

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

**Prognostische Relevanz von Rho-GDP dissociation  
inhibitor Proteinen beim Mammakarzinom**

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

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

von Henrike Ronneburg  
geboren am 19.04.1982 in Lüneburg

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

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

Prof. Dr. rer. nat. Kurt Engeland (Universität Leipzig)

Datum der Verteidigung: 11.08.2009

Meinen Eltern gewidmet

## Referat und bibliografische Beschreibung

In der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Relevanz von Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  (Rho-GDP dissociation inhibitor), beides Inhibitoren der Rho-gesteuerten Zellmigration, im invasiven Mammakarzinom untersucht. Es wurde ein 117 Tumorpräparate umfassendes Kollektiv mittels Immunhistochemie beurteilt. Ein weiteres Kollektiv von 87 primären Mammakarzinomproben und MDA-MB-231-Brustkrebszelllinien wurden mittels Westernblot auf die Expression von Rho-GDI $\beta$  hin untersucht. In MCF-7 Zellen wurde spezifisch Rho-GDI $\alpha$  nachgewiesen. Rho-GDI $\alpha$  ist ein ubiquitär exprimiertes GDI, wohingegen Rho-GDI $\beta$  hauptsächlich in hämatopoetischen Geweben vorkommt. Beide Rho-GDI-Proteine konnten in den untersuchten Brustkrebsproben auf Proteinebene spezifisch nachgewiesen werden.

Ein Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben konnte für Rho-GDI $\alpha$  festgestellt werden. In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass Rho-GDI $\alpha$  ein unabhängiger prognostischer und prädiktiver Faktor im Mammakarzinom ist. Trotz der sehr ähnlichen Funktionen konnte für Rho-GDI $\beta$  kein Effekt auf das krankheitsfreie- oder Gesamtüberleben gefunden werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rho-GDIs nicht ausschließlich migrationshemmende Funktionen haben. So konnten für Rho-GDI $\beta$  bereits sowohl anti- als auch prokarzinogene Eigenschaften nachgewiesen werden. Zum Einen zeigt sich ein inhibierender Effekt auf die Migration in MDA-MB-231 Mammakarzinom-Zelllinien und zum Anderen wird Rho-GDI $\beta$  von dem Transkriptionsfaktor Ets-1 reguliert, dessen prognostisch ungünstiger Effekt im Mammakarzinom bekannt ist. Eine Regulation der Cyclooxygenase 2 auf Transkriptionsebene durch Rho-GDI $\beta$  konnte gesichert werden. Die Cyclooxygenase 2 ist ein bekannter Tumorpromotor.

Auch für Rho-GDI $\alpha$  sind Funktionen im Tumor bekannt, u.a. Einflussnahme auf die estrogenabhängige Transkription und auf die Entwicklung von Chemoresistenzen. In der Literatur wird Rho-GDI $\alpha$  oft als Tumorpromotor beschrieben, der sich ungünstig auf die Prognose auswirken kann. Hingegen scheint Rho-GDI $\alpha$  im Brustkrebs eher als Tumorsuppressor zu fungieren, da eine höhere Expression mit einem längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert ist.

Ronneburg, Henrike: Prognostische Relevanz von Rho-GDP dissociation inhibitor Proteinen beim Mammakarzinom.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2009

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Mammakarzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologische Daten	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Klassifikation des Mammakarzinoms	2
1.1.4 Therapie	4
1.1.5 Prognose- und Prädiktivfaktoren	7
<b>1.2 Rho Proteine und das Mammakarzinom</b>	<b>10</b>
1.2.1 Rho Proteine und ihre Regulationsmechanismen	10
1.2.2 Funktionen der Rho-GTPasen	12
1.2.3 Rho-GDIs	16
1.2.4 Rho-GTPasen und Rho-GDIs in der Tumorentstehung	17
1.2.5 Bedeutung der Rho-GTPasen und ihrer Regulatorproteine in der Praxis	21
<b>2 Fragestellung</b>	<b>23</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Patientenkollektiv</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Material</b>	<b>24</b>
3.2.1 Chemikalien, Antikörper, Zelllinien und Enzyme	24
3.2.2 Kits	25
3.2.3 Geräte	26
3.2.4 Verbrauchsmaterialien	26
3.2.5 Lösungen	27
<b>3.3 Methoden</b>	<b>27</b>
3.3.1 Immunhistochemie	27
3.3.2 Westernblotanalyse	29
3.3.3 Zellkultur	30
3.3.4 Statistik	30

---

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Charakteristik des Kollektivs</b>	<b>31</b>
4.1.1 Gesamtkollektiv	31
4.1.2 CMF-Subkollektiv	33
<b>4.2 Festlegung des Schwellenwertes bei der immunhistochemischen Analyse</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Expression von Rho-GDI<math>\beta</math> und Rho-GDI<math>\alpha</math> im Mammakarzinom und im Normalgewebe</b>	<b>34</b>
4.3.1 Expression von Rho-GDI $\beta$	35
4.3.2 Expression von Rho-GDI $\alpha$	37
<b>4.4 Korrelation der Rho-GDI<math>\beta</math>-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern</b>	<b>38</b>
<b>4.5 Univariate Überlebensanalyse für Rho-GDI<math>\beta</math> (Kaplan-Meier-Analyse)</b>	<b>41</b>
4.5.1 Univariate Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs für Rho-GDI $\beta$	41
4.5.2 Univariate Überlebensanalyse des CMF-Subkollektivs für Rho-GDI $\beta$	44
4.5.3 Log-rank bei verschiedenen Schwellenwerten für die Rho-GDI $\beta$ -Expression	45
<b>4.6 Korrelation der Rho-GDI<math>\alpha</math>-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern</b>	<b>46</b>
<b>4.7 Univariate Überlebensanalyse für Rho-GDI<math>\alpha</math> (Kaplan-Meier-Analyse)</b>	<b>48</b>
4.7.1 Univariate Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs für Rho-GDI $\alpha$	48
4.7.2 Univariate Überlebensanalyse des CMF-Subkollektivs für Rho-GDI $\alpha$	52
4.7.3 Log-rank bei verschiedenen Schwellenwerten für die Rho-GDI $\alpha$ -Expression	52
<b>4.8 Multivariate Überlebensanalyse</b>	<b>53</b>
4.8.1 Multivariate Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs	53
4.8.2 Multivariate Analyse des CMF-Subkollektivs	55
4.8.3 Multivariate Analyse bei verschiedenen Schwellenwerten für Rho-GDI $\beta$ (Gesamtkollektiv)	56
4.8.4 Multivariate Analyse bei verschiedenen Schwellenwerten für Rho-GDI $\alpha$ (Gesamtkollektiv)	57
<b>5 Diskussion</b>	
<b>5.1 Korrelationen von Rho-GDI<math>\alpha</math> und Rho-GDI<math>\beta</math> mit klinisch-pathologischen Parametern</b>	<b>59</b>

<b>5.2 Bedeutung von Rho-GDI<math>\beta</math> beim Mammakarzinom</b>	<b>60</b>
<b>5.3 Bedeutung von Rho-GDI<math>\alpha</math> beim Mammakarzinom</b>	<b>61</b>
<b>5.4 Einflüsse der beiden Rho-GDIs aufeinander</b>	<b>65</b>
<b>5.5 Schlussbetrachtung und Ausblick</b>	<b>65</b>
5.5.1 Rho-GDI $\alpha$ als potenzieller Biomarker	65
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>8 Thesen</b>	<b>80</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

95% CI:	95% Konfidenzintervall
AGO:	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
ALH:	atypische lobuläre Hyperplasie
AI:	Aromataseinhibitoren
AP-1:	Activator Protein-1
ARNO:	Arimidex-Nolvadex-Studie
ARHGDI A:	Aplysia Ras homolog GDP dissociation inhibitor A ( $\alpha$ )
ARHGDI B:	Aplysia Ras homolog GDP dissociation inhibitor B ( $\beta$ )
ARHGDI G:	Aplysia Ras homolog GDP dissociation inhibitor G ( $\gamma$ )
ATAC:	Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination
BIG:	Breast International Group
BRCA:	breast cancer susceptibility gene
C-Terminus:	Carboxy-Terminus
Ca <sup>2+</sup> :	Calcium
Cdc42:	cell division cycle 42
ChIP:	Chromatin-Immun-Präcipitation
CI:	Konfidenzintervall
Cox-2:	Cyclooxygenase 2
DCIS:	Duktales carcinoma in situ
Dbl:	Diffuses B-cell-lymphoma
DH:	Dbl-Homologie
EBCTCG:	Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group
ECM:	extracellular matrix
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF:	epithelial growth factor
EGFR:	epithelial growth factor receptor
ER:	Estrogenrezeptor
ERM:	Ezrin, Moesin, Radixin
EtOH:	Ethanol
Ets1:	E26 transformation specific sequence
GAP:	guanine nucleotide activation protein

---

GDF:	GDI displacement factor
GDI:	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP:	Guanosindiphosphat
GEF:	guanine nucleotide exchange factor
GEKID:	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GnRH:	gonadotropin releasing hormone
GRIP1:	glucocorticoid interacting protein 1
GTP:	Guanosintriphosphat
GTPase:	Guanosintriphosphatase
Her2neu:	human epithelial growth factor 2
HR:	Hormonrezeptor
IBC:	inflammatorisches Mammakarzinom
IES:	Intergroup Exemestane Study
IQGAP:	immuno quality assured guanine nucleotide activating factor
kDa:	kilo Dalton
LCIS:	Lobuläres Carcinoma in situ
mg:	Milligramm
m-Tor:	mammalian target of Rapamycin
MDCK:	Madin-Darby canine kidney cells
MINDACT:	Microarray for Node Negative Disease may avoid Chemotherapy
MRM:	Modifiziert radikale Mastektomie
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
N-terminus	Amino-Terminus
neg.:	negativ
NFAT:	nuclear factor of activated T-cells
NFκB:	Nuclear Factor κ B
NMR:	nuclear magnetic resonance
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PAK:	p21- activated kinase
Par:	partitioning defective
PBS:	phosphate buffered saline
PgR:	Progesteronrezeptor



PKC:	Proteinkinase C
pos.:	positiv
Rac1:	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ras:	rat sarcoma
Rho:	Ras homologous
Rho-GAP:	Rho GTPase activating factor
Rho-GDI:	Rho GDP dissociation inhibitor
Rho-GEF:	Rho-GTP exchange factor
RKI:	Robert Koch Institut
ROCK:	Rho-associated coiled-coil kinase
RT-PCR:	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SERM:	Selektive Estrogen Modulators
siRNA:	small interfering RNA
TAILORx:	Trial for Assigning Individualized Options for Treatments
TC10:	teratocarcinoma 10
Tiam	T- cell lymphoma invasion
u.a.	unter anderem
uPA:	urokinase-type Plasminogen Activator
V:	Volt
vs.:	versus
WHO:	World Health Organization
Wrch-1:	Wnt-regulated Cdc42 homolog-1
z.B.:	zum Beispiel

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das Mammakarzinom**

### 1.1.1 Epidemiologische Daten

Brustkrebs ist weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau (RKI, 2005).

Nach Schätzungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) erkranken jährlich 57.000 Frauen in Deutschland an einem Mammakarzinom (RKI, 2008).

Im Durchschnitt muss jede 10. Bis 11. Frau ohne weitere Vorerkrankungen damit rechnen, in ihrem Leben an einem Mammakarzinom zu erkranken (Schön et al., 2004). In der BRD macht das Mammakarzinom ca. 24% der Krebserkrankungen aus. Besonders auffällig ist die Inzidenz bei Frauen vergleichsweise sehr jungen Alters. Bei den in Deutschland lebenden Frauen im Alter zwischen 35 und 59 Jahren sind 40% der Krebsneuerkrankungen pro Jahr und bis zu 30% der krebsbedingten Todesfälle auf Brustkrebs zurückzuführen. (RKI, 2005)

Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 63 Jahren deutlich niedriger als das mit 69 Jahren für Krebserkrankungen insgesamt (RKI, 2008).

Alle Karzinomerkrankungen in Deutschland betrachtet, gehen die meisten Krebssterbefälle bei Frauen auf das Konto von Brustkrebs. Laut Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes erlagen im Jahr 2003 17.117 Frauen den Folgen dieser Krankheit (RKI, 2005).

Auffällig ist, dass die epidemiologischen Daten geographisch stark variieren. Betrachtet man die EU-Länder, so sind die Inzidenzen für Brustkrebs beispielsweise in Dänemark, Belgien und Schweden am höchsten, in Portugal, Griechenland und Spanien am niedrigsten (GEKID, 2006).

### 1.1.2 Ätiologie

Aufgrund der stets weiter steigenden Inzidenz des Mammakarzinoms in allen Altersstufen wird sich verstärkt mit den Ursachen dieser Erkrankung beschäftigt. Einige Erklärungsansätze sind mittlerweile sehr gut belegt. Allgemein anerkannt ist ein hohes Lebensalter als Risikofaktor für das Auftreten einer Neuerkrankung (Nixon et al., 1994). Die Inzidenz sinkt jedoch auch nicht bei Frauen relativ jungen Erkrankungsalters (RKI, 2005; Thomssen, 2002). Es müssen also noch andere Risikofaktoren in die Genese des Mammakarzinoms mit einfließen.

Von entscheidender Bedeutung scheint hierbei der Trend zu einer verlängerten hormonellen Exposition zu sein. Frühe Menarche mit spät einsetzender Menopause sowie extern zugeführte Hormonpräparate zur Kontrazeption und zur Linderung klimakterischer

Beschwerden tragen hierzu verstärkt bei (Thomssen, 2005). Bereits vor über hundert Jahren beschrieb Georges Beatson den Zusammenhang zwischen Estrogen und der Entstehung von Brustkrebs. Durch beidseitige Oophorektomie konnte er eine Remission im Prozess von inoperablen Mammakarzinomen bei prämenopausalen Patientinnen beobachten (Beatson, 1896).

Im Gegensatz zu früher besteht heute der Trend zu weniger Geburten im höheren Lebensalter oder Nulliparität bei kurzen oder ausbleibenden Stillperioden. Bei einer ausgetragenen Schwangerschaft im oder nach dem 35. Lebensjahr ist im Gegensatz zu einer beendeten Schwangerschaft im 20. Lebensjahr die Gefahr, an einem Mammakarzinom zu erkranken, um 40% erhöht. Die geringen Estrogenspiegel in der Amenorrhoe und der Anovulation in der Stillzeit senken das Risiko für die Erkrankung messbar (Thomssen, 2005; Clemons and Goss, 2001). Ernährung, Bewegungsmangel und Umweltfaktoren werden ebenfalls modulierende Effekte nachgesagt (Beckmann and Lux, 2004).

Tumorbiologisch lassen sich das spontane (90-95%) und das hereditäre Mammakarzinom (5-10%) voneinander unterscheiden. Autosomal vererbte Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 lassen sich bei 15-20% aller familiären Mammakarzinome nachweisen (Easton, 2002; Ponder, 2001). Ein weiterer Aspekt in der Genese des Mammakarzinoms ist also die Erbllichkeit einer Disposition.

### 1.1.3 Klassifikation des Mammakarzinoms

Postoperativ erfolgt das Staging mittels der TNM-Formel. Nach makroskopisch vollständiger Entfernung des Tumors schließt sich eine histopathologische Untersuchung an. Mit der TNM-Klassifikation werden therapeutisch und prognostisch wichtige Eigenschaften des Tumors zusammenfasst. Ursprünglich wurde das TNM-System von der 1933 gegründeten UICC (Union international contre le cancer) ausgearbeitet.

Nach operativer Entfernung des Tumors erfolgt die pTNM-Klassifikation (TNM-Klassifikation, 5. Auflage 1997), wobei T für die Tumorgröße, N für den Nodalstatus und M für die eventuelle Fernmetastasierung steht. Supraklavikulärer, zervikaler, kontralateraler oder sternaler Lymphknotenbefall werden auch als Fernmetastasen gewertet (Bässler, 1998). Die histopathologische Klassifikation der WHO des Mammakarzinoms erfolgt grundsätzlich in invasive- und nicht-invasive Karzinome. Die nicht-invasiven Karzinome stellen zum größten Teil das Duktale carcinoma in situ (DCIS), synonym auch als intraduktales Karzinom bezeichnet, und das lobuläre carcinoma in situ (LCIS), beziehungsweise die atypische lobuläre Hyperplasie (ALH) dar. Dem DCIS wird generell eine günstige Prognose zuge-

schrieben während das LCIS bis heute eine Sonderstellung hat und mit einem erhöhten Entartungsrisiko einhergeht (Sauer, 2005). Die invasiven Karzinome werden in 22 Subtypen klassifiziert. Am stärksten ist hier mit 60-70% das duktal-invasive Mammakarzinom vertreten, welches von den terminalen Gangsegmenten ausgeht. Der zweithäufigste histologische Subtyp ist mit 10-20% das lobuläre Karzinom. Die anderen, selteneren Histologien machen zusammen 10-15% aus (Kreienberg et al., 2002).

### Grading

Von Bloom und Richardson wurde 1957 ein Modell zur Beurteilung des Malignitätsgrades von Karzinomen vorgeschlagen, welches histomorphologische Kriterien durch semiquantitative Bewertung zu einem Punkte-Score zusammenfasst. Hauptaugenmerk liegt auf den Kriterien Tubulusbildung, Kernpleomorphologie und Mitoserate. Die Auswertung des Scores erfolgt nach einheitlicher mikroskopischer Vergrößerung additiv nach den genannten Kriterien. Danach entspricht ein Score von 3-5 einem (gut differenzierten) G1-, ein Score von 6-7 einem (mäßig differenzierten) G2- und ein Wert von 8-9 einem (schlecht differenzierten) G3-Karzinom. Das Grading korreliert mit dem Differenzierungsgrad des Karzinoms, dem Nodalstatus, der Frequenz von Rezidiven, der Mortalität und dem Rezeptorstatus (Reiner et al., 1988; Bässler, 1998).

### Hormonrezeptorstatus

Der wichtigste prädiktive Faktor für die Behandlung des Mammakarzinoms ist die Expression von Estrogen- und Progesteronrezeptoren auf dem Tumor (Harbeck et al., 2002). Die Stärke der Expression ist ausschlaggebend für eine endokrine Therapie. Als konventionelles Verfahren zur Bestimmung des Hormonrezeptorstatus hat sich die Immunhistochemie durchgesetzt. Die Auswertung erfolgt semiquantitativ mittels des so genannten immunreaktiven Scores (IRS), welcher sich aus dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Zellen (pp= percentage points) und der Färbeintensität (SI= Staining intensity) als Produkt zusammensetzt (Remmele and Stegner, 1987). Der klinisch etablierte immunreaktive Score wurde auch für die Auswertung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörperfärbungen angewendet.

