasion. *Oncogene* 23 (2004) 6654-65.
442. Yoshida, A., Nakamura, Y., Shimizu, A., Harada, M., Kameda, Y., Nagano, A., Inaba, M., Asaga, T.: Significance of the parathyroid hormone-related protein expression in breast carcinoma. *Breast Cancer* 7 (2000) 215-20.
443. Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honoré, N., Rousseau-Merck, M. F., Tavittian, A., Olofsson, B.: RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J Biol Chem* 271 (1996) 30366-74.
444. Zalcman, G., Dorseuil, O., Garcia-Ranea, J. A., Gacon, G., Camonis, J.: RhoGAPs and RhoGDIs, (His)stories of two families. *Prog Mol Subcell Biol* 22 (1999) 85-113.
445. Zhang, B., Zhang, Y., Dagher, M., Shacter, E.: Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 65 (2005) 6054-62.
446. Zhang, B., Zhang, Y., Shacter, E.: Caspase 3-mediated inactivation of rac GTPases promotes drug-induced apoptosis in human lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 5716-25.
447. Zhang, B., Zhang, Y., Shacter, E.: Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 6205-14.

448. Zhang, Y., Zhang, B.: D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res* 66 (2006) 5592-8.
449. Zhuge, Y., Xu, J.: Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier. *J Biol Chem* 276 (2001) 16248-56.
450. Zondag, G. C., Evers, E. E., ten Klooster, J. P., Janssen, L., van der Kammen, R. A., Collard, J.G.: Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 149 (2000) 775-82.

## 8 Thesen

1. Die Expression von Ets1 korreliert mit der von PKC $\alpha$  im primären Mammakarzinom. Ets1 wird in der Zellkultur von MDA-MB-231-Zellen von PKC $\alpha$  reguliert.
2. Ets1 ist ein Tumorpromotor und reguliert direkt oder indirekt Faktoren, die die Tumorprogression bestimmen. Beispiele dafür sind RhoGDI $\beta$  und PTHrP.
3. Ets1 und PKC $\alpha$  regulieren im primären Mammakarzinom unter anderem die Expression von RhoGDI $\beta$ , nicht jedoch die von RhoGDI $\alpha$  oder RhoGDI $\gamma$ . RhoGDI $\beta$  ist ein Inhibitor der Zellmigration.
4. Die Expression von RhoGDI $\beta$  korreliert nur mit der Expression von Ets1 und PKC $\alpha$ , nicht jedoch mit der anderer Ets-Faktoren, wie Ets2 oder Esx.
5. In der Promotorregion des RhoGDI $\beta$ -Gens befindet sich eine funktionelle Ets-binding-sequence (EBS), was durch Chromatin Immuno Precipitation (ChIP) nachgewiesen wurde. Ets1 beeinflusst damit direkt die Expression von RhoGDI $\beta$ .
6. Anders als aus der Literatur zu erwarten wäre, korreliert RhoGDI $\beta$  im Mammakarzinom nicht mit der Expression von Integrin  $\beta$ 1 oder Endothelin-1. Auch in der 2D- und 3D-Zellkultur von MDA-MB-231-Zellen konnte bei Versuchen mit siRNA gegen RhoGDI $\beta$  keine Veränderung in der Expression dieser Faktoren gefunden werden.
7. RhoGDI $\beta$  beeinflusst die Expression von Cox-2 (Cyclooxygenase-2) im Brustkrebs, wie per cDNA-Microarray und Q-RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Weitere, im cDNA-Microarray gefundene Zielgene konnten mit einer zweiten siRNA gegen RhoGDI $\beta$  nicht verifiziert werden.
8. Cox-2 ist ein etablierter Tumorpromotor beim primären Mammakarzinom.
9. Die Cox-2-Expression wird von RhoGDI $\beta$  vermutlich über einen Synergismus mit Vav1, einem RhoGEF (Rho-GDP exchange factor), via NFAT (nuclear factor of activated T-cells) beeinflusst.
10. Die mRNA-Expressionen von RhoGDI $\beta$  und Vav1 korrelieren im primären Mammakarzinom miteinander und mit der von Cox-2.
11. Eine hohe RhoGDI $\alpha$ -Expression auf immunhistochemischer Ebene scheint einen Überlebensvorteil zu bedeuten. Dagegen zeigt sich auf mRNA-Ebene kein signifikanter Unterschied in der Prognose.
12. RhoGDI $\beta$  hat keinen Einfluss auf das krankheitsfreie oder das Gesamtüberleben.
13. Der die Cox-2-Expression stimulierende Effekt von Rho-GDI $\beta$  auf der einen und dessen antimigratorischer Effekt auf der anderen Seite scheinen einander statistisch aufzuheben und erklären so, weshalb Rho-GDI $\beta$  keinen Effekt auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen aufweist. Im individuellen Tumor kann jedoch die eine oder andere Funktion überwiegen und die Expression von Rho-GDI $\beta$  entweder von Vorteil oder von Nachteil für die Patientin sein.