### 1.1.4 Therapie

In erster Linie wird die operative Entfernung des Primärtumors in sano angestrebt. Die primäre operative Tumorentfernung mit sich anschließender systemischer Therapie ist das meist angewandte Verfahren. Die neoadjuvante Therapie ist bei primär inoperablen Tumoren und beim inflammatorischen Mammakarzinom absolut indiziert.

Im 19. Jahrhundert war die stark verstümmelnde Operation nach Halsted und Rotter noch das Vorgehen der Wahl. Unter der damals vertretenen Auffassung, das Mammakarzinom sei eine lokoregionär begrenzte Erkrankung, wurde ultraradikal operiert: Mastektomie unter großzügiger Mitnahme großer Hautareale mit Kompletresektion des M. pectoralis major et minor sowie Entfernung aller axillären Lymphknoten (Halsted, 1894). Diese operative Maßnahme war unangetastet fast 80 Jahre lang klinische Routine (Schmolling and Walter, 2003). In den 70er und 80er Jahren wurden Studienergebnisse publiziert, aus welchen hervorging, dass abweichende, noch radikalere Operationsmethoden als die Halsted-Rotter-Methode keinen Unterschied in Bezug auf das Langzeitüberleben erbrachten (Lacour et al. 1976).

In den letzten 25 Jahren wurde der Trend verfolgt, möglichst brusterhaltend eine Kompletresektion des Tumors zu erreichen und zusätzlich das Tumorbett zu bestrahlen (Fisher et al. 1995; Veronesi et al. 1995; Sarrazin et al. 1989). So wurden in den 80er Jahren die radikalen Methoden aufgrund der besseren Therapieergebnisse von brusterhaltenden Verfahren zunehmend abgelöst (Thomssen, 2002). Nach wie vor ist jedoch die modifiziert radikale Mastektomie bei bestimmten Ausbreitungsmustern des Mammakarzinoms indiziert, um eine lokale Tumorkontrolle zu gewährleisten. Absolute Indikationen für die MRM bestehen bei fortgeschrittenen Tumoren nach neoadjuvanter Behandlung und für das inflammatorische Karzinom. Relative Indikationen sind ausgedehnte Präkanzerosen, das familiäre Mammakarzinom, Multizentrität, Lokalrezidive und Kontraindikationen gegen eine postoperative Radiatio (Jakesz and Frey, 2007).

Die komplette Axilladisektion stellte ebenfalls lange Zeit eine übertherapeutische Maßnahme dar, wie Veronesi et al. zeigen konnten (Veronesi et al., 1990). Ganz im Sinne der Reduktion von Morbidität ohne einhergehende Reduktion der Therapieeffizienz konnten minimalinvasivere Operationsmethoden etabliert werden. Die Sentinel-Lymphonodektomie ist heute Bestandteil der onkologischen Chirurgie (Bauerfeind et al., 2005).

Unter Berücksichtigung der etablierten Prognosefaktoren und evidenzbasierten Studien wurde die Einteilung in Risikogruppen vorgeschlagen, an welcher sich empfehlungsgemäß ein Therapiekonzept orientieren kann (Tabelle 1).

Tabelle 1: Risikokategorien des Mammakarzinoms, modifiziert nach den Empfehlungen der Konsensuskonferenz St. Gallen, 2005/2007.

Niedriges Risiko	N0 <u>und</u> Tumor < 2cm <u>und</u> G1 und ER pos./PR pos. <u>und</u> Alter > 35 Jahre <u>und</u> HER2/neu neg. <u>und</u> keine Lymphangiosis <u>und</u> alle T≤1cm; jedes G
Mittleres Risiko	Rezeptor-pos. <u>und</u> Tumor > 2cm <u>oder</u> G2 und G3 <u>oder</u> 1-3 pos. Lymphknoten <u>oder</u> Alter>35 Jahre <u>oder</u> HER2/neu pos. <u>oder</u> keine Lymph- und Hämangiosis
Hohes Risiko	pN > 4 Lymphknoten <u>oder</u> jedes T mit Häm- und Lymphangiosis <u>oder</u> ER/PgR neg. <u>oder</u> Alter < 35 Jahre

### Antiöstrogene (SERM)

Der Goldstandard in der endokrinen adjuvanten Therapie ist bereits seit Jahrzehnten das Medikament Tamoxifen (AGO, 2007). Es wird bisher bei allen Patientinnen mit rezeptorpositivem- und auch bei unbekanntem Rezeptorstatus angewandt. Der Estrogenrezeptor alpha wird kompetitiv antagonisiert und dadurch das Wachstum des Karzinoms gehemmt. Tamoxifen hat jedoch gleichwohl eine gewebsspezifische estrogene Wirkung, am effektivsten an Leber, Knochen und Endometrium. Erwünschte Nebenwirkungen sind somit die antiresorptive Wirkung an Knochen (Schutz vor Osteoporose). Unerwünschte Nebenwirkungen sind u.a. proliferative Wirkung am Endometrium und gehäuftes Auftreten von Blutungen, Polypen und Endometriumkarzinomen. Unabhängig vom Menopausenstatus führt die Einnahme von Tamoxifen 20 mg/Tag über fünf Jahre zu einer Reduktion des relativen Rezidivrisikos um 41%, des relativen Mortalitätsrisikos um 34 % und um 39 % für das Auftreten eines kontralateralen Karzinoms nach 15 Jahren (EBCTCG, 2005).

### Aromataseinhibitoren

Bei der postmenopausalen Patientin sind nach neuesten Studienpublikationen die Aromataseinhibitoren der 3. Generation (Anastrozol, Letrozol, Exemestan) interessant geworden, zahlreiche Studien beschäftigen sich mit dieser Therapieoption (u.a. ATAC-, BIG-, IES-Studie). Bei diesen Patientinnen konnten im Vergleich zu Tamoxifen signifikante Ergebnisse (längeres rezidivfreies Überleben, längeres metastasenfreies Überleben, weniger kontralaterale Mammakarzinome) vorgelegt werden. Einige Studien belegten in Subgruppen sogar ein längeres Gesamtüberleben (ARNO-, IES-, MA-17-Studie). Die Kommission Mamma empfiehlt den sequenziellen Einsatz von Tamoxifen und Aromataseinhibitoren. Bei

prämenopausalen Frauen kann die Anwendung von AI nicht empfohlen werden.

### GnRH-Analoga

Die Behandlung mit GnRH-Analoga bewirkt eine ovarielle Suppression. Neben den beiden anderen Möglichkeiten der ovariellen Suppression, der Ovariectomie und der radiotherapeutischen Ovarablation, ist sie, nicht zuletzt wegen ihrer Reversibilität, die präferierte Therapie.

Die GnRH-Analoga Behandlung führt zur Entkopplung der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse. Dies hat einen Gonadotropinmangel zur Folge, worauf die ovarielle Estrogen-Produktion eingestellt wird. Im Speziellen ist die Behandlung mit GnRH-Analoga von Mammakarzinompatientinnen mit bestehendem Kinderwunsch zu erwähnen. Hier kommen GnRH-Analoga zur Protektion der Ovarfunktion vor einer Chemotherapie zum Einsatz (AGO, 2007).

### Chemotherapie

1967 konnte von der Arbeitsgruppe von R. Cooper erstmals gezeigt werden, dass das Mammakarzinom durch Zytostatika zu beeinflussen ist. Durch adjuvante Anwendung einer Kombination von Cyclophosphamid, Metotrexat, 5-Fluoracil, Vincristin und Prednison konnten Remissionsraten bei lokoregionär fortgeschrittener Erkrankung von bis zu 50% erzielt werden (Cooper, 1969). Das abgewandelte Schema, bestehend aus Cyclophosphamid, Metotrexat und 5-Fluoracil (CMF-Schema) wurde von Bonadonna et al. 1976 eingeführt. Es war jahrelang das Standard-Kombinationsschema bei lokoregionär fortgeschrittener Erkrankung. Zahlreiche Studien versuchten, effektivere Chemotherapie-Regimes zu etablieren. Die Konsequenz ist, dass heute das ursprüngliche CMF-Schema lediglich noch bei Kontraindikationen der gebräuchlichen Chemotherapien zum Einsatz kommt (AGO, 2007). 1998 konnten Levine et al. beweisen, dass ein anthrazyklinhaltiges Schema (FEC) gegenüber CMF in Bezug auf rezidivfreies Überleben- und Gesamtüberleben überlegen ist. Oft wird das FE120C Protokoll als heutiger Goldstandard bezeichnet (AGO, 2007). Es steht mittlerweile fest, dass auch eine sequenzielle, adäquat dosierte Chemotherapie mit Anthrazyklinen (Epirubicin, Adriamycin=Doxorubicin) dem CMF-Schema überlegen ist (Poole et al., 2006). Epirubicin, in adäquater Dosierung ( $>30\text{mg/m}^2$  /Woche) und in Dreier (FEC) - bzw. Viererkombination (E-CMF) gegeben, stellt im klinischen Alltag mittlerweile einen Standard in der Therapie der Mittel- und Hochrisiko Brustpatientinnen dar (Tabelle 1). Neben den Anthrazyklinen sind auch Taxane in der adjuvanten systemischen Therapie von zunehmender

Bedeutung. Die AGO empfiehlt den Einsatz von Taxanen (Paclitaxel, Docetaxel) in der nodal-positiven Situation uneingeschränkt.

Nach ausführlicher Abschätzung von Nutzen und Risiko für die jeweilige Patientin ist sie nach wie vor neben der „targeted therapy“ ein integraler Bestandteil der adjuvanten systemischen Therapie des Mammakarzinoms (AGO, 2007). Bei den hormonrezeptorpositiven Karziomen ist die sequenzielle chemoendokrine Therapie eine Option, bei hormonrezeptornegativen und HER2neu-überexprimierenden Tumoren ist die Chemotherapie als obligat einzustufen (AGO, 2007).

#### Adjuvante Strahlentherapie

Die postoperative Bestrahlung mittels Gammastrahlung, Photonen oder Elektronen des betroffenen Areals nach Operationen dient der lokalen Tumorkontrolle. Die Rate lokaler Rezidive kann so signifikant gesenkt werden (AGO, 2007). Aktualisierte Auswertungen der EBCTCG und der British-Columbia-Studie haben die Kommission Mamma der AGO dazu bewogen, die Radiotherapie bereits bei einem Lymphknotenbefall von 1-3 Knoten zu empfehlen, vor allem bei den Patientinnen von einem Alter  $\leq 35$  Jahren (Peto, 2006; Ragaz et al., 2005). Die AGO empfiehlt aktuell die sogenannten Boostbestrahlungen („Aufsättigungsradiotherapie“). Eine auf den Sitz des Primärtumors begrenzte, zusätzlich erhöhte Dosis soll weitere Erfolge in Bezug auf weniger Rezidive erbringen (Bartelink et al., 2001).

#### 1.1.5 Prognose- und Prädiktivfaktoren

Ein prognostischer Faktor erlaubt die Vorhersage eines Krankheitsverlaufs sowie eine Abschätzung des individuellen Rezidiv- und Sterberisikos eines Patienten (Harbeck et al., 2002). Ein guter Prognosefaktor erleichtert die Unterscheidung zwischen einer Patientengruppe mit niedrigem Risiko von einer Hochrisikogruppe für beispielsweise ein Tumorrezidiv, eine Fernmetastasierung oder den Sterbefall des Patienten (Untch et al., 1998).

Einige prognostische Faktoren haben sich im klinischen Alltag seit Jahren etabliert. Es handelt sich hier hauptsächlich um tumormorphologische Kriterien, welche obligat bei der Diagnostik bestimmt werden. Der Lymphknotenstatus (pN), also die Anzahl der tumorbefallenen axillären Lymphknoten bei Primärdiagnose gibt Aufschluss auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben (Graeff et al., 1997). Er gilt diesbezüglich nach wie vor als der wichtigste bewährte prognostische Faktor. Es konnte gezeigt werden, dass 75% der nodalnegativen Patientinnen nach einer lokoregionären Therapie geheilt werden können, während dies nur bei 25% der nodalpositiven Mammakarzinomen der Fall ist (Carter et al.,



1989). Das Alter der Patientin bei Erstdiagnose besitzt ebenfalls prognostische Wertigkeit. Junge Patientinnen mit einem Erkrankungsalter unter 35 Jahren haben insgesamt eine ungünstigere Prognose als Patientinnen höheren Alters bei Primärdiagnose (Nixon et al., 1994).

Ein prädiktiver Faktor soll Aussagen über die Wirksamkeit einer Therapie treffen. Der wichtigste prädiktive Faktor für das Ansprechen auf eine hormonelle Therapie ist der Hormonrezeptorstatus von Estrogen- und Progesteronrezeptoren auf dem Tumor. Eine Mehrzahl der Patientinnen von 75% hat einen hormonrezeptorpositiven Befund. Dem Hormonrezeptorstatus wird auch eine prognostische Wertigkeit zugeschrieben, jedoch unterliegt diese einer gewissen Zeitabhängigkeit. Die Überlebenskurven von HR-positiven und HR-negativen Patientinnen nähern sich im Verlauf einander immer weiter an (Clark et al., 2000). Bei etwa 20-30% aller Mammakarzinome wird der 1981 entdeckte HER2-Rezeptor (Human epithelial growth factor receptor 2) überexprimiert (Shih et al., 1981; Revillon et al., 1998). Es handelt sich hier um einen zur HER-Familie gehörenden Wachstumsfaktorrezeptor, synonym auch HER2/neu oder c-erbB-2 oder erb-B2. Über HER2 wird die Zellproliferation via der Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Kinase Kaskade vermittelt und die Apoptose über den mTOR-Weg gehemmt (Hudis, 2007). Dieser Rezeptor ist also maßgeblich an der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen in der Zelle beteiligt. Eine Überexpression von HER2 ist mit einer onkogenen Transformation vergesellschaftet. Damit verbunden sind autonomes Zellwachstum, Tumordinvasion, Angiogenese und Metastasierung (Ditsch et al., 2006; Yarden, 2001). Seit 1999 steht der Hercep-Test der Firma DakoCytomation für die klinische Routine zur Verfügung. In Zweifelsfällen wird oft am gleichen Tumorpräparat eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) angeschlossen (Lebeau et al., 2001). Insbesondere beim metastasierten Mammakarzinom entspricht der HER2-Score einem prädiktiven Wert, indem er den Therapieerfolg mit dem Antikörper Trastuzumab vorhersagen kann. Es konnte festgestellt werden, dass der prädiktive Wert des HER2-Status nicht ausschließlich für das Ansprechen einer Therapie mit Trastuzumab, sondern eingeschränkt auch für eine Tamoxifen-Therapieresistenz bei hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen aussagekräftig ist (Ravdin et al., 1998).

In den letzten Jahren der Forschung in der Biochemie, der Zellkinetik und der Genetik des Mammakarzinomes ist eine fast unüberschaubare Vielfalt an neuen Prognosefaktoren zusammen gekommen. Die klinische Notwendigkeit darin lässt sich am stärksten bei den nodal-negativen Patientinnen erkennen. Bei etwa 90% der Frauen ohne Lymphknotenbefall wird die adjuvante systemische Chemotherapie empfohlen, obwohl höchstens 30% jemals ein

Rezidiv ihrer Erkrankung erleiden werden (Harbeck et al., 2002).

Vielversprechende neue prognostische Faktoren sind der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp uPA und sein Inhibitor PAI-1. Sie konnten auf höchstem Evidenzniveau mit einer prospektiven klinischen Studie (Jänicke et al., 2001) und einer Metaanalyse (Look et al., 2002) validiert werden. Diese beiden Faktoren sind in die Metastasierung und Invasionsfähigkeit von Tumorzellen involviert (Andreasen et al., 1997). Bei niedrigen Werten der beiden Faktoren konnte ein längeres rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben signifikant nachgewiesen werden (Look et al., 2002). Auch konnte in der Metaanalyse ein prädiktiver Faktor in uPA und PAI-1 gefunden werden: Bei nodal-negativen Patientinnen mit niedrigen Werten war die Prognose so gut, dass auf eine systemische Chemotherapie verzichtet werden konnte (Harbeck et al., 2002).

Die Heterogenität des Mammakarzinoms erschwert die Suche nach neuen, praxisrelevanten Prognosefaktoren und damit die Unterscheidung zwischen einem Hoch- und Niedrigrisiko bei Brustkrebspatientinnen. Ein neuer Ansatz sind Microarrays, eine molekularbiologische Methode, mittels derer die Expression von mehreren tausend Genen gleichzeitig untersucht werden kann. Die Arbeitsgruppe van't Veer et al. haben mit einer Microarray-Analyse ein 70 Gene umfassendes Genexpressionsmodell für das Mammakarzinom entwickelt. Alle 70 Gene werden mit der Prognose in Zusammenhang gebracht. Mit diesem Genexpressionsmodell soll eine Diskriminierung zwischen der Hoch- und der Niedrigrisikogruppe von Mammakarzinompatientinnen ermöglicht werden und einen effizienteren Einsatz von Chemotherapien erleichtern (van't Veer et al., 2002; Andre and Pusztai, 2006). Dieser Test ist bereits unter dem Namen MammaPrint® akzeptiert und kommerziell erhältlich, wird jedoch kontrovers diskutiert (AGO, 2007). Im MINDACT trial wird MammaPrint® derzeit in der Phase III der klinischen Studie validiert (Andre and Pusztai, 2006).

In einer anderen Studie wurden 16 Gene, deren Relevanz auf den Krankheitsverlauf bereits bekannt war, retrospektiv an in Paraffin eingebetteten Mammakarzinomen mittels RT-PCR untersucht (Paik et al., 2004). Mit diesem unter dem Namen Oncotype Dx® bekannten Test konnten Paik et al. drei Risikogruppen für Mammakarzinompatientinnen in Hinblick auf ein Krankheitsrezidiv definieren. Oncotype Dx® wird im TAILORx trial in der Phase III getestet (Andre and Pusztai, 2006).

## 1.2 Rho Proteine und das Mammakarzinom

### 1.2.1 Rho Proteine und ihre Regulationsmechanismen

Rho-Proteine, auch Rho-GTPasen genannt, sind GTP-bindende Proteine mit intrinsischer GTPase-Aktivität. Rho-GTPasen gehören zur Superfamilie der kleinen GTPasen. Sie haben eine molekulare Masse zwischen 20 und 40 kDa. Diese GTPasen spielen eine Schlüsselrolle in Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Rho-GTPasen sind wesentlich an der Regulation der zellulären Migration und Adhäsion beteiligt. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist die Steuerung der Aktindynamik. Durch Regulation der Neubildung und Verzweigung von Aktinfilamenten steuern die Rho-GTPasen die Ausbildung von sogenannten Filopodien, Stressfasern, Lamellipodien, fokalen Adhäsionen und Plasmamembran-Ausstülpungen, die unerlässlich für die Zellmigration sind (Ladwein and Rottner, 2008).

Die Isolierung der ersten Rho-GTPase glückte der Forschungsgruppe von Madaule et al. aus Bauchganglien des Mollusken *Aphysia Californica* im Jahre 1985 (Madaule and Axel, 1985). Der Name Rho (Rho= Ras-homologous) wurde aufgrund der auffälligen Ähnlichkeit zu dem 1981 entdeckten ras-Gen (Murray et al., 1983), welches ebenfalls eine kleine GTPase kodiert, gewählt. Die Superfamilie der Ras-Proteine setzt sich aus sechs Subfamilien zusammen: RhoA-ähnliche GTPasen (RhoA, RhoB, RhoC), Rac-ähnliche GTPasen (Rac1, Rac1b, Rac2, Rac3, RhoG), Cdc42-ähnliche GTPasen (Cdc42, TC10, TCL, Chp/Wrch-2, Wrch-1), die Rnd-Subfamilie (Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3), die RhoBTB-Subfamilie und die Miro-Subfamilie (Wennerberg and Der, 2004). Ras-Proteine sind über verschiedene Signaltransduktionswege an Wachstums- und Differenzierungsvorgängen der eukaryotischen Zelle beteiligt. Mutationen im ras-Gen sind gehäuft in menschlichen Karzinomen zu finden. (Macara et al., 1996).

Heute sind beim Menschen 22 Rho-Gene bekannt, welche 25 Signalmoleküle kodieren (Wennerberg and Der, 2004). Die Aminosäuresequenzen der Proteine Ras und Rho entsprechen sich in bis zu 35%. In ihrer Primärsequenz entsprechen sich Rho GTPasen untereinander in bis zu 55% (Hall 1994, Aktories 1997, Freeman et al., 1994). Am besten untersucht sind die Proteine der Rho-, Rac- und Cdc42- Subfamilien.

Rho GTPasen können als molekulare Schalter bezeichnet werden. Der Aktivitätszustand ist von einem zyklischen Wechsel ihrer Nukleotidbindung abhängig. In GTP-gebundener Form sind Rho-GTPasen aktiv und interagieren mit ihren sogenannten Effektoren, in GDP-gebundener Form sind sie inaktiv (Schmidt and Hall, 2002).

Die „Umschaltung“ von inaktiv zu aktiv und zurück wird in einem Kreislauf von mehreren

spezifischen Regulatorproteinen gesteuert. (Abb. 1).

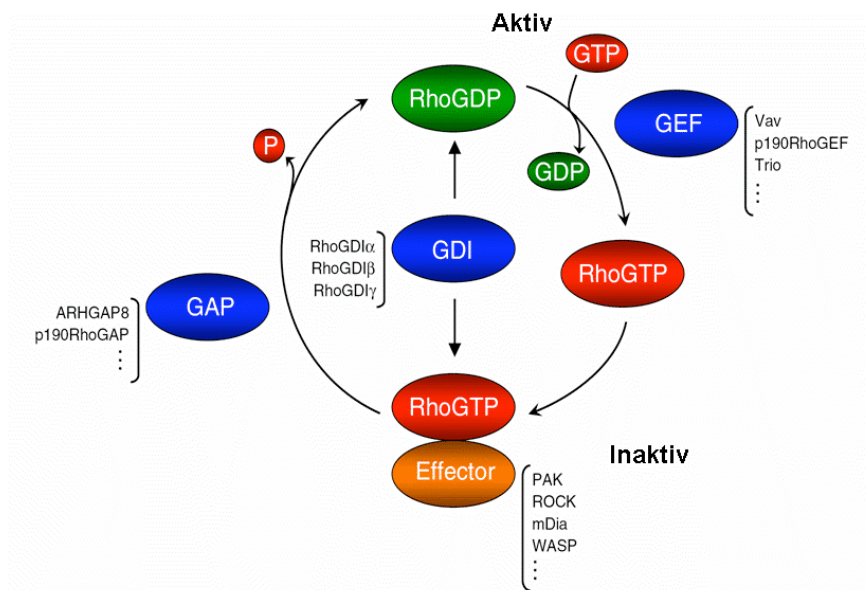


Abb. 1 : Schema des allgemeinen Ablaufes des Rho-GTPasen-Zyklus:

Die Regulation des Aktivitätszustandes der Rho-GTPasen wird über spezifische Proteine gesteuert: GEF erleichtern die GTP-Bindung und unterstützen die Bildung des membran-gebundenen Zustandes. Durch Reaktion mit den sogenannten Effektoren können aktive RhoGTPasen ihre biologischen Wirkungen entfalten. GAP aktivieren die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-GTPase, welche dann GTP in GDP umwandelt und damit das Rho-Protein in einen inaktiven Zustand überführt, welcher durch RhoGDIs stabilisiert wird (modifiziert nach Vega and Ridley, 2008).

Inaktive Rho-GTPasen werden durch GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) aktiviert. GEFs werden wiederum durch verschiedene Rezeptoren, z.B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Zytokinrezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen stimuliert (Hall and Nobes, 2000). GEFs unterstützen den aktiven Zustand der GTPase, indem sie die Dissoziation des fest gebundenen GDPs von dieser in mehreren Schritten beschleunigen und zusätzlich die starke Interaktion zwischen der GTPase mit GDP destabilisieren (Cherfils and Chardin, 1999). Alle GEFs enthalten eine konservierte, 150 Aminosäuren beinhaltende Dbl-homology (DH) Domäne, welcher eine pleckstrin-homology (PH) Domäne mit 100 Aminosäuren folgt (Hoffman and Cerione, 2002). Diese DH-PH Domäne ist entscheidend für die Reaktion mit der GTPase (Lin and van Golen, 2004).

Die Überführung in den inaktiven Zustand der Rho-GTPase erfolgt über die Regulatorproteine GAP (Guanine nucleotide activation protein) und GDI (Guanine nucleotide

dissociation inhibitor). GAPs erhöhen die Geschwindigkeit der ansonsten langsamen intrinsischen GTPase-Aktivität um mehrere Zehnerpotenzen (Gideon et al., 1992; Scheffzek et al., 1998). Die Lebensdauer des aktiven Zustandes wird stark herabgesetzt. Die Rho-GDIs können mit aktiven Rho-GTPasen interagieren und die Reaktion mit Effektorproteinen verhindern (Adra et al., 1997). Die Funktionen von Rho-GDI-Proteinen werden unter 1.2.3 genau beschrieben.

Rho-Proteine müssen mit der Innenseite der Zellmembran mittels eines Lipidankers verbunden sein, um über die Plasmamembran biologisch aktiv zu sein. Die Proteine haben am C-Terminus ein sogenanntes CAAX Motiv (cysteine aliphatic amino acid x, x = Leucin oder Phenylalanin), an welchem die spezifische Modifizierung stattfindet (Fauré und Dagher 2001; Wennerberg and Der, 2004). RhoA und RhoC-GTPasen werden geranylgeranyliert, während RhoB geranylgeranyliert oder farnesyliert werden kann (Adamson et al., 1992).

Im aktiven Zustand können sie mit ihren Effektoren reagieren. Hauptsächlich handelt es sich hier um Kinasen, Lipasen, Oxidasen und Gerüstproteine der Ziele. Es sind mittlerweile über 50 Rho-Effektorproteine bekannt. Mit am besten charakterisierte Effektoren sind die p21-activated kinases (PAKs), welche Cdc42 und Rac1 binden und die Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs, auch ROKs oder Rho kinases), welche RhoA binden (Sahai and Marshall, 2002).

### 1.2.2 Funktionen der Rho-GTPasen

Rho GTPasen sind in fundamentale Prozesse der Zellbiologie involviert. Sie sind für die Physiologie der Stabilisierung und Dynamik der Zellmorphologie und des Zellzusammenhaltes von großer Bedeutung (Gomez del Pulgar et al., 2005; Boettner and van Aelst, 2002).

#### Zell-Zell-Interaktionen

In einem intakten Zellverband sind die Zellen untereinander mit spezifischen Kontakten verbunden, wodurch zum Beispiel bei Epithelzellen eine charakteristische asymmetrische Verteilung von Proteinen und der apikale und der basale Zellpol festgelegt werden. Rho-Proteine sind an der Ausbildung von E-Cadherin-abhängigen Zell-Zellinteraktionen, wie auch adherens junctions, beteiligt (Braga et al., 1997). Aktiviertes Rac spielt eine bedeutende Rolle bei der Stabilisierung der adherens junctions, indem es die Aggregation von Aktinfilamenten fördert (Takaishi et al., 1997). Des Weiteren übt Rac über sein Zielprotein IQGAP (Immuno quality assured guanine nucleotide activating factor) Einfluss auf die

Zelladhäsion aus. Durch die Wirkung von IQGAP auf die intrazellulären Catenine und E-Cadherin wird eine Aktinaggregation hervorgerufen und die Zell-Zell-Verbindung stabilisiert (Fukata et al., 2001; Erikson et al., 1997). In Keratinozyten kann beobachtet werden, dass die Hemmung von Rac oder Rho die Ausbildung von adherens junctions verhindert. In Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) ist Tiam-1, ein GEF für Rac, essentiell für die Bildung und Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Interaktionen (Braga et al., 1997; Malliri et al., 2004). Eine Überaktivierung von Rac führt in Keratinozyten zu einem Abbau der Zell-Zell-Interaktionsstellen, in MDCK-Zellen zu einer gesteigerten Migration. (Braga et al., 2000; Sander et al 1998). Die hauptsächliche Wirkung von Rho auf die Zelladhäsion erfolgt über seinen Effektor ROCK und die dadurch hervorgerufene Aktinaggregation (Jaffe and Hall, 2005).

Eine recht neue Gruppe von  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Transmembranproteinen, Nektine, bringt die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 in einen weiteren Zusammenhang mit Zelladhäsion. Nektine bilden untereinander homo- und heteromolekulare Wechselwirkungen, wodurch Rac und Cdc42 aktiviert werden. Die folgenden Schritte scheinen die Cadherin-basierte Adhäsion zu erleichtern (Fukuhara et al., 2004).

### Zellmotilität

Die Migration von Zellen ist in vielen physiologischen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Embryonalentwicklung, zu beobachten (Trinkaus, 1984). Des Weiteren treten Zellmigrationen auch bei pathophysiologischen Phänomenen wie der Wundheilung, der Infektionsabwehr und der Metastasierung auf (Nobes and Hall, 1999). Die antreibende Kraft der Zellbewegung ist von der Dynamik des Aktinzytoskeletts und den aktinbindenden Proteinen abhängig. Eine Migration kommt durch eine Membranausstülpung an der Zellfront, Zelladhäsion am Substratum und Retraktion am Zellschwanz zustande (Nobes and Hall, 1999).

In migrierenden Zellen sind die Aktinfilamente hauptsächlich in drei Anordnungen charakteristisch: Lamellipodia sind flächige Zellausstülpungen und bestehen aus einer zweidimensionalen, netzartigen Anordnung von Aktin. Filopodien sind fingerartige Strukturen, die Aktinfilamente sind hier parallel gebündelt (Ladwein and Rottner, 2008). Diese beiden Membranauswüchse entstehen am führenden Pol der Zelle und sind für eine Vorwärtsbewegung wichtig. Über sogenannte fokale Adhäsionen sind sie mit der Zellunterlage (in vivo die extrazelluläre Matrix) fest verbunden (Nobes and Hall, 1995). Eine Zellmigration erfolgt stets im Zusammenspiel des Aufbaus von Adhäsionskomplexen an der Zellfront und dessen

Abbau am sich retrahierenden Zellschwanz (Nobes and Hall, 1999). Eine dritte Aktinstruktur ist ebenfalls an der vorantreibenden Kraft der Migration beteiligt: die stress fibers. Stress fibers sind gebündelte Aktin-Myosin-Komplexe, welche in die fokalen Adhäsionen münden (Small et al., 1996) und so weiteren Antrieb durch kontraktile Kraft liefern (Dunn, 1980).

Sehr gut untersucht wurden die Rho-GTPasen in Bezug auf die Zellmigration in Swiss 3T3 Fibroblasten. Rho übt hier entscheidenden Einfluss auf die Bildung der stress fibers aus (Ridley and Hall, 1992). Rac und Cdc42 haben Bedeutung bei der Bildung von Lamellipodia und Filopodia (Ridley and Hall, 1992; Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995; Ladwein and Rottner, 2008) sowie bei an diesen assoziierten kleineren Fokalkomplexen. Rho bestimmt die Ausbildung der fokalen Adhäsionen mit (Ridley and Hall, 1992).

Des Weiteren sind RhoA und Rac1 in der Lage, die Funktion von Ezrin, Moesin und Radixin zu beeinflussen. Diese Proteine verbinden über den ECM Rezeptor CD44 das Aktinozytoskelett mit der Zellmembran (Sahai et al., 2002) und tragen entscheidend zur Zellmotilität bei.

### Zellpolarität

Zellpolarität ist für viele zelluläre Funktionen von Bedeutung. Sie ist für die Funktion der Epithelzelle (apiko-basolaterale Polarität) ebenso wichtig wie für die gerichtete Migration (Chemotaxis) (Fukata et al., 2003). Die Polarität wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Unter anderem sind Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte von Bedeutung. Bei der Interaktion zwischen Zelle und Matrix spielen Integrine eine große Rolle (Yu et al., 2005). Bereits durch ihre Wirkung am Aufbau von adherens- und tight junctions sind die Rho-GTPasen an der Festlegung der Asymmetrie beteiligt. 1990 konnte von Johnson und Pringle bei Untersuchungen der knospenden Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Cdc42 ein wichtiger Regulator der Zellpolarität ist. Auch in Säugerzellen konnten Beweise für die Bedeutung der kleinen GTPasen in Bezug auf die Zellpolarität erbracht werden.

Mikrotubuli haben eine große Bedeutung für die Zellpolarität. Sie selbst haben eine intrinsische Polarität und interagieren spezifisch mit Proteinen am Zellkortex (Jaffe and Hall, 2005). Die Hemmung von Cdc42 verhindert beispielsweise die Reorientierung des microtubule organizing centre (MTOC) in T-Zellen während der Antigenpräsentation (Stowers et al., 1995). In Wundheilungsstudien hat sich gezeigt, dass Cdc42 ebenso für die gerichtete Bewegung und die Reorientierung des Golgiapparates von Fibroblasten wichtig ist (Nobes and Hall, 1999).

Ein Effektor von Cdc42 ist mPar6, das Homolog zum PAR6-Protein des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Joberty et al., 2000). PAR6 in *C. elegans* gehört zu der par

(partitioning defective) Genfamilie und wurde, in Verbindung mit einer atypischen Proteinkinase C (aPKC), in der embryonalen Entwicklung des Wurmes als essentiell für die Bildung der Polarität beschrieben.

An Astrozyten der Ratte wurden Wundheilungsstudien durchgeführt (Etienne-Manneville and Hall, 2001) und Beweise erbracht, dass auch in Säugerzellen Cdc42 mit seinem Zielkomplex mPar6/PKC $\zeta$  für eine korrekte Zellpolarität unentbehrlich ist. Die migrierenden Astrozyten konnten nur mit diesem intakten Komplex die notwendige Zellasymmetrie über das MTOC beibehalten und eine gerichtete Bewegung durchführen.

### Zellzykluskontrolle

Erste Zusammenhänge zwischen Rho-GTPasen und der Kontrolle des Zellzyklus ließen sich vermuten, als Swiss 3T3 Fibroblasten durch Hemmung der Rho-GTPase mittels Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyl transferase in der G1-Phase des Zellzyklus arretierten (Yamamoto et al., 1993; Olson et al., 1995). Rho-GTPasen sind unter anderem in der Lage, die Transkription von Cyclin D1 zu stimulieren (Vega and Ridley, 2008) und SRF (serum response transcription factor) zu aktivieren (Westwick et al., 1997). SRF ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Reihe von Genen, wie die Immediate Early Genes (IEGs) und Aktin reguliert (Arsenian et al., 1998). Cyclin D1 ist ein positiver Regulator des Zellzyklus. In aberranter Expression wird es oft in Tumoren gefunden und es wird ihm eine prognostische Bedeutung zugeschrieben (Hirama and Koeffler, 1995). Die Transkription von Cyclin D1 wird kontrolliert durch Ets, AP-1 und NF $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$  B). Rac1 und Cdc42 wurden oft mit diesen Regulatoren in Zusammenhang gebracht (Hinz et al., 1999).

### Apoptose

Rho-GTPasen können sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte haben. ROCK entfaltet bei Aktivierung Wirkungen auf das Aktinozytoskelett. Hauptsächlich handelt es sich um eine Stabilisierung der Filamente, erhöhte Interaktion mit Myosin und schließlich eine gesteigerte kontraktile Kraft. Die Zellkontraktion, ein wichtiger erster Schritt bei der Apoptose, wird vorangetrieben (Coleman and Olson, 2002). Zu Cdc42 und Rac1 existieren Daten, welche den beiden Rho-GTPasen eine antiapoptotische Wirkung über den Nuclear Factor  $\kappa$ B zuweist (Perona et al., 1997). RhoB leitet eine Apoptose nach DNA-Beschädigung ein (Liu et al., 2001). Rac spielt eine wichtige Rolle in der Fas-induzierten Apoptose (Subauste et al., 2000).



### 1.2.3 Rho GDIs

Für die Gruppe der Rab- und Rho-Proteine ist eine zusätzliche Gruppe von regulatorischen Proteinen bekannt: die Rho-GDI-Proteine. Es wurden bisher drei Rho-GDIs identifiziert: Rho-GDI $\alpha$  (auch ARHGDIA oder Rho-GDI1), Rho-GDI $\beta$  (auch ARHGDIB, Ly/D4GDI oder Rho-GDI2) und Rho-GDI $\gamma$  (auch Rho-GDI3, ARHGDIG). Das ubiquitär vorkommende Rho-GDI $\alpha$  bindet RhoA, RhoB, Rac1, Rac2 und Cdc42 (Togawa et al., 1999). Das in hämatopoetischen Zellen exprimierte Rho-GDI $\beta$  bindet hauptsächlich RhoA, Cdc42 und Rac1 und Rac2 (Scheffzek et al., 2000), jedoch nicht so stark wie Rho-GDI $\alpha$  es vermag (Scherle et al., 1993). Rho-GDI $\gamma$ , das hauptsächlich in Lunge, Gehirn und Hoden gefunden wird, bindet Cdc42 und RhoA, RhoB und RhoG (Adra et al., 1997). Es liegt als einziger Vertreter der Rho-GDIs assoziiert mit der Membran des Golgi-Apparates vor.