14. Die Expression von Ets1 korreliert mit der von PTHrP (Parathormone related peptide). PTHrP hat neben parakrinen Wirkungen bei der osteolytischen Metastasierung des Mammakarzinoms auch autokrine Funktionen.
15. Die Zellzyklusregulatoren Cdc2 und Cdc25B werden in MDA-MB-231-Zellen von PTHrP Calcium-abhängig über den Parathormonrezeptor PTH1R reguliert.
16. PTHrP selbst ist ein Substrat von Cdc2. Deshalb wird Cdc2 von PTHrP herunterreguliert, um die eigene Konzentration hoch zu erhalten.
17. PTHrP benötigt eine intakte Nuclear Localization Sequence (NLS) in seiner Mittelregion, um Integrin  $\alpha 6$  zu regulieren. Eine hohe Expression von Integrin  $\alpha 6$  bewirkt eine schlechte Prognose beim Brustkrebs.
18. KISS-1, ein vormals als Tumorsuppressor erkannter Faktor, der jedoch auch die Invasivität von Brustkrebszellen begünstigt, wird in MDA-MB-231-Zellen über verschiedene Signalwege von PTHrP reguliert.
19. Im primären Mammakarzinom werden nur Integrin  $\alpha 6$ , Cdc2 und Cdc25B von PTHrP reguliert. Dies steht im Kontrast zu einer Fülle von Faktoren, die in MDA-MB-231-Zellen von PTHrP beeinflusst werden.
20. Ets1 reguliert direkt PTHrP und beeinflusst indirekt über RhoGDI $\beta$  die Expression von Cox-2.
21. In der Zusammenschau ergeben sich viele Gemeinsamkeiten, aber auch teilweise Unterschiede in der Expression verschiedener Ets-regulierter Faktoren in MDA-MB-231-Zellen und im primären Mammakarzinom. Dies verdeutlicht die Relevanz der Bestätigung von Beobachtungen an Zelllinien im tatsächlichen Tumor.

## **Lebenslauf**

### *Persönliche Daten*

Dario Schunke  
geb. am 24.10.1981 in Bernburg  
ledig, keine Kinder

### *Schulbildung*

1988-1992 Grundschohle Bernburg  
1992-2000 Gymnasium Carolinum Bernburg  
2000 Abitur (Note 1,0)

### *Zivildienst*

2000-2001 Zivildienst im Klinikum Bernburg, Klinik für Innere  
Medizin und Klinik für Chirurgie

### *Hochschulstudium*

2001-2007 Studium der Humanmedizin (Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg)

2003 Ärztliche Vorprüfung (Note Gut (1,66))

2006-2007 Praktisches Jahr:  
1. Abschnitt St.-Elisabeth-Krankenhaus, Halle, Klinik für Chirurgie  
2. Abschnitt St.-Elisabeth-Krankenhaus, Halle, Medizinische Klinik I  
3. Abschnitt Uniklinik und Poliklinik für Gynäkologie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2007 Zweite Ärztliche Prüfung (Note Sehr Gut (1,50))  
Approbation als Arzt

2008- Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik I,  
Elisabeth-und-St.Barbara-Krankenhaus Halle

### *Promotion*

2004-2007 „Die Bedeutung der Ets-regulierten Proteine RhoGDI $\beta$  und  
PTHrP für die Biologie des invasiven Mammakarzinoms“,  
Betreuer: PD Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

Halle, 17.12.2007

Dario Schunke

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit die vorliegende Arbeit „Die Bedeutung der Ets-regulierten Proteine RhoGDI $\beta$  und PTHrP für die Biologie des invasiven Mammakarzinoms“ selbständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Halle, 17. Dezember 2007

Dario Schunke

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit „Die Bedeutung der Ets-regulierten Proteine RhoGDI $\beta$  und PTHrP für die Biologie des invasiven Mammakarzinoms“ zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstmalig von mir eingereicht wird. Des Weiteren liegen keine anderen Promotionsarbeiten zur Begutachtung an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder an einer anderen Universität vor.