Den Rho-GDIs werden drei Hauptaufgaben zugeschrieben, welche alle eine Hemmung von RhoGTPasen gemeinsam haben: sie hemmen die Dissoziation des GDP an der zytosolischen, inaktiven Rho-GTPase. Sie sind in der Lage, mit der aktiven, GTP-beladenen Form der GTPase zu interagieren. Rho-GDIs verhindern in diesem Fall die Reaktion mit Effektorproteinen (Adra et al., 1997). Drittens spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Zirkulation zwischen Zytosol und Membran der Rho-GTPase. Rho-GDIs schirmen den für die Aktivität der GTPase entscheidend wichtigen C-Terminus ab. NMR-spektroskopische Bilder konnten zeigen, dass die Bindung der GDI-Proteine an die GTPasen über eine Immunglobulin-ähnliche C-terminale Domäne geschieht. In einer hydrophoben Tasche wird die Abschirmung des C-Terminus der Rho-GTPase gewährleistet (Scheffzek et al., 2000). Die GDP-Dissoziation und die GTP-Hydrolyse werden auf diesem Wege verhindert, die GTPase verharrt im inaktiven, zytosolischen Zustand. (Gosser et al., 1997; Hoffman et al., 2000; Keep et al., 1997). Nach Mikroinjektion von Rho-GDIs in Fibroblasten konnte eine signifikante Hemmung ihrer Migration gemessen werden (Miura et al., 1993).

Die Funktion der Rho-GTPasen wird also wesentlich und empfindlich von den Rho-GDIs reguliert. Dennoch zeigen sich in Experimenten mit Knock-out Mäusen kaum lebensbedrohliche Organ- oder Phänotypveränderungen. Der gezielte Knock-out von Rho-GDI $\alpha$  äußerte sich bei den Tieren in Abnormalitäten der Nieren und Fortpflanzungsorganen, welche jedoch teilweise sekundär zum Tod führen konnten (Togawa et al., 1999). Das Ausschalten von Rho-GDI $\beta$  beeinflusste ebenfalls nicht die Lebensfähigkeit der Tiere. Es konnten lediglich Mängel in der Lymphozytenentwicklung verzeichnet werden, welche keine bedrohlichen Konsequenzen hatten (Dovas and Couchman, 2005).

Es wird eine weitere Rho-regulierende Proteinfamilie vermutet, welche bei den Rab-GTPasen bereits bekannt ist: die GDFs (GDI displacement factors) (Alory and Balch, 2001). Sie sind in der Lage, den Komplex gezielt zu dissoziieren (Seabra and Wasmeier, 2004). Einige Studien weisen darauf hin, dass Proteine der ERM Familie Funktionen im Sinne der GDFs haben könnten (Takahashi et al., 1997). Die Phosphorylierung von Rho-GDIs durch Kinasen scheint eine regulatorische Bedeutung für diese Proteine zu haben (Burmeyster and Vignais, 1997). DerMardirossian beschrieb die Bindung und Phosphorylierung von Rho-GDIs durch die p21-activated Kinase, einem Effektor von Cdc42 und Rac. Hier scheint ein positive Rückkopplung zu bestehen, die beispielsweise bei der Zellmotilität eine Bedeutung haben könnte (DerMardirossian and Bokoch, 2005).

#### 1.2.4 Rho GTPasen und Rho GDIs in der Tumorentstehung

In den achtziger Jahren wurde Ras als Protoonkogen beschrieben (Barbacid, 1987), nachdem sich gezeigt hatte, dass das in Retroviren enthaltene Ras in Ratten einen Tumor vom Sarkomtyp auslösen konnte. Mutiertes hyperaktives Ras ist in etwa 30% aller menschlichen Tumoren zu finden (Bos, 1988). Die kleinen Rho-GTPasen repräsentieren eine Subfamilie der Ras-Superfamilie. Sie sind sich im Aufbau in bis zu 35% homolog. Das Interesse an der Rolle der kleinen Rho-GTPasen in der Tumorgenese wuchs, nachdem Ras als Protoonkogen etabliert war. Obwohl, im Gegensatz zu Ras, nie eine genetische Mutation dieser Proteine in Tumoren nachgewiesen werden konnte, gilt die Rolle dieser kleinen GTPasen in der Kanzerogenese als sicher (Gildea et al., 2003; Aznar et al., 2004; Vega and Ridley, 2008). Bei Störung ihres regulativen Gleichgewichtes sind sie an nahezu jeder Stufe der Kanzerogenese beteiligt. Über die Regulation von Morphologie, Motilität und Adhäsion (Jaffe and Hall, 2002) haben sie Einfluss auf pathologische Prozesse wie die Invasion und die Metastasierung (Ridley, 2000). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass die Funktion der Rho-GTPasen für eine Transformation von Ras notwendig ist (Qui et al., 1995; Ingram et al., 2001). In anderen Studien konnte in Tumoren verschiedener Ursprungsgewebe eine Überexpression von Rho-GTPasen nachgewiesen werden. Eine Transfektion von RhoC verursachte in Brustdrüsenepithelzellen das Wachstum von invasiven Brustkrebszellen (van Golen et al., 1999). In Keimzelltumoren des Hodens waren RhoA und ROCK überexprimiert (Kamai et al., 2002) und in Pankreaskarzinomen korrelierte überexprimiertes RhoC mit Metastasierung und Progression (Suwa et al., 1998). Für Rho-GTPasen konnten auch regulative Funktionen bei der Transkription in Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Rho-GDIs haben hier Einfluss auf die Transkription von Estrogen- Progesteron- und Glukokortikoidrezeptoren, und hemmen die Aktivität von

RhoA (Su et al., 2001).

Ein Karzinom kann ab einer Größe von 0,5 mm nicht mehr über Diffusion mit Sauerstoff versorgt werden und braucht eine eigene Blutversorgung (Brooks et al., 1994). Rho-GTPasen konnten mit dieser Neoangiogenese in Verbindung gebracht werden. Die Ausschüttung von angiogenen Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), Interleukin-6 und Interleukin-8 konnte von RhoC in Brustkrebszellen im Sinne einer vermehrten Produktion beeinflusst werden (van Golen et al., 2000). Fehlregulation und Überexpression von Rho-GTPasen gehen auch mit metastatischem Potential von Tumoren einher (Gildea et al., 2003). Trotz großer Fortschritte in der Onkologie ist nach wie vor die Metastasierung einer Tumorerkrankung prognostisch sehr ungünstig. Das metastasierte Mammakarzinom galt bislang als inkurable Erkrankung. Es gibt mittlerweile Hinweise darauf, dass die Prognose in der metastasierten Situation verbessert werden kann (Giordano et al., 2004). Fest steht, dass Patienten mit Metastasen nach wie vor eine schlechte Prognose haben. Die Rho-GTPasen und ihre Regulator- und Effektorproteine sind in Prozesse der Fernmetastasierung involviert (del Peso et al., 1997; van Golen et al., 2000; Jaffe and Hall, 2002). Fernmetastierung ist nur möglich, wenn Tumorzellen in das Blut- oder Lymphgefäßsystem gelangen können. RhoA und Rac1 haben Einfluss auf den Abbau der ECM durch die Regulation von Matrix Metalloproteasen (MMP) (Zhuge and Xu, 2001). RhoA und ROCK werden benötigt, damit die Tumorzelle das Gefäßendothel durchqueren kann (Worthylake et al., 2001; Adamson et al., 1999). Bei Fehlregulation oder Überexpression der Rho-GTPasen können sich praktisch alle ihre physiologisch wichtigen Funktionen negativ auf die Tumorprogression auswirken (Abb.2).

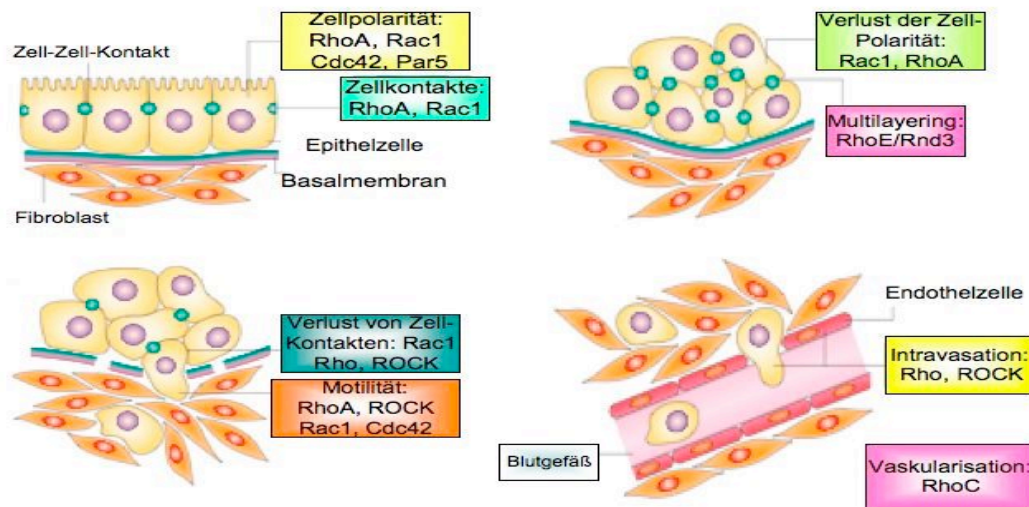


Abb. 2: Zusammenfassung der Auswirkung von Rho-GTPasen und ihrer Effektoren auf die Tumorentstehung (modifiziert nach Sahai and Marshal, 2002).

Wie in der Physiologie sind auch in der Pathophysiologie die Effekte der Rho-GTPasen oft konträr. Für RhoB konnte zum Beispiel eine tumorsupprimierende Wirkung gefunden werden (Chen et al., 2000).

Durch ihre aktivierende Funktion stellen Rho-GEFs ein empfindliches Glied bei Fehlregulationen des Rho-GTPase-Kreislaufes dar (Overbeck et al., 1995; Hart et al., 1991). Das Dbl-Protoonkogen wurde als Erstes mit dem Rho-GEF-Protein und menschlichen Tumoren in Zusammenhang gebracht. Es wurde bei Versuchen mit menschlichen B-Zell-Lymphomen isoliert, wobei die Homologie zu Cdc24, einem GEF von Cdc42 in der Hefe, auffällig war (Ron et al., 1991). Normalerweise sind Rho-GEFs autoinhibiert, so dass keine abnorme Aktivierung von ihnen ausgehen kann (Bi et al., 2001). Am Beispiel des Vav-Protoonkogens konnte die Ausschaltung der Autoinhibitionsdomäne durch Mutation nachgewiesen werden (Aghazadeh et al., 2000). Rho-GEFs interagieren mit GTPasen, Aktin-assoziierten Proteinen und zahlreichen Kinasen und werden via Rezeptortyrosinkinasen (wie z.B. EGFR) aktiviert (Overbeck et al., 1995; Pandey et al., 2000; Tamas et al., 2001). Im inflammatorischen Mammakarzinom (IBC) ist EGFR häufig überexprimiert, wodurch die abnorme Aktivierung von RhoC durch Vav-1 im IBC mit erklärt werden kann (Kleer et al., 2000; Lin and van Golen, 2004). Im malignen Melanom konnten erhöhte Level von RhoC nachgewiesen werden (Clark et al., 2000).

Es liegen zahlreiche Daten vor, welche beweisen, dass Rho-GDIs in die Kanzerogenese

involviert sind. Einerseits existieren mehrere Hinweise darauf, dass Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  als Tumorsuppressoren agieren. Jiang et al. konnten zeigen, dass niedrige Proteinlevel von Rho-GDI $\alpha$  mit einem invasiveren Verhalten von Mammakarzinomzellen einhergehen. Gildea et al. bewiesen, dass Rho-GDI $\beta$  die Metastasierung in Harnblasenkarzinomen hemmt und sehen in Rho-GDI $\beta$  einen entscheidenden, supprimierenden Faktor in der Tumorentstehung (Gildea et al., 2002). Titus und Mitarbeiter schlagen einen Mechanismus vor, wie Rho-GDI $\beta$  in Harnblasenkarzinomen als Tumorsuppressor funktionieren könnte: Mittels Microarray-Analysen konnten sie zeigen, dass Rho-GDI $\beta$  Endothelin-1 herunterreguliert. Endothelin-1 reguliert durch parakrine Effekte die Angiogenese in der Lunge (Simler et al., 2004) und durch autokrine Effekte die Neovaskularisation in Karzinomen, die eine hohe Metastasierungsbereitschaft in die Lunge zeigen (Nelson et al., 2003). Der Antagonismus von Endothelin-1 war mit einer starken Reduktion von Lungenmetastasen beim Harnblasenkarzinom verbunden (Titus et al., 2005).

Rho-GDIs haben nicht ausschließlich tumorsupprimierende Eigenschaften: Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  werden beide von der Proteinkinase Src reguliert (DerMardirossian et al., 2006), welcher eine entscheidende Bedeutung in der Progression des Mammakarzinoms zugeschrieben wird (Jallal et al., 2007). In einigen Tumorgeweben wird Rho-GDI $\beta$  eine Rolle als Promotor des Invasionsverhalten zugeschrieben (Zhang and Zhang, 2006). In Ovarialkarzinomen ist die Expression von Rho-GDI $\beta$  hochreguliert (Tapper et al., 2000). Auch im Brustkrebs konnte eine stärkere Expression von Rho-GDI $\beta$  in invasiveren Zelllinien nachgewiesen werden (Zhang and Zhang, 2006). In einer weiteren Arbeit von Zhang et al. wird Rho-GDI $\alpha$  mit Chemoresistenzen im Mammakarzinom und in Lymphomen in Verbindung gebracht. Eine Überexpression von Rho-GDI $\alpha$  war mit einer erhöhten Resistenz der Zelllinien gegenüber der Chemotherapeutika Etoposid und Doxorubicin vergesellschaftet. Durch das Ausschalten von Rho-GDI $\alpha$  mittels si-RNA konnte die Apoptose der Zellen als Reaktion auf Etoposid und Doxorubicin wiederhergestellt werden (Zhang et al., 2005). Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom korreliert Rho-GDI $\alpha$  mit einem schlechten Differenzierungsgrad und einer ungünstigen Prognose (Blackhall et al., 2004). In Ovarialkarzinomen ist Rho-GDI $\alpha$  in stark invasiven Karzinomen überexprimiert (Jones et al., 2002).

Die scheinbar paradoxen Eigenschaften von Rho-GDI $\beta$  und Rho-GDI $\alpha$  sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass Rho-GDI $\beta$  von Faktoren kontrolliert wird, von welchen die karzinogene Wirkung bekannt ist und dass Rho-GDI $\beta$  selbst regulative Funktionen auf einige Proteine hat. Ets1, ein Transkriptionsfaktor, und der Ets1-Regulator

Proteinkinase C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) erhöhen in Brustkrebszellen die Expression von Rho-GDI $\beta$  (Vetter et al., 2005; Schunke et al., 2007). Hohe Level von Ets1 gehen mit einem stark invasiven Verhalten von Tumorzellen und einer ungünstigen Prognose einher (Dittmer et al., 2003). Schunke et al. konnten zeigen, dass ein Einfluss von Rho-GDI $\beta$  auf die Cyclooxygenase 2 (Cox-2), einem Tumorpromotor (Mueller-Decker et al., 1999), über die Aktivierung des NFAT-1 besteht.

Wie in T-Zellen (Groysman et al., 2002) ist auch hier ein Synergismus von Rho-GDI $\beta$  mit dem GEF Vav-1 von Bedeutung, der zur Aktivierung von NFAT-1 führt. Durch Aktivierung von Cox-2 könnte Rho-GDI $\beta$  zur Progression des Brustkrebses beitragen (Schunke et al., 2007).

#### 1.2.5 Bedeutung der Rho-GTPasen und ihrer Regulatorproteine in der Praxis

Rho GTPasen und Rho-GDIs sind wichtige Regulationsproteine für physiologische Prozesse wie z.B. in der Embryogenese und der Wundheilung. Ihre Mitbeteiligung an malignen Prozessen ist unumstritten.

Die Inhibition von Rho-GTPasen wurde zunächst unbeabsichtigt mit HMG Co-A-Reduktase-Hemmern erreicht. Die Synthese der Cholesterinvorläufer Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat wird gehemmt und die posttranslationale Modifikation der GTPasen wird verhindert (Aznar et al., 2003). Erste Ideen für Therapiekonzepte in diesem Zusammenhang beruhen auf der Hemmung der Geranylgeranyltransferase und der Farnesyltransferase (Aznar et al., 2003; Lebowitz et al., 1995). Diese Enzyme sind wichtig für die Aktivität der Rho- und Ras-GTPasen. Ohne posttranslationale Farnesylierung und/oder Geranylgeranylierung können die GTPasen nicht membranständig werden und sistieren im zytosolischen, inaktiven Zustand. Einige klinische Studien mit Farnesyltransferaseinhibitoren laufen bereits. Beim Prostatakarzinom konnte unter der Kombination von dem Farnesyltransferaseinhibitor Zarnestra mit dem Bisphosphonat Zometa eine verminderte Zellproliferation festgestellt werden (Caraglia et al., 2007). Eine andere Studie beschäftigte sich mit der Kombination von Paclitaxel und Zarnestra und konnte ein gehemmtes Tumorstadium im multiplen Myelom zeigen (Zhu et al., 2005).

Es ist festzustellen, dass ein Ungleichgewicht im Rho-GTPasen-Zyklus (Abb. 1) mit der Entartung eines gesunden Zellverbandes im Zusammenhang steht (Jiang et al., 2005). Es scheint abhängig vom Ursprungsgewebe, von verschiedenen Regulationsmechanismen und

von dem „Microenvironment“ des Tumors zu sein, welcher Faktor entartungsfördernde- oder entartungshemmende Eigenschaften gewinnt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ziel verfolgt, die Bedeutung der beiden Rho-GDI-Proteine, Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$ , für die Progression von Brustkrebs näher zu untersuchen. Dies ist nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern könnte auch zur Entwicklung neuer Biomarker für das Mammakarzinom beitragen.

## **2 Fragestellung**

Neben der Rolle von Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  als negative Regulatoren der Rho-GTPasen werden diesen Proteinen auch weitere Funktionen zugeschrieben. Diese könnten für die Karzinogenese von Bedeutung sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression dieser beiden Rho-GDIs im primären invasiven Mammakarzinom auf der Proteinebene untersucht und deren Einfluss in Bezug auf den Krankheitsverlauf der Patientinnen analysiert.

Die Stärke der Proteinexpression wurde auf verschiedene klinisch-pathologische Parameter, darunter etablierte Prognosefaktoren, adjustiert und analysiert. Die Zielstellung beinhaltete, die prognostische Relevanz der beiden Rho-GDIs im Mammakarzinom zu untersuchen und einen Beitrag zur Erforschung der Bedeutung von Rho-GDIs in der Kanzerogenese zu leisten.



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Patientenkollektiv**

Das der immunhistochemischen Analyse zur Verfügung stehende Material stammt von Patientinnen der Universitäts-Frauenklinik Halle/Saale. Hierbei handelt es sich durchgehend um Tumoren mit der Diagnose „invasives Mammakarzinom“ und gegebenenfalls um befallene axilläre Lymphknoten. Alle Fälle hatten zum Zeitpunkt der Primärdiagnose keine Fernmetastasen oder bilaterale Karzinome. Alle Karzinome wurden im Jahre 1999 primär-diagnostiziert und an der Frauenklinik Halle/Saale operiert. Die Patientinnen wurden im Universitätsklinikum Halle nachuntersucht und erschienen überwiegend zu regelmäßigen Kontrolluntersuchungen, so dass der Krankheitsverlauf gut nachvollzogen werden konnte. Das Kollektiv umfasst 153 Paraffinblöckchen. Aus vorgeschriebenen Archivierungszwecken von Resttumorgewebe konnten einige Präparate nicht mehr für die Untersuchungen verwendet werden. Der endgültigen Auswertung standen 117 Tumorpräparate für Rho-GDI $\beta$  und 112 für Rho-GDI $\alpha$  zur Verfügung. Aus demselben Kollektiv waren einzelne komplett tumorfreie Präparate verfügbar. Es konnten also auch Antikörperfärbungen in einigen Fällen an tumorbefallenem- und tumorfreiem Gewebe von derselben Patientin miteinander verglichen werden.

Ein weiteres Kollektiv stammt aus der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf und umfasst 87 mit Triton X behandelte primäre Mammakarzinome. Mittels Westernblot wurde in diesen Proben die Expression von Rho-GDI $\beta$  beurteilt.

#### **3.2 Material**

##### **3.2.1 Chemikalien, Antikörper, Zelllinien und Enzyme**

Primärantikörper ARHGDI $\beta$ :	BD Biosciences, Polyclonal Rabbit Anti-Human D4 GDI, Cat. No.: 556498
Primärantikörper RhoGDI alpha:	BD Biosciences, Mouse IgG2a, Cat. No.: 610255
Antikörper ERK 1/2:	Cell Signaling, p 44/42 Kinase Antibody, #9102
Antikörper GAPDH:	Ambion, Anti-GAPDH, #4300
Sekundärantikörper (Westernblot):	Cell Signaling Technology, HRP-linked IgG, 1:2000
Acrylamid:	Applichem, Darmstadt
Antibody diluent solution:	Dako, Dänemark
Borsäure:	Roth GmbH und Co KG, >99,8% pa, Karlsruhe

Citratpuffer 10x:	DakoCytomation, Chem Mate™, Dänemark
Coomassie Blue:	AppliChem, C. Brillantblau, Darmstadt
Eisessig:	Merck, Darmstadt
EDTA:	Appllichem, Darmstadt
Ethanol:	BIOMEL GmbH Dessau, 96 Vol-%, MEK vergällt
Ethanol:	BIOMEL GmbH Dessau 70 Vol-%
Ethanol:	Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, >99,8 Vol-% pa
Fetal Bovine Serum:	PAN Biotech GmbH, South America
Glycin:	Appllichem, Darmstadt
Glycerin:	Roth GmbH und Co KG, >86% p.a., Karlsruhe
Hämalaun:	Roth GmbH und Co KG, sauer nach Mayer, Karlsruhe
Magermilchpulver:	Appllichem, Darmstadt
Methanol:	Roth GmbH und Co KG, >99,9% p.a., Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker:	Dual Color, Bio Rad, USA
Mowiol:	Deffner & Johann GmbH, Polyvinylalkohol Mowiol® 4-98, Röthlein
PBS 10x:	PromoCell, Dilbecco's PBS, Heidelberg
Protein Assay:	Dye Reagent Concentrate, Bio Rad, USA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Universitätsapotheke Halle, 30% phosphatstabilisiert
Salzsäure:	Roth GmbH und Co KG, >32% p.a., Karlsruhe
SDS:	Appllichem, Darmstadt
Tris:	Appllichem, Darmstadt
Tween 20:	Appllichem, Darmstadt
Xylol:	Roth GmbH und Co KG, >98% Rein, für die Histologie, Karlsruhe
Zellkulturmedium:	RPMI 1640+GlutaMAX, Gibco, Invitrogen
Zelllinien:	MCF-7, ATCC, USA MDA-MB-231, ATCC, USA

### 3.2.2 Kits

AEC Chromogen Kit:	Zymed Laboratories Inc., USA
Detection System:	Amersham ECL Western Blot Detection System, GE Healthcare

ZytochemPlus HRP Kit: Zytomed, Biotinylated secondary antibody Blocking Solution, Streptavidin HRP-Conjugate, Berlin

### 3.2.3 Geräte:

Elektrophoresekammer:	Mini-PROTEAN, Bio Rad, USA
Feinschnittmikrotom:	Leica, Wetzlar
Inkubationsbad:	GFL®, Burgwedel
Mikrowelle:	Bosch
Mikroskop:	Zeiss, Jena
Pipetten:	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe:	pipetus-akku, Pipettboy®, Hirschmann, Eberstadt
Photometer:	PharmaciaBiotech,Ultrospec1000, Cambridge
Refrigerated Incubator Shaker:	New Brunswick Scientific, Innova 4230, Nürtingen
Sicherheitswerkbank:	Hera safe, Kendro Laboratory Products
Transferkammer:	Bio Rad, USA
Thermometer:	Labptherm-N., England
Waage:	Scaltec SPB62, Göttingen
Water Purificator:	Millipore, Milli-Q-plus, Eschborn

### 3.2.4 Verbrauchsmaterialien

Cover Plates und Sequenzerkassette:	Thermo Shandon, Frankfurt
Deckgläser:	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Eppendorf Safe Lock Tubes 2,0 ml:	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 ml:	Eppendorf AG, Hamburg
Färbegläsküvetten mit Deckel:	Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Handschuhe:	Kimberly-Clark Safe Skin Satin plus, USA
Hyperfilm:	GE Healthcare Amersham Hyperfilm™ ECL, UK
Kurzzeitmesser:	Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Objektträger:	Super Frost® Plus, Menzel Gläser®, Braunschweig
Serologische Pipetten:	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Stripetten:	Costar, USA

Transfermembran:	Immobilon-P, Millipore, Frankreich
Pipettenspitzen:	Eppendorf, Hamburg
Spritzflaschen:	Roth und Co KG, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen:	TTP, Schweiz
Zellkulturflaschen:	TPP, Schweiz

### 3.2.5 Lösungen

Elektrodenpuffer:	144g Glycin, 30g Tris-Base
Entfärber:	EtOH (96%), Eisessig, H <sub>2</sub> O
Laufpuffer:	10x Elektrodenpuffer ohne SDS, H <sub>2</sub> O, 10ml SDS 10%
Proteinsamplepuffer:	1,25ml 1M TrisHCl pH 7, 4ml SDS 10%, 2,3 ml Bromphenolblau 0,1%, 1,75 ml H <sub>2</sub> O tridest., 2 ml Glycerin, 0,5 ml β-Mercaptoethanol
Sammelgel-Stackingpuffer:	Tris in 90ml H <sub>2</sub> O mit HCl (pH 8,8), 4ml SDS 10%, 200ml H <sub>2</sub> O
Stacking Gel:	2ml H <sub>2</sub> O, Stacking, 0,5 ml Acrylamid, 5µl TEMED, 25µl APS
Transferpuffer:	80ml Elektrodenpuffer ohne SDS, 800ml H <sub>2</sub> O, 200ml Methanol
Trenngelpuffer:	16,95g TrisHCl, 2ml SDS 10%, 200ml H <sub>2</sub> O tridest.
Waschpuffer:	5,8g NaCl, 10ml 1M TrisHCl, 2ml EDTA, 1000ml H <sub>2</sub> O, 0,5ml Tween 20

## **3.3 Methoden**

### 3.3.1 Immunhistochemie

Das in Paraffin eingebettete, konservierte Tumorgewebe wurde nach kurzer Kühlung von einer der medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes für Pathologie Halle (Frau J. Beer) oder des gynäkologischen Forschungslabors Halle (Frau A. Dittmer) am Feinschnittmikrotom geschnitten. Die Schnittdicke betrug die für immunhistochemische Verfahren üblichen zwei bis vier Mikrometer. Diese Schnittpräparate wurden nach Glättung im heißen Wasserbad auf Objektträger gezogen und anschließend bei 75°C getrocknet. Die Färbungen erfolgten stets nach der indirekten Streptavidin-Biotin-Methode. Die grundsätzliche Reihenfolge der Reagenzien war stets: 1.) Unkonjugierter Primärantikörper,

2.) Biotinylierter Sekundärantikörper, 3.) (Strept)-Avidin-Biotin-Enzymkomplex (Noll, 2000). Zur Kontrolle der Antikörperreaktion wurden Positivkontrollen an Tonsillengewebe und Hautschnitten durchgeführt. Die Spezifität der verwendeten Antikörper konnte mittels Westernblotanalysen verifiziert werden (Abb. 6, Abb. 10)

Erster Schritt der immunhistochemischen Färbung war stets die Entparaffinierung des Tumormaterials auf dem Objektträger mittels mehrfachen Eintauchens in eine Alkoholreihe absteigender Konzentration. Die einzelnen Schritte hierbei waren: zweimal 10 Minuten in Xylol, zweimal 5 Minuten in Alkohol absolut puriss., zweimal in vergälltem 96%igem Alkohol und zweimal in vergälltem 70%igem Alkohol. Zur Hemmung der gewebeeigenen Peroxidasen wurde an die Entparaffinierung ein 15-minütiger Wasserstoffperoxid-Block angeschlossen. Vor der folgenden Behandlung wurde diese Reaktion mit Aqua dest. abgestoppt. Die Behandlung mit Formalin kann das Färbeergebnis der Immunhistochemie erheblich beeinflussen. Einige Epitope zeigen so gravierende Änderungen in ihrer Tertiärstruktur, dass die Immunreaktivität komplett verloren gehen kann. Um die Reaktivität wiederherzustellen, wurde das Prinzip der Antigendemaskierung entwickelt, wobei durch Hitzeeinwirkung ein zufrieden stellendes Ergebnis erreicht wurde. Cattoretti et al. etablierten Citratpuffer als sogenannte Retrieval Solution (Cattoretti et al., 1994). Für die Antigendemaskierung hatte sich ein 45-minütiges Einwirken in 70°C heißen Citratpuffer (pH 6) im bei 96°C temperierten Wasserbad bewährt.

Für die weitere Verarbeitung kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur, noch im Citratpuffer stehend, stets 20 min ab. Die Objektträger wurden daraufhin vorsichtig mit Aqua tridest. abgespült, mit einem Tropfen von diesem luftblasenfrei fest auf die Coverplates aufgelegt und in die vorgesehene Halterung eingespannt. Hierbei galt es, die anliegenden Tumorschnitte stets feucht zu halten, damit das Gewebe nicht austrocknen konnte. Zwischen den einzelnen Behandlungsschritten wurde daher, unter Berücksichtigung der empfohlenen Inkubationszeiten, mehrmals mit PBS-Puffer gespült. Die einzelnen Behandlungsschritte waren je eingespannten Objektträger wie folgt:

Eine Minute 1ml PBS (phosphate buffered saline), fünf Minuten drei Tropfen Super-Block Lösung, 45-minütiges Inkubieren des Rho-GDI $\beta$  Primärantikörpers bei 37°C, bzw. Übernachtinkubation des Rho-GDI $\alpha$  Antikörpers bei 4°C (jeweils 100 $\mu$ l, jeweils bei einer Verdünnung von 1:500), fünf Minuten 1ml PBS, zehn Minuten drei Tropfen biotinylierter Sekundärantikörper-Substrat, fünf Minuten 1ml PBS und zehn Minuten drei Tropfen Streptanidin-Peroxidase-Lösung. Für die folgende Chromogenreaktion wurden die

Objektträger aus den Coverplates ausgespannt und auf eine ebene Fläche gelegt. Das AEC-Chromogengemisch wurde direkt auf den Tumorschnitt gegeben. Eine Inkubationszeit von 15 Minuten musste eingehalten werden, bis die Enzym-Substrat-Reaktion in einem rosenroten Farbumschlag zu erkennen war. Nach kurzer und vorsichtiger Aqua dest. Spülung schloss sich die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin an. Nach 5-10-minütigem Stehen der Objektträger in der Hämatoxylinlösung folgte immer ein 10-minütiges sogenanntes Bläuen in Leitungswasser. Durch diese Methode weisen die Zellkerne unter mikroskopischer Betrachtung einen satten Blauton auf. Die fertig gefärbten Schnitte wurden jeweils mit einem im Labor selbst angesetzten Eindeckmedium auf Wasserbasis (Mowiol, pH 8) und einem Deckgläschen versehen und zum Trocknen auf eine ebene Fläche ausgelegt.

Die mikroskopische Bewertung der Färbeergebnisse erfolgte mit Hilfe des Pathologen Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen nach dem im klinischen Alltag gebräuchlichen Bewertungssystem, dem Immunreaktiven Score (IRS) (Remmele et al., 1987). Der IRS setzt sich zusammen aus der SI (staining intensity= Färbeintensität) und dem prozentualen Anteil (pp= percentage points) der farblich dargestellten Antigen-Antikörper-Reaktion im Schnittpräparat. Die Färbeintensität (SI) wird auf einer Punkteskala von 0-3 bewertet (0: keine Reaktion; 1: schwache Reaktion; 2: mäßige Reaktion; 3: starke Reaktion). Der prozentuale Anteil (pp) erhält einen Wert zwischen 0 und 4 (0: keine positive Reaktion; 1: weniger als 10% der Zellen sind positiv; 2: 10%-50% der Zellen sind positiv; 3: 51%-80% der Zellen sind positiv; 4: mehr als 80% der Zellen sind positiv). Das Produkt der beiden Faktoren ergibt nun den immunreaktiven Score, welcher zwischen 0 und 12 liegen kann (Thomas, 2005).

### 3.3.2 Westernblotanalyse

Die Westernblotanalyse ist eine geeignete Methode, um Proteine semiquantitativ in Proteingemischen mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen.

Die Proteine werden zuerst denaturiert, mittels SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) im elektrischen Feld aufgetrennt. Der Blot der Proteine erfolgt auf eine Membran, auf welcher der spezifische Antikörper mit dem gesuchten Protein reagiert (Dittmer and Dittmer, 2006). In dieser Arbeit wurden 87 primäre Mammakarzinome bezüglich ihrer Expression von Rho-GDI $\beta$  mittels Westernblot untersucht. Um aus den Tumorproben aus dem Uniklinikum Hamburg/Eppendorf Protein zu extrahieren, wurden sie im Mikro-Dismembrator zerkleinert und danach in 200 $\mu$ l TBS mit 1% Triton-X über Nacht bei 4°C rehydriert. Nach einstündiger Zentrifugation wurde der Überstand zur weiteren Analyse

verwendet, die Proteinmenge wurde mittels BCA-Reaktion (bicinchoninic acid) nach Pierce photometrisch bestimmt. In einem 10%-igen Polyacrylamidgel wurden die aufgearbeiteten Proben mit einem Probenauftragspuffer (Bromphenolblau und Glycerin) in die Geltaschen pipettiert. Als Ladekontrollen wurden GAPDH und ERK1/2 verwendet. Bei 150 V wanderten die Proben, bis die blaue Bromphenolfront am unteren Ende des Gels angekommen war. Das Gel kam danach in die sogenannte Blotting-Kammer. Das Gel lag hier auf einer absorbierfähigen Membran. Im elektrischen Feld erfolgte der Blot für eine Stunde bei 120 V. Ein sich anschließender Proteinblock mit 2%-igem Milchpulver für zehn Minuten sollte unspezifische Wechselwirkungen im Verlauf verhindern. Der Blot auf der Membran wurde eine Stunde mit dem 1:5000 verdünnten polyklonalen Kaninchen-anti-D4-GDI (Rho-GDI $\beta$ ) Primärantikörper eine Stunde inkubiert, dreimal in Waschpuffer gewaschen und dann mit einem anti-Maus-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper inkubiert. Eine Zugabe von Meerrettich-Peroxidase (HRP) erbrachte eine sichtbare Reaktion. Um dauerhafte Ergebnisse festzuhalten, wurde in einer Dunkelkammer an den Reaktionsstellen auf der Membran mit ECL-Substrat eine Lumineszenz erzeugt. An lumineszierenden Stellen wurde ein Röntgenfilm geschwärzt.

### 3.3.3 Zellkultur

MDA-MB-231 und MCF-7-Brustkrebszelllinien wurden in RPMI-Medium (Invitrogen) mit 10%-igem Kälberserum ohne Zugabe von Antibiotika kultiviert. Für Westernblotanalysen wurden zytosolische Extrakte aus diesen Zellen hergestellt.

### 3.3.4 Statistik

Korrelationen zwischen der jeweiligen Expression von Rho-GDI $\alpha$  und - $\beta$  auf Proteinebene und klinisch-pathologischen Parametern wurden mit dem Chi<sup>2</sup> - Test beurteilt. Die Zeit, bis ein Ereignis nach Primärdiagnose eintrat, wurde als Time to progression (TTP) definiert, die Zeit von der Operation bis zum Auftreten eines Ereignisses als Time after primary surgery. Ein Ereignis ist hier als Rezidiv, Metastasierung oder Tod definiert worden. Das krankheitsfreie Überleben wurde auf jeweils die beiden Rho-GDIs adjustiert und in der univariaten Analyse mittels Kaplan-Meier-Methode ausgewertet. Eine multivariate Analyse erfolgte bei signifikanten und knapp nicht signifikanten Korrelationen mit dem Cox proportional hazard regression model. Als signifikant galten p-Werte < 0,05. Für die statistische Analyse wurde das Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) der Versionen 12, 15 und 17 verwendet.

---

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Charakteristik des Kollektivs**

#### **4.1.1 Gesamtkollektiv**

Das Kollektiv, welches für die immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung stand, umfasste 117 verwertbare Tumorproben für Rho-GDI $\beta$  und 112 Tumorproben für Rho-GDI $\alpha$ . Die invasiven Mammakarzinome wurden alle im Jahre 1999 primärdiagnostiziert und an der Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg operativ entfernt. Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 56 Jahre, wobei die jüngste Patientin 24, die älteste 86 Jahre alt war. Einschlusskriterium in das Kollektiv war ein primär metastasenfreies Stadium der Erkrankung, alle Patientinnen waren bei Diagnose M0. Die mittlere krankheitsfreie Nachbeobachtungszeit betrug 51 Monate. Ab Diagnosedatum wurde für die vorliegende Arbeit ein Follow-up bis 2006 protokolliert. Während dieser Zeit erlitten 5 Patientinnen ein Lokalrezidiv, 16 Patientinnen entwickelten Metastasen und 3 Patientinnen wiesen sowohl Metastasen als auch ein Lokalrezidiv auf. 14 Patientinnen starben.