Halle, 17. Dezember 2007

Dario Schunke

## Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

### Publikationen in Fachjournalen

“Parathyroid Hormone-related Protein Regulates Tumor-relevant Genes in Breast Cancer Cells”

Angela Dittmer, Martina Vetter<sup>1</sup>, **Dario Schunke**<sup>1</sup>, Paul N. Span, Fred Sweep, Christoph Thomssen, and Jürgen Dittmer; <sup>1</sup>contributed equally

The Journal of Biological Chemistry 281(21), 2006, 14563–72

„Cox-2 is a target gene of Rho GDP dissociation inhibitor  $\beta$  in breast cancer cells”

**Schunke, D.**, Span, P., Ronneburg, H., Dittmer, A., Vetter, M., Holzhausen, H.-J., Kantelhardt, E., Krenkel, S., Müller, V., Sweep, F., Thomssen, C., Dittmer J.,

Cancer Research, 67 (22), 2007, 10694-702

“PTHrP promotes homotypic aggregation of breast cancer cells in three-dimensional cultures”

Dittmer, A., **Schunke, D.**, Dittmer J.

Cancer Letters, 260(1-2), 2008, 56-61

### Vorträge und Posterpräsentationen

„Ets1 and PKC $\alpha$  interfere with the Rho-GTPase pathway in breast cancer cells”

**D. Schunke**, M. Vetter, P.N. Span, A. Dittmer, H. Ronneburg, M. Persing, H-J. Holzhausen, C.G.J. Sweep, Ch. Thomssen, and J. Dittmer

Poster; 1. Symposium der Kommission für Translationale Forschung der AGO

Juli 2005, Heidelberg

“PTHrP regulates tumor-relevant genes”

Jürgen Dittmer, Martina Vetter, **Dario Schunke**, Angela Dittmer, Paul N. Span, Fred Sweep, Christoph Thomssen.

Vortrag, Abstract #1484, 97th AACR Annual Meeting, April 1-5, 2006, Washington, DC, USA

Citation: AACR Meeting Abstracts, Apr 2006; 2006: 350.

„Bedeutung des hämatopoetischen Rho-GDI ARHGDIB beim Brustkrebs“

**D. Schunke**, H. Ronneburg, M. Vetter, A. Dittmer, P.N. Span, C.G.J. Sweep, H-J. Holzhausen, Ch. Thomssen und J. Dittmer

Poster; 3. Gemeinsame Tagung der Medizinisch-Wissenschaftliche Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Thüringen, Sächsische Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Medizinisch-Wissenschaftliche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in Sachsen-Anhalt; 19. - 20. Mai 2006, Erfurt

„PTHrP reguliert tumorrelevante Gene im invasiven Mammakarzinom“

**D. Schunke**, M. Vetter, A. Dittmer, P.N. Span, C.G.J. Sweep, Ch. Thomssen, und J. Dittmer

Poster; 3. Gemeinsame Tagung der Medizinisch-Wissenschaftliche Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Thüringen, Sächsische Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Medizinisch-Wissenschaftliche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in Sachsen-Anhalt; 19. - 20. Mai 2006, Erfurt

„Ein erhöhter Proteinlevel von Rho-GDI $\alpha$ , nicht aber von Rho-GDI $\beta$ , reduziert das Rezidivrisiko bei Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom“

**Schunke, D.**, Ronneburg, H., Span, P., Dittmer, A., Ulbrich, E., Vetter, M., Persing, M, Krenkel, S., Müller, V. , Ulrich, A., Sweep, F., Holzhausen, H.-J., Thomssen, C., Dittmer J.

Poster, Herbsttagung der Medizinisch-Wissenschaftlichen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe Sachsen-Anhalt e.V., Magdeburg, 25.11.2006

“PTHrP regulates tumor-relevant genes in breast cancer cells.”