In der Tabelle 2 soll die Verteilung einiger wichtiger Charakteristika des Kollektivs zusammengefasst werden. Diese Faktoren wurden in die univariate und teilweise in die multivariate Analyse mit eingeschlossen. Mit 81,2 % beim duktalem Karzinom und 11,1% der seltener auftretenden Formen ist die Verteilung der histologischen Subtypen im Kollektiv mit den allgemeinen Häufigkeiten vergleichbar. Das lobuläre Karzinom ist mit 4,3% im Kollektiv geringer vertreten; normalerweise macht es 10-15% aller Mammakarzinome aus (Kreienberg et al., 2002). Die Verteilung des Gratings im Kollektiv ist ebenfalls anders als in Feldstudien beschrieben. Nach Daten des Tumorzentrums München 2005 liegt ein G1-Status in 8,5%, ein G2-Status in 55,4% und ein G3-Status in 36,1% der Fälle vor (Sauer, 2005). Eine gute Differenzierung lag mit 2,6% in den hier untersuchten Tumoren also wesentlich seltener vor. Abweichungen von den Daten des Krebsregisters zeigen sich auch im Merkmal „ER-Status“. In den Untersuchungen der Feldstudie sind 72,1% der Patientinnen ER-positiv und 27,9% ER-negativ. In dem von mir benutzten Kollektiv hingegen waren 60,7% ER-positiv und 37,6% ER-negativ. Eine Mehrzahl der Patientinnen hatte eine systemische Chemotherapie erhalten: 5,2% wurden mit neoadjuvanter und 67,5% mit adjuvanter Chemotherapie behandelt. Alle HR-negativen Patientinnen erhielten eine Chemotherapie. Das CMF-Schema war am häufigsten die Chemotherapie der Wahl (50,4%), in einigen Fällen wurde mit Anthrazyklinen (13,6%) und in wenigen mit Taxanen (1,6%) behandelt (Tabelle 2).



Tabelle 2: Übersicht der Verteilung prognostischer Faktoren und der Wahl der Therapien im Gesamtkollektiv.

<b>Merkmal</b>	<b>Fallzahl</b>	<b>% des Kollektivs</b>
<b>Kollektiv gesamt</b>	117	100,0
<b>Alter</b>		
<50	24	20,4
>50	81	72,9
<b>Nodalstatus</b>		
Negativ	72	61,5
Positiv	45	38,5
<b>Histologie</b>		
Duktal	95	81,2
Lobulär	5	4,3
Andere	13	11,1
<b>Tumorgröße</b>		
T1	56	47,9
T2	50	42,7
T3/T4	11	9,4
<b>ER-Status</b>		
Negativ	44	37,6
Positiv	71	60,7
<b>Grading</b>		
G1	3	2,6
G2	65	55,6
G3	48	41,0
<b>Systemische Chemotherapie</b>		
CMF-Schema	63	50,4
Anthrazykline	17	13,6
Taxane	2	1,6
Chemo und endokrine Therapie	46	36,8
<b>Endokrine adjuvante Therapie</b>	36	28,8

#### 4.1.2 CMF-Subkollektiv

Die Patientinnen mit einer CMF-Therapie imponieren im hier verwendeten Kollektiv als eine zahlenmäßig stark vertretene Subgruppe. Tabelle 3 fasst wichtige Merkmale des Subkollektivs von Patientinnen, die eine CMF-Therapie erhalten haben, zusammen. Die Häufigkeiten einiger klinisch-pathologischer Parameter sind in diesem CMF-Subkollektiv mit denen des Gesamtkollektivs vergleichbar.

Tabelle 3: Übersicht der Verteilung der Häufigkeiten von klinisch-prognostischen Faktoren im Kollektiv der nach dem CMF-Schema therapierten Patientinnen.

<b>Merkmal</b>	<b>Fallzahl</b>	<b>% des Kollektivs</b>
<b>Kollektiv gesamt</b>	64	
<b>Alter</b>		
<50	12	18,8
>50	37	57,8
<b>Nodalstatus</b>		
Negativ	33	51,6
Positiv	16	25,0
<b>Tumorgröße</b>		
T1	22	34,4
T2/T3	27	42,2
<b>ER-Status</b>		
Negativ	28	43,8
Positiv	21	32,8
<b>Grading</b>		
G1/G2	22	34,4
G3	27	42,2
<b>PgR-Status</b>		
Negativ	34	53,1
Positiv	15	23,4

Ich habe die nach dem CMF-Schema Therapierten ebenfalls gesondert mit der uni- und der multivariaten Analyse statistisch auf das krankheitsfreie Überleben hin untersucht (siehe 4.5.2, 4.7.2 und 4.8.2). Die Ergebnisse dieser Analyse ließen den Schluss zu, dass das CMF-Subkollektiv das Gesamtkollektiv repräsentiert.

#### **4.2 Festlegung des Schwellenwertes bei der immunhistochemischen Analyse**

Für beide Antikörper musste ein IRS-Wert gefunden werden, ab welchem das Färbeergebnis als positiv zu bewerten war. Mit Hilfe dieses Schwellenwertes wurde eine statistische Auswertung in Bezug auf das progressionsfreie Überleben unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Faktoren durchgeführt. Häufig wird der Schwellenwert bei Analysen von immunhistochemischen Färbungen auf der IRS-Skala etwa in der Mitte festgelegt. Hier wurde für Rho-GDI $\alpha$  für die Auswertung ein Schwellenwert von IRS von 6 festgelegt, das bedeutet, dass alle Tumoren ab einem IRS von 8 als positiv gewertet wurden.

Für Rho-GDI $\beta$  wurde der Schwellenwert bei 0 gesetzt, das heißt, dass nur Tumoren, in denen absolut keine Färbung nachweisbar war, als Rho-GDI $\beta$ -negativ beurteilt wurden und bei einem IRS-Wert ab 1 die Tumoren als positives Färbeergebnis in die Analysen einfließen. Die von Rho-GDI $\alpha$  abweichende Festlegung des Schwellenwertes war notwendig, da die meisten Tumoren für Rho-GDI $\beta$  einen IRS von 0 aufwiesen. Des Weiteren zeigte eine Westernblotanalyse, dass in einem Kollektiv von primären Mammakarzinomen fast 40% Rho-GDI $\beta$  exprimieren (Abb. 6), etwa der Prozentsatz, der sich auch bei der immunhistochemischen Analyse mit einem Schwellenwert bei 0 ergab. Es wurden auch uni- und multivariate Analysen für Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  bei verschiedenen Schwellenwertfestlegungen durchgeführt, um den Einfluss des Schwellenwertes auf das Ergebnis zu untersuchen. Die Ergebnisse der univariaten Analysen sind unter 4.5.3 und 4.7.3, die der multivariaten Analyse unter 4.8.3 und 4.8.4 aufgeführt.

#### **4.3 Expression von Rho-GDI $\beta$ und Rho-GDI $\alpha$ im Mammakarzinom und im Normalgewebe**

Paraffinschnitte von den invasiven Tumorproben aus dem Kollektiv wurden mit Antikörpern gegen Rho-GDI $\beta$  und Rho-GDI $\alpha$  immunhistochemisch untersucht. Von einigen Patientinnen stand auch tumorfreies Mammagewebe zur Verfügung. In zehn Fällen konnte ein Vergleich zwischen tumorbefallenem und tumorfreiem Gewebe von derselben Patientin für beide Antikörper vorgenommen werden. Die Färbung zum Nachweis beider Proteine war zytosolisch

lokalisiert. Da Rho-GDI $\beta$  in Zellen hämatopoetischen Ursprungs stark exprimiert wird, dienten Lymphozyten als Positivkontrolle in den Gewebeschnitten. In den Karzinomen konnten Rho-GDI $\beta$  und Rho-GDI $\alpha$  in den Tumorzellen nachgewiesen werden.

#### 4.3.1 Expression von Rho-GDI $\beta$

Drüsenepithelzellen in tumorfreien Kontrollen zeigten keine Rho-GDI $\beta$ -Expression (Abb. 3). Wurde der IRS-Schwellenwert bei 0 gesetzt, exprimierten in dem Kollektiv 43 von 117 Mammakarzinomen Rho-GDI $\beta$  (36,8%). Ein Beispiel ist in Abbildung 4 dargestellt (IRS 12). In Abbildung 5 ist ein negatives Färbeergebnis dargestellt (IRS 0).

Die Häufigkeit der Rho-GDI $\beta$  Protein-Expression in primären Brusttumoren wurde auch durch Westernblotanalysen untersucht. Hierzu wurden 70 Extrakte aus Tumoren eines Kollektivs aus der Universitätsklinik Hamburg/Eppendorf benutzt. Diese Analyse, die von Frau A. Dittmer durchgeführt wurde, ergab, dass es deutliche Unterschiede in der Expression von Rho-GDI $\beta$  zwischen den Tumoren gibt. Rho-GDI $\beta$  wurde gar nicht bis stark exprimiert (Abb. 6). Etwa 40% der Proben waren Rho-GDI $\beta$  positiv. Das entspricht in etwa dem Prozentsatz an Tumoren, die durch die Immunhistochemie als Rho-GDI $\beta$ -positiv gewertet wurden. Um zu zeigen, dass die Unterschiede in Rho-GDI $\beta$  Expression nicht durch unterschiedliche Proteinbeladung in der Westernblotanalyse zustande kamen, wurden die Blots auch mit Antikörpern gegen ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) inkubiert (Dittmer and Dittmer, 2006).

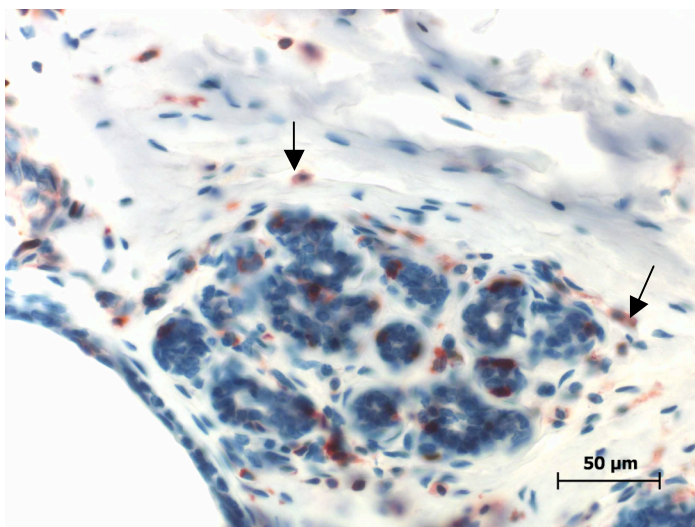


Abb. 3: Rho-GDI $\beta$  im Drüsen-  
gewebe der Mamma, 40x,  
Rho-GDI $\beta$ -positive Lymphozyten  
(Pfeile bei zwei Beispielen), Rho-  
GDI $\beta$ -negative  
Drüsenepithelzellen.

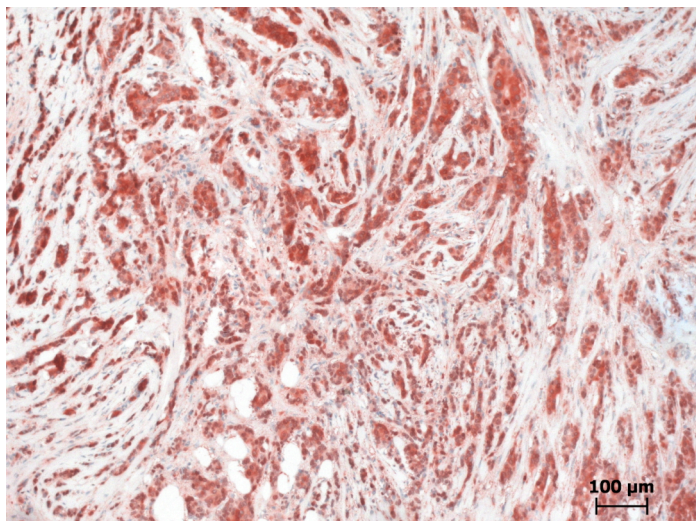


Abb. 4: Rho-GDI $\beta$  im duktalem Mammakarzinom, IRS 12, 10x, Stark positive Reaktion in Lymphozyten und im Tumor.

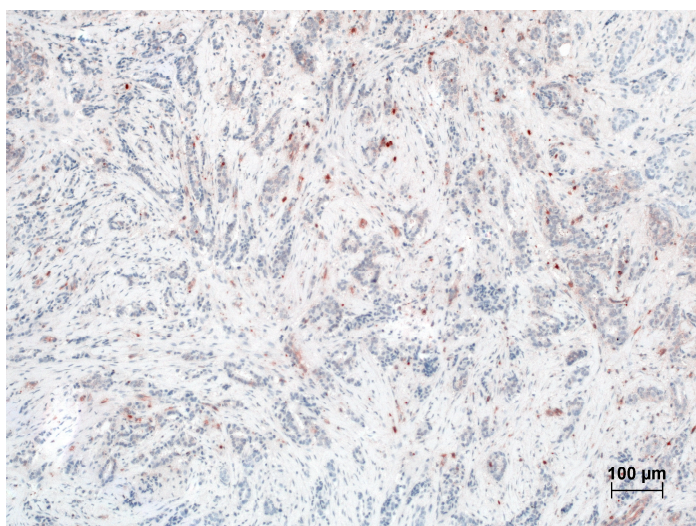


Abb. 5: Rho-GDI $\beta$  im duktalem Mammakarzinom, IRS 0, 10x, Positive Reaktionen in Lymphozyten und im Stroma, Tumor negativ.

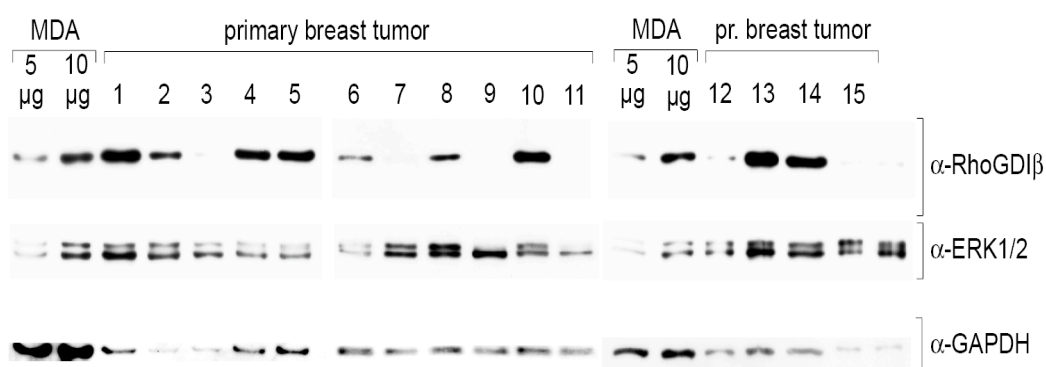


Abb. 6: Rho-GDI $\beta$  Nachweis in der Westernblotanalyse. Die Ergebnisse von 15 der insgesamt 70 getesteten Tumorproteinextrakte sind dargestellt. Zum Vergleich sind Extrakte der Rho-GDI $\beta$ -positiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 gezeigt. 5 und 10 $\mu\text{g}$  geben die Menge an aufgetragenem Gesamtprotein an. Diese betrug bei den primären Tumoren 10 $\mu\text{g}$ . (Diese Abbildung entspricht der Fig. 6A in Schunke, Span, Ronneburg et al. Cancer Res 67 (2007), 10694).

#### 4.3.2 Expression von Rho-GDI $\alpha$

Rho-GDI $\alpha$  wird in der Literatur als ubiquitär exprimiertes Protein beschrieben. In den hier untersuchten tumorfreien Proben war Rho-GDI $\alpha$  stets positiv (Abb. 7). Wurde der IRS Schwellenwert bei 6 gelegt, zeigten 69 von 112 (61,6%) Mammakarzinomen eine hohe Expression von Rho-GDI $\alpha$ . Ein Beispiel in Abbildung 8 zeigt ein stark positives Ergebnis mit einem IRS von 12. Die Abbildung 9 zeigt für Rho-GDI $\alpha$  ein negatives Ergebnis (IRS 0) in einem histologischen Tumorschnitt. In Abb. 10 ist das Ergebnis einer Westernblotanalyse von Zellextrakten aus Mammakarzinomzelllinien (MCF-7) dargestellt. Nur eine Bande, die einem Protein von 27 kDa Molekulargewicht entspricht, konnte beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Daten aus einer Arbeit von Zhang et al. (2005). Der hier verwendete Rho-GDI $\alpha$ -Antikörper reagiert also spezifisch mit dem Rho-GDI $\alpha$ -Protein

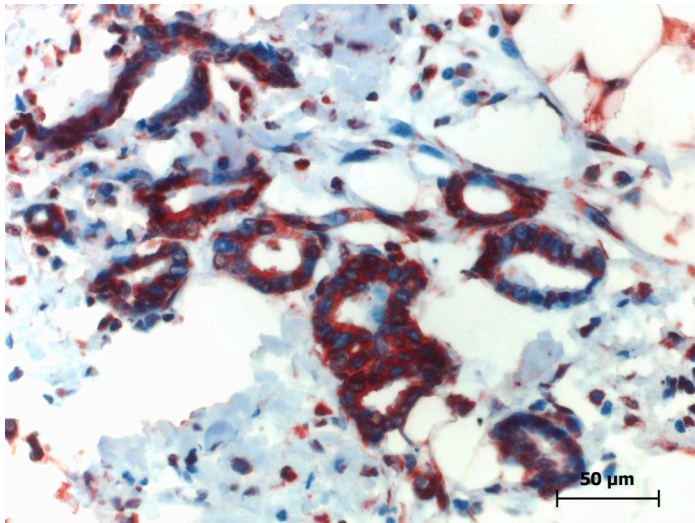


Abb. 7: Rho-GDI $\alpha$  im Drüsen-  
gewebe der Mamma, 40x,  
positive Reaktion im Stroma und  
in Drüsenepithelzellen.

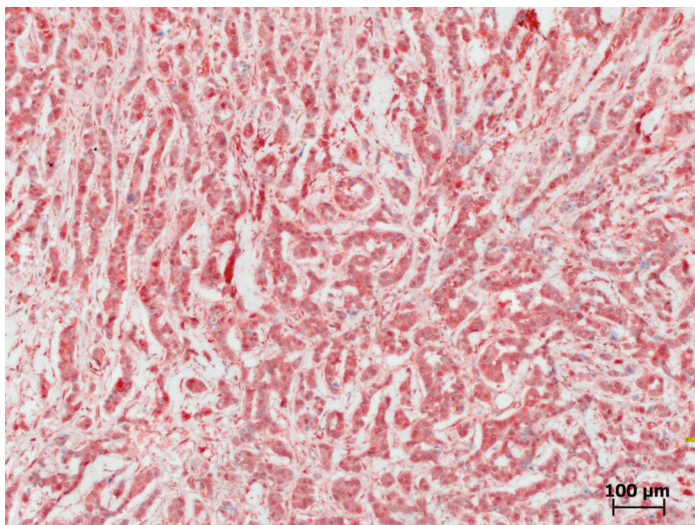


Abb. 8: Rho-GDI $\alpha$  im duktalem  
Mammakarzinom, IRS 12, 10x,  
Tumor stark positiv.

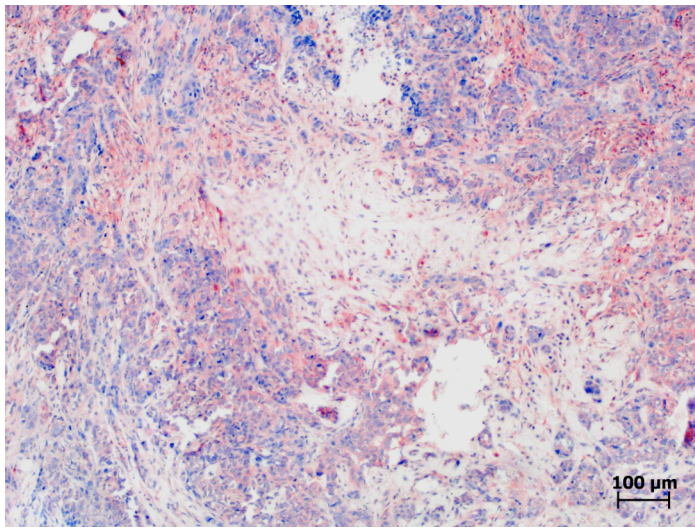


Abb. 9: Rho-GDI $\alpha$  im duktalem Mammakarzinom, IRS 0, 10x, positive Stromareaktion bei negativem Tumor.

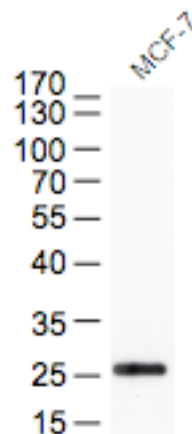


Abb. 10: Nachweis von Rho-GDI $\alpha$  in der Westernblotanalyse. Die Analyse erfolgte an zytosolischen Extrakten von MCF-7 Brustkrebszelllinien. Eine spezifische Bande bei 27 kDa ist zu erkennen.

#### 4.4 Korrelation der Rho-GDI $\beta$ -Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Eine Analyse möglicher Korrelationen zwischen der Expression der beiden Rho-GDIs und klinischen, prognostisch wichtigen Parametern erfolgte mit dem Chi<sup>2</sup>-Test. In den jeweiligen Vergleichen wurden die klinisch-pathologischen Parameter „Alter“, „Menopausenstatus“, „Nodalstatus“, „Histologie“, „Tumorgroße“, „Grading“, „ER“ und „PgR“ mit einbezogen (Tabelle 4 und Tabelle 6). Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Rho-GDI $\beta$ -Expression und den klinisch-pathologischen Faktoren gefunden

werden. Ein tendenzieller Zusammenhang war zwischen der Rho-GDI $\beta$ -Expression und einem positiven Estrogenrezeptorstatus zu erkennen ( $p= 0.077$ ). 43,7% der ER-positiven Tumoren waren auch Rho-GDI $\beta$ -positiv, jedoch nur 27,3% der ER-negativen. Beim histologischen Grading der Tumorproben und bei der TumorgroÙe konnte eine tendenzielle, jedoch ebenfalls nicht signifikante negative Korrelation mit der Rho-GDI $\beta$ -Expression gezeigt werden (Tabelle 4). Während bei T1 noch 44,6% der Tumoren Rho-GDI $\beta$ -positiv waren, waren es bei T2 und T3 nur noch 30% bzw. 27,3% ( $p= 0,234$ ). In Bezug auf das Grading wiesen G1-Tumoren zu 66,7% eine Rho-GDI $\beta$ -Expression auf, während nur 43,1% bzw. 27,1% der G2 und G3-Tumoren einen positiven Rho-GDI $\beta$ -Status aufwiesen ( $p= 0,123$ ). Interessanterweise waren fast alle lobulären Tumoren im Gegensatz der duktaalen Tumoren Rho-GDI $\beta$ -positiv. Da aber nur insgesamt 5 lobuläre Tumoren in diesem Kollektiv vorlagen, kann nicht abschlieÙend beurteilt werden, ob dies ein zufälliges Ergebnis ist oder ob lobuläre Tumoren tatsachlichverstarkt Rho-GDI $\beta$  exprimieren.



Tabelle 4: Klinisch-pathologische Faktoren im Gesamtkollektiv und Rho-GDI $\beta$ -Expression bei einem immunhistochemischen Schwellenwert von IRS= 0.

Merkmal	N= 117	Rho-GDI $\beta$ - positiv	% Rho- GDI $\beta$ - positiv in Subgruppe	p
<u>Alter (in Jahren)</u>				
< 50	26 (22,2%)	9	34,6	0,863
$\geq$ 50	85 (72,6%)	31	36,5	
<u>Menopausenstatus</u>				
Premenopausal	42 (35,9%)	19	45,3	0,154
Postmenopausal	75 (64,1%)	24	32,0	
<u>Nodalstatus</u>				
Negativ	72 (61,5%)	28	38,9	0,544
positiv	45 (38,5%)	15	33,3	
<u>Histologie</u>				
Duktal	95 (81,2%)	35	36,9	0,081
Lobulär	5 (4,3%)	4	80,0	
Andere	13 (11,1%)	3	23,1	
<u>Tumorgroße</u>				
pT1	56 (47,9%)	25	44,6	0,234
pT2	50 (42,7%)	15	30,0	
pT3/4	11 (9,4%)	3	27,3	
<u>Grading</u>				
I	3 (2,6%)	2	66,7	0,123
II	65 (55,6%)	28	43,1	
III	48 (41,0%)	13	27,1	
<u>ER</u>				
Negativ	44 (37,6%)	12	27,3	0,077
Positiv	71 (60,7%)	31	43,7	
<u>PgR</u>				
Negativ	64 (54,7%)	25	39,1	0,678
Positiv	51 (43,6%)	18	35,3	

#### 4.5 Univariate Überlebensanalyse für Rho-GDI $\beta$ (Kaplan-Meier-Analysen)

Der Chi<sup>2</sup>-Test zeigte keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Rho-GDI $\beta$ -Expressionslevel und klinisch-pathologischen Parametern. Als nächstes untersuchte ich den Einfluss von Rho-GDI $\beta$  auf das Überleben. Die Überlebenskurven wurden mit dem log-rank-Test auf Signifikanz geprüft. Mittels der Kaplan-Meier-Analyse wurde die Zeitspanne zwischen der Primärdiagnose bis zum Auftreten eines Ereignisses im Krankheitsverlauf dargestellt. Als Ereignis wurden Rezidive, Metastasen, Neuerkrankungen (kontralaterales Mammakarzinom) und "krebsbedingter Tod der Patientin" gewertet. Zusammenfassend wurde diese Zeit als disease-free survival oder krankheitsfreies Überleben bezeichnet. Das overall survival, synonym auch Gesamtüberleben, definiert den Zeitraum von der Diagnose bis zum Auftreten des Todes. Der Einfluss je eines positiven und eines negativen Status von Rho-GDI $\beta$  wurde analysiert. Bei einer Subgruppenanalyse wurde nach den prognostischen Faktoren „ER-Status“ (Abb. 12), „PgR-Status (Abb. 13), „Grading“ (G2 oder G3) (Abb. 14) und „Tumorgröße“ (T1 oder T2/3) (Abb. 15) und dem Rho-GDI $\beta$ -Expressionslevel (Abb. 16) stratifiziert.

##### 4.5.1 Univariate Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs für Rho-GDI $\beta$

Für Rho-GDI $\beta$  konnte kein Einfluss auf das krankheitsfreie. und das Gesamtüberleben festgestellt werden (Abb.11). Ein positiver Rho-GDI $\beta$ -Status ist tendenziell mit einem längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert ( $p=0,149$ ).

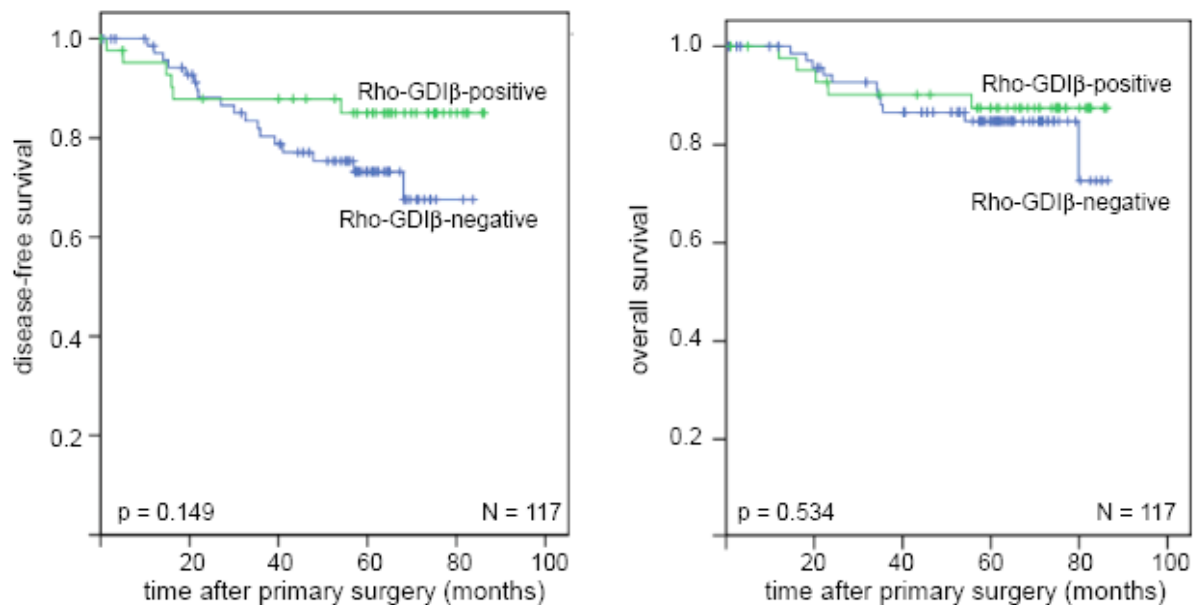


Abb. 11: Die Expression Rho-GDI $\beta$  hat keinen signifikanten Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben.

Bei der Subgruppenanalyse konnte kein Effekt von Rho-GDI $\beta$  auf den Krankheitsverlauf gefunden werden, wenn nach dem prognostischen Faktor ER-Status (Abb. 12) stratifiziert wurde. Ein positiver Rho-GDI $\beta$ -Status ist bei PgR-negativen Tumoren tendenziell mit einem längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Abb. 13) ( $p=0,146$ ).

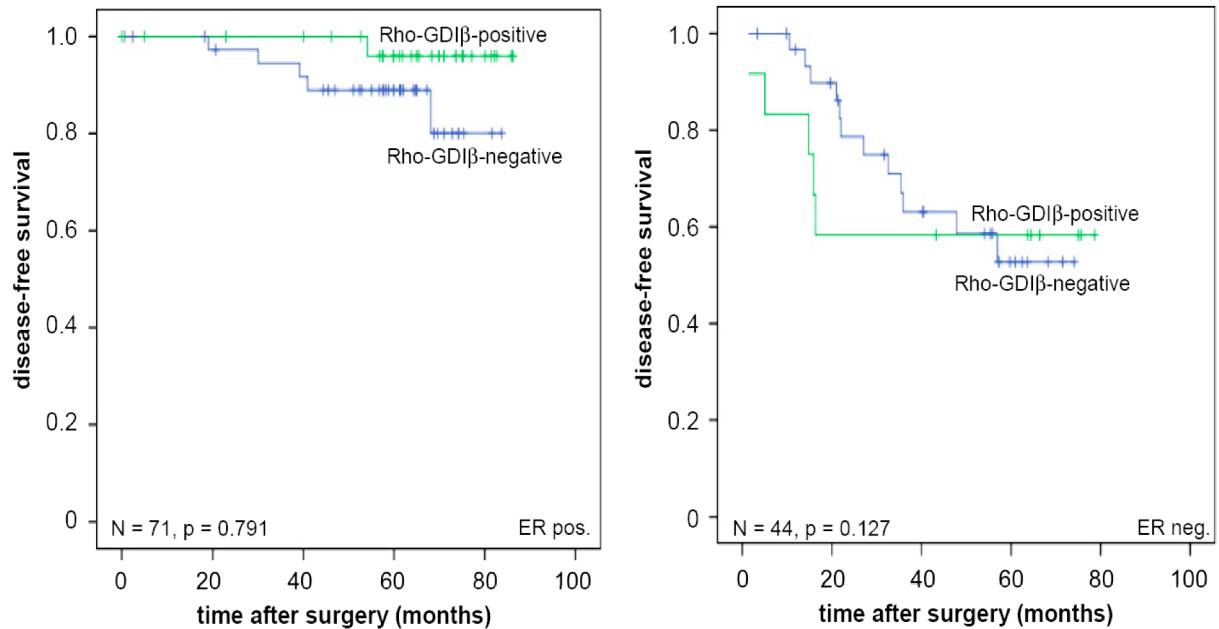


Abb.12: Rho-GDI $\beta$ , stratifiziert nach dem ER-Status, zeigt keinen Effekt auf das krankheitsfreie Überleben.

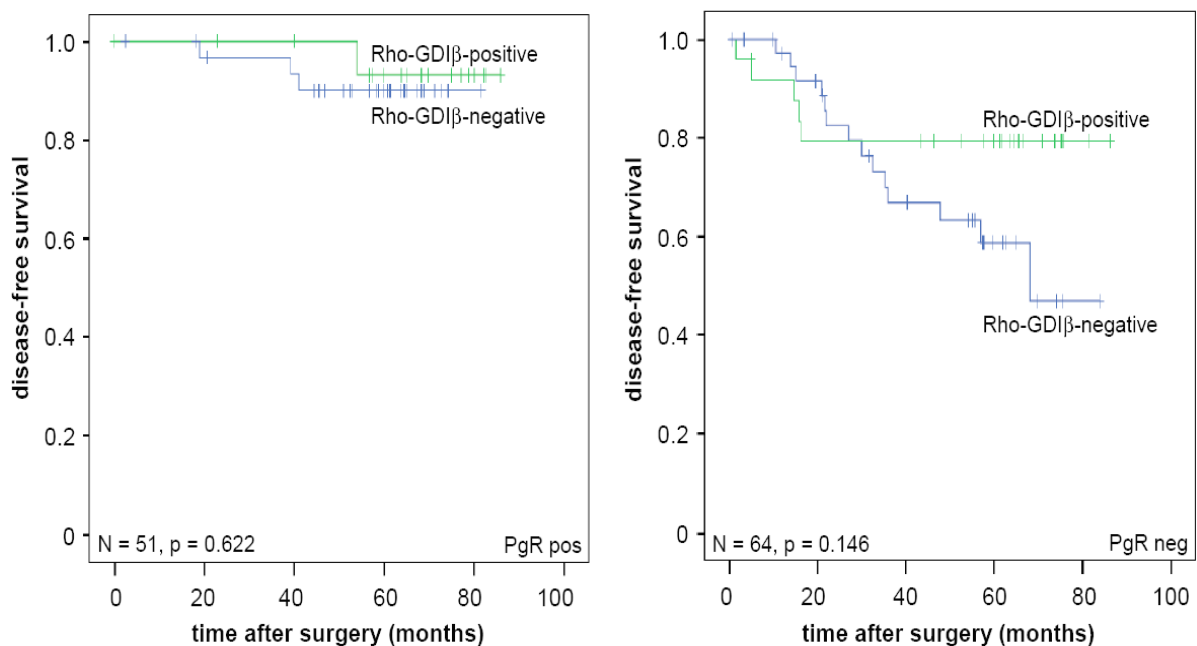


Abb. 13: Rho-GDI $\beta$ - Expression, stratifiziert nach dem PgR-Status Bei PgR-negativen Tumoren hat ein positiver Rho-GDI $\beta$ -Status einen tendenziellen Effekt auf das Überleben.

Die Analyse von G2- und G3-Tumoren in Bezug auf den Effekt eines positiven oder negativen Rho-GDI $\beta$ -Status konnte keinen Einfluss dieses GDI-Proteins auf das krankheitsfreie Überleben zeigen (Abb. 14).

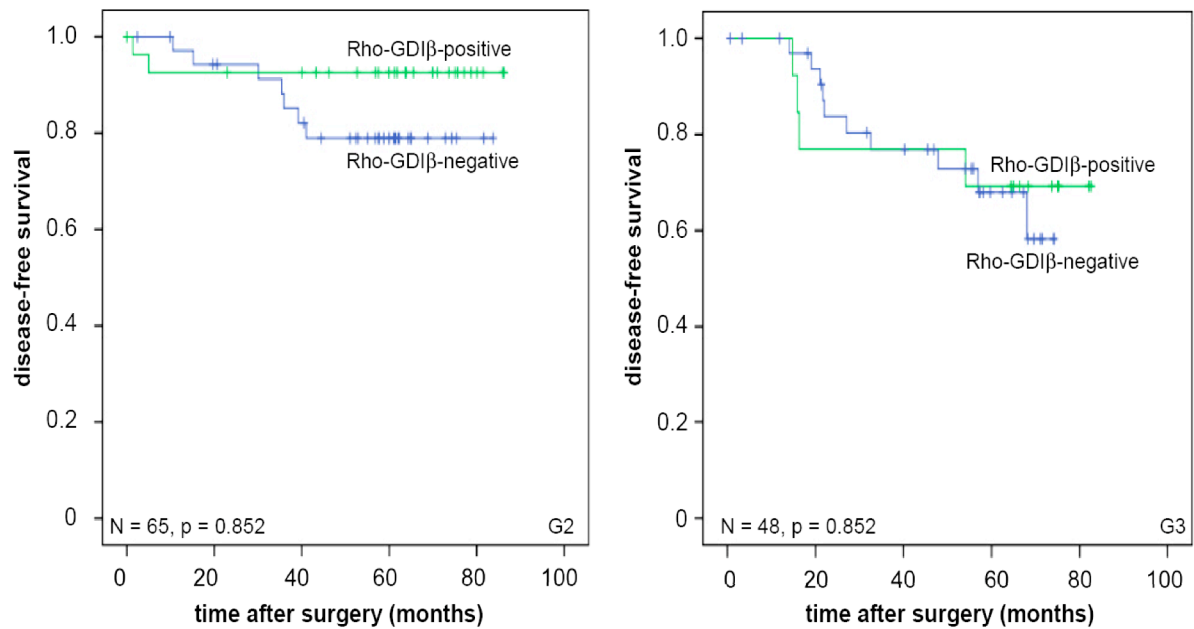


Abb.14: Rho-GDI $\beta$ , stratifiziert nach Grading, hat keinen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben.