Angela Dittmer, Martina Vetter, **Dario Schunke**, Paul N. Span, Fred Sweep, Christoph Thomssen, and Jürgen Dittmer,

Poster #1842, 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Dec 9-13, 2006, San Diego, CA, USA

“The effect of Rho-GDI $\beta$  on breast cancer cells and on clinical outcome.”

**Dario Schunke**; Henrike Ronneburg; Paul N Span; Angela Dittmer; Eva Ulbrich; Martina Vetter; Sylvia Krenkel; Volkmar Mueller; Alice Ulrich; Fred Sweep; Hans-Juergen Holzhausen; Christoph Thomssen and Juergen Dittmer

Poster #6110, The 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, Dec. 14-17, 2006, San Antonio, TX, USA

„Rho-GDI $\alpha$ , nicht aber Rho-GDI $\beta$ , senkt das Rezidivrisiko beim Brustkrebs“

Ronneburg, H., **Schunke, D.**, Span, P., Müller, V., Holzhausen, H.-J. und Dittmer, J.

Poster; 1. Jahrestagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Frauenheilkunde und Geburtshilfe e.V. (MGFG); 04. - 05. Mai 2007, Dresden

“The effect of Rho-GDI $\beta$  on breast cancer cells and on clinical outcome”

**Dario Schunke**; Henrike Ronneburg; Paul N Span; Angela Dittmer; Eva Kantelhardt; Martina Vetter; Sylke Krenkel; Volkmar Müller; Alice Ulrich; Monika Persing; Fred Sweep; Hans-Jürgen Holzhausen, Christoph Thomssen; Jürgen Dittmer

Vortrag; 2. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der AGO 2007; 17.-19.Mai 2007, Bergisch-Gladbach

“Human mesenchymal stem cells disturb 3D clone formation of breast cancer cells”

Angela Dittmer; **Dario Schunke**; Jana Lützkendorf; Lutz P. Müller; Jürgen Dittmer

Vortrag; 2. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der AGO 2007; 17.-19.Mai 2007, Bergisch-Gladbach

“Cox-2 is a target gene of Rho GDP dissociation inhibitor  $\beta$  in breast cancer cells”

**Dario Schunke**, Paul Span, Henrike Ronneburg, Angela Dittmer, Martina Vetter, Hans-Jürgen Holzhausen, Eva Kantelhardt, Sylke Krenkel, Volkmar Müller, Fred C.G.J. Sweep, Christoph Thomssen, Jürgen Dittmer

Poster; AACR Advances in breast cancer research 2007; San Diego, CA, USA, 17.-20.Oktober 2007

„Das Migrationsinhibitor-Protein Rho-GDI $\beta$  stimuliert die Expression des Onkogens Cox-2 im Brustkrebs“

**Dario Schunke**, Paul Span, Henrike Ronneburg, Angela Dittmer, Martina Vetter, Hans-Jürgen Holzhausen, Eva Kantelhardt, Sylke Krenkel, Volkmar Müller, Fred C.J.G. Sweep, Christoph Thomssen, und Jürgen Dittmer

Poster, Herbsttagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., Landesgruppe Sachsen-Anhalt, Magdeburg, 01.12.2007

## **Danksagung**

Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer für die Überlassung des anspruchsvollen Themas sowie die angenehme und freundliche Atmosphäre des Forschungslabors in der Klinik für Gynäkologie. Dies ermöglichte mir die freie und ungehinderte Durchführung meiner Experimente auf einem wissenschaftlich hohen Niveau, und erlaubte mir einen exzellenten Einblick in die komplexe Welt der Forschung.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer auch für seine Ratschläge in allen praktischen und theoretischen Fragen. Die zahlreichen mit ihm geführten fachlichen Diskussionen haben wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich Frau Dr. rer. nat. Martina Vetter für ihre tatkräftige und geduldige Unterstützung beim Erlernen neuer Methoden und der Durchführung der Versuche im Labor aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei Angela Dittmer und Dipl. biol. Cornelia Willing für die unkomplizierte und effiziente Zusammenarbeit bedanken. Sie trugen wesentlich zur Erleichterung meiner Arbeit bei.

Mein herzlicher Dank gehört nicht zuletzt meinen Eltern und meinen Großeltern für die immer gewährte großzügige Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg und allen, nicht namentlich erwähnten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dario Schunke

Halle, im Dezember 2007