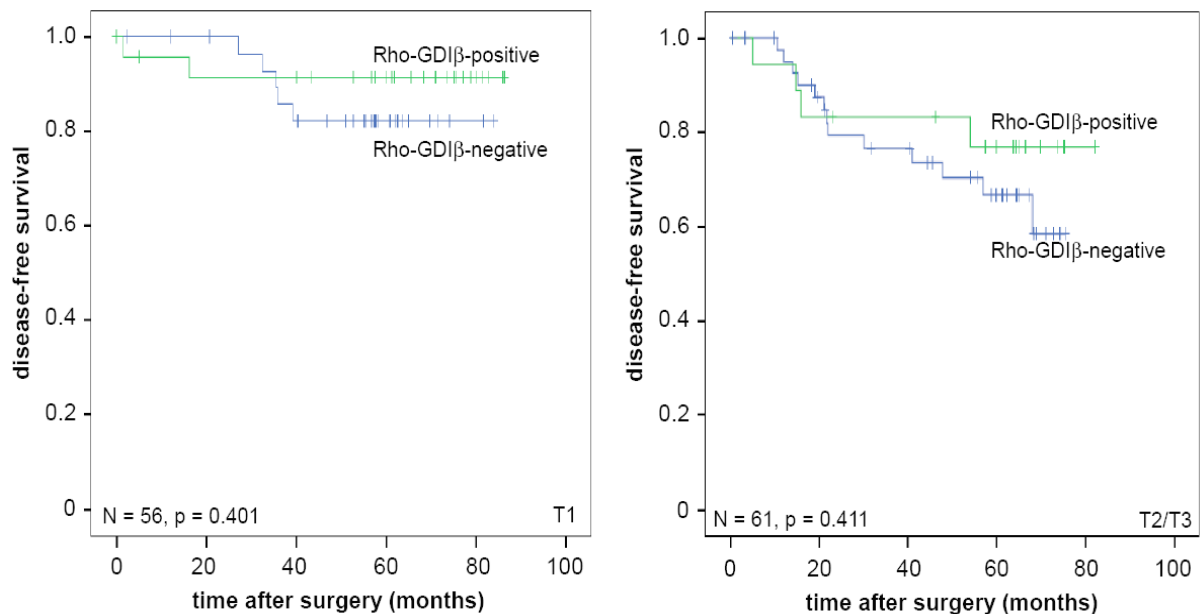


Abb. 15: Rho-GDI $\beta$ -Status, stratifiziert nach der TumorgroÙe. Bei grÙoÙeren Tumoren hat ein positiver Status von Rho-GDI $\beta$  einen tendenziellen Effekt auf das Überleben (p= 0,411).

Der Rho-GDI $\beta$ -Status wurde auf die Tumorgrößen T1 und T2/T3 stratifiziert (Abb. 15). Rho-GDI $\beta$  hatte keinen signifikanten Effekt auf das krankheitsfreie Überleben. Ein Trend lässt sich bei den größeren Tumoren (T2/T3) erkennen; Rho-GDI $\beta$ - positive größere Tumoren sind mit einem tendenziell längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert ( $p=0,411$ ).

Rho-GDI $\beta$  hatte bei den Überlebensanalysen keine signifikanten Einflüsse auf das Überleben der Patientinnen. Bei der Analyse der Einflüsse der beiden Rho-GDIs aufeinander konnte ich feststellen, dass ein positiver Status von Rho-GDI $\beta$  mit einem längeren krankheitsfreien Überleben korreliert, wenn gleichzeitig Rho-GDI $\alpha$  niedrig exprimiert wird (Abb. 16). Dieser Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant ( $p=0,178$ ).

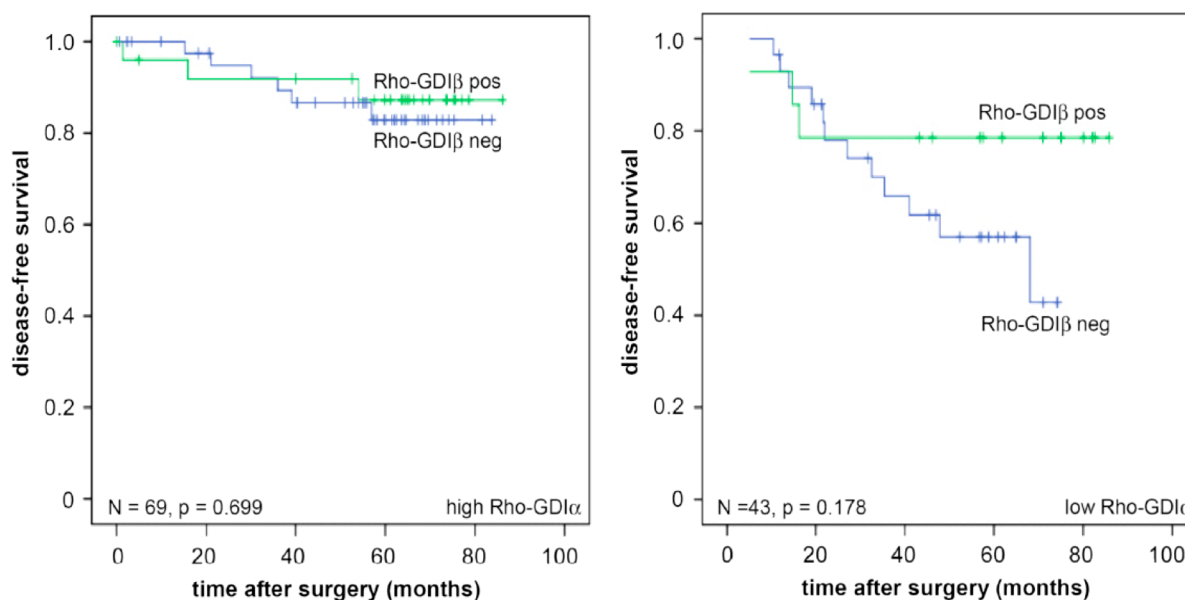


Abb.16: Einfluss des Rho-GDI $\beta$ -Status bei hoher oder niedriger Expression von Rho-GDI $\alpha$ : Bei einem niedrigen Level von Rho-GDI $\alpha$  korreliert ein positiver Status von Rho-GDI $\beta$  tendenziell mit einem längeren krankheitsfreien Überleben.

#### 4.5.2 Univariate Überlebensanalyse des CMF-Subkollektivs für Rho-GDI $\beta$

Die chemotherapierten Patientinnen waren im Gesamtkollektiv zahlenmäßig stark vertreten. In Form eines Subkollektivs (CMF-Subkollektiv) wurden ebenfalls die statistischen Analysen durchgeführt. Die Stratifizierung erfolgte nach dem krankheitsfreien Überleben, dem ER- und PgR-Status, dem Grading und der Tumorgröße. Die Aussagen, die durch diese Analysen getroffen werden können, entsprechen denen der Auswertungen des Gesamtkollektivs. Wie bei dem Gesamtkollektiv konnte im CMF-Kollektiv für Rho-GDI $\beta$  kein signifikanter Effekt auf das krankheitsfreie Überleben festgestellt werden ( $p=0,123$ ). Ein Trend lässt sich bei CMF-

therapierten Patientinnen trotzdem erkennen. Die Patientinnen mit einem positiven Status von Rho-GDI $\beta$  zeigen ein längeres krankheitsfreies Überleben ( $p=0,123$ ) (Abb. 17).

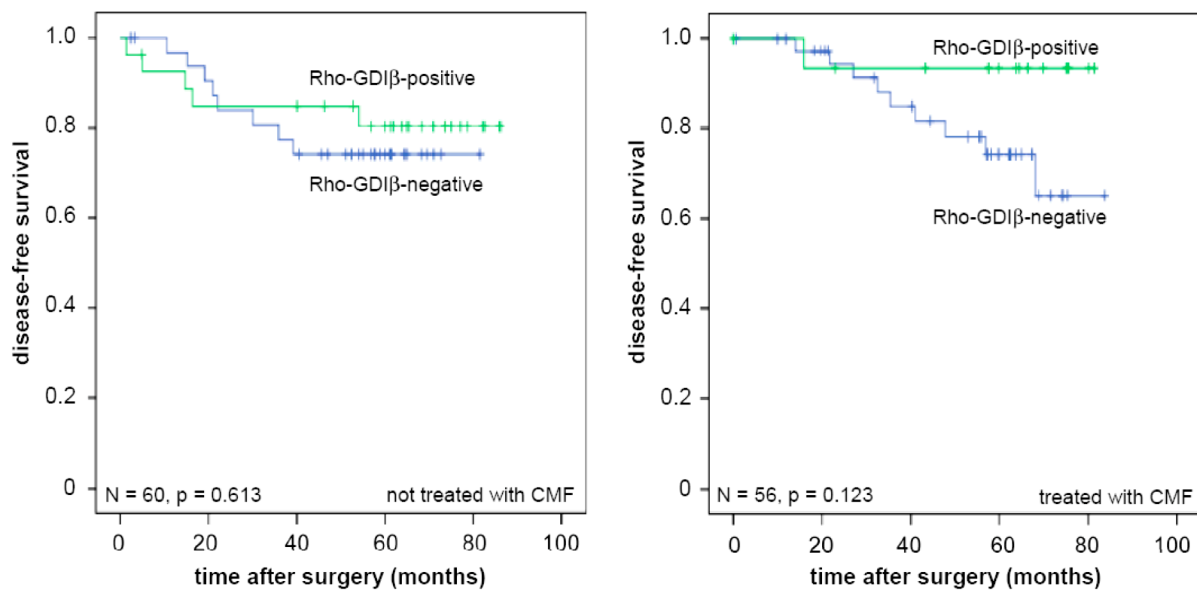


Abb. 17: Einfluss des Rho-GDI $\beta$ -Status auf das Überleben von Patientinnen (CMF-Kollektiv). Es besteht kein signifikanter Zusammenhang, jedoch zeigen Patientinnen unter CMF-Therapie mit positivem Rho-GDI $\beta$ -Status ein tendenziell längeres krankheitsfreies Überleben.

#### 4.5.3 Log-rank bei verschiedenen Schwellenwerten für die Rho-GDI $\beta$ Expression

Um den Einfluss des IRS-Schwellenwertes auf die Auswertungen zu untersuchen, wurde die univariate Analyse für verschiedene Schwellenwerte durchgeführt (Tabelle 5).

Für Rho-GDI $\beta$  konnte bei keinem der getesteten Schwellenwerte eine statistische Signifikanz festgestellt werden. Bei einem Schwellenwert von 3, 4 oder 6 liegt der p-Wert leicht über 0,05. Auch bei diesen Schwellenwerten bleibt die Tendenz, dass eine erhöhte Expression von Rho-GDI $\beta$  mit einem besseren Überleben assoziiert ist, erhalten.

Tabelle 5: Log-rank der Kaplan-Meier-Analysen für krankheitsfreies Überleben bei verschiedenen IRS-Schwellenwerten. 1) steht jeweils für einen negativen, 2) für einen positiven Rho-GDI $\beta$ -Expressionsstatus. Der rot gekennzeichnete Wert wurde für die Auswertungen gewählt.

Cut-off (IRS)	Rho-GDI $\beta$ negativ (N)	Rho-GDI $\beta$ positiv (N)	Signifikanz
1) 0 2) 1-12	74	43	0,174
1) 0-2 2) 3-12	86	19	0,378
1) 0-3 2) 4-12	87	30	0,069
1) 0-4 2) 6-12	97	20	0,057
1) 0-6 2) 8-12	98	19	0,070
1) 0-8 2) 9-12	102	15	0,147
1) 0-9 2) 12	112	5	0,232

#### 4.6 Korrelation der Rho-GDI $\alpha$ -Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Für die Rho-GDI $\alpha$ -Proteinexpression konnte keine signifikante Korrelation mit den klinisch-pathologischen Faktoren in der univariaten Analyse nachgewiesen werden (Tabelle 6). Ein Trend ist jedoch bei den Patientinnen mit einem Lebensalter von über 50 Jahren zu erkennen. Bei Patientinnen über 50 Jahren zeigten 67,1% eine erhöhte Expression von Rho-GDI $\alpha$  im Tumor, bei Patientinnen unter 50 Jahren waren dies nur 48%. Jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ( $p=0,084$ ). Analog hierzu zeigt sich in der Subgruppe der postmenopausalen Patientinnen im Vergleich zu den prämenopausalen Patientinnen eine größere Anzahl von Tumoren mit hoher Rho-GDI $\alpha$ -Expression (67,1%) ( $p=0,101$ ). In Hinblick auf den Nodalstatus waren Mammakarzinome mit hoher oder niedriger Rho-GDI $\alpha$ -Expression prozentual ähnlich oft vertreten (Tabelle 6). In Bezug auf das Merkmal „Grading“ fällt auf, dass die G1-Tumoren zu 100% Rho-GDI $\alpha$ -positiv sind. Da diese Karzinome sehr selten in dem untersuchten Kollektiv vertreten sind (2,7%), ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieser Effekt zufällig zustande kam.

Tabelle 6: Klinisch-pathologische Faktoren im untersuchten Kollektiv und Rho-GDI $\alpha$ -Expression bei einem immunhistochemischen Schwellenwert von IRS= 6.

Merkmal	N= 112	Rho-GDI $\alpha$ -positiv	% Rho-GDI $\alpha$ -positiv in Subgruppe	p
<u>Alter (in Jahren)</u>				
< 50	25 (22,3%)	12	48,0	0,084
$\geq$ 50	82 (73,2%)	55	67,1	
<u>Menopausenstatus</u>				
Premenopausal	39 (34,8%)	20	51,3	0,101
Postmenopausal	73 (65,2%)	49	67,1	
<u>Nodalstatus</u>				
Negativ	70 (62,5%)	43	61,4	0,960
positiv	42 (37,5%)	26	61,9	
<u>Histologie</u>				
Duktal	91 (81,3%)	54	59,3	0,578
Lobulär	5 (4,5%)	3	60,0	
Andere	12 (10,7%)	9	75,0	
<u>Tumorgröße</u>				
pT1	53 (47,3%)	35	66,0	0,343
pT2	48 (42,9%)	26	54,2	
pT3/4	11 (9,8%)	8	72,7	
<u>Grading</u>				
I	3 (2,7%)	3	100	0,253
II	60 (53,6%)	39	65,0	
III	48 (42,9%)	27	56,3	
<u>ER</u>				
Negativ	43 (38,4%)	24	55,8	0,230
Positiv	67 (59,2%)	45	67,2	
<u>PgR</u>				
Negativ	61 (54,5%)	38	62,3	0,917
Positiv	49 (43,8%)	31	63,3	



## 4.7 Univariate Überlebensanalyse für Rho-GDI $\alpha$ (Kaplan-Meier-Analyse)

### 4.7.1 Univariate Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs für Rho-GDI $\alpha$

Mit der Kaplan-Meier-Analyse wurde die Zeitspanne zwischen der Primärdiagnose bis zum Auftreten eines Ereignisses im Krankheitsverlauf dargestellt. Als Ereignis wurden Rezidive, Metastasen, Neuerkrankungen (kontralaterales Mammakarzinom) und "krebsbedingter Tod der Patientin" gewertet. Diese Zeit wurde als disease-free survival oder krankheitsfreies Überleben bezeichnet. Das overall survival, synonym auch Gesamtüberleben, definiert den Zeitraum von der Diagnose bis zum Auftreten des Todes. Der Einfluss je eines hohen und niedrigen Proteinlevels von Rho-GDI $\alpha$  auf den Krankheitsverlauf wurde analysiert. Ich stratifizierte die Rho-GDI $\alpha$ -Proteinlevel nach den prognostischen Faktoren „ER-Status“ (Abb. 19), „PgR-Status“ (Abb. 20), „Grading“ (G2 und G3) (Abb. 21) und „Tumorgroße“ (Abb. 22). Statistisch signifikant war die Korrelation von einer hohen Rho-GDI $\alpha$ -Expression mit dem krankheitsfreien Überleben ( $p=0,006$ ) und dem Gesamtüberleben ( $p=0,010$ ) im Gesamtkollektiv. In Abbildung 18 ist der Effekt von Rho-GDI $\alpha$  auf das Überleben aufgezeigt.

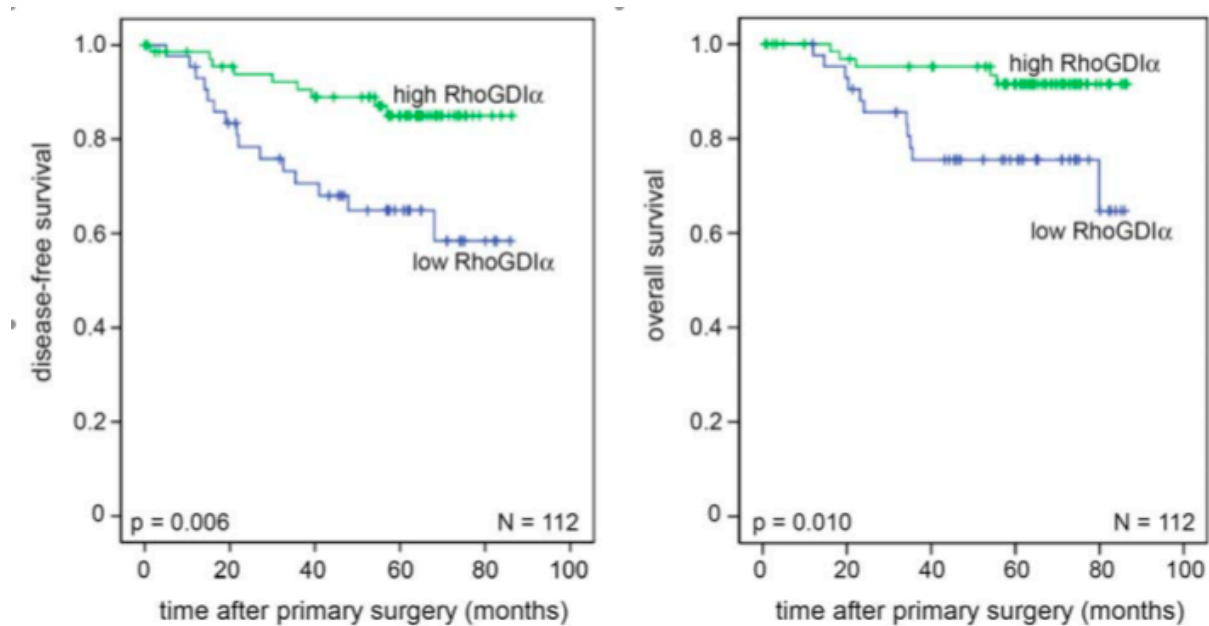


Abb. 18: Einfluss von hohen und niedrigen Rho-GDI $\alpha$ -Proteinleveln auf das krankheitsfreie- und das Gesamtüberleben.

Patientinnen mit ER-positiven Mammakarzinomen zeigten kein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben bei einer hohen Proteinexpression von Rho-GDI $\alpha$ . Bei einem ER-negativem Status waren hohe Rho-GDI $\alpha$  Level signifikant mit einem längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert ( $p=0,011$ ) (Abb. 19).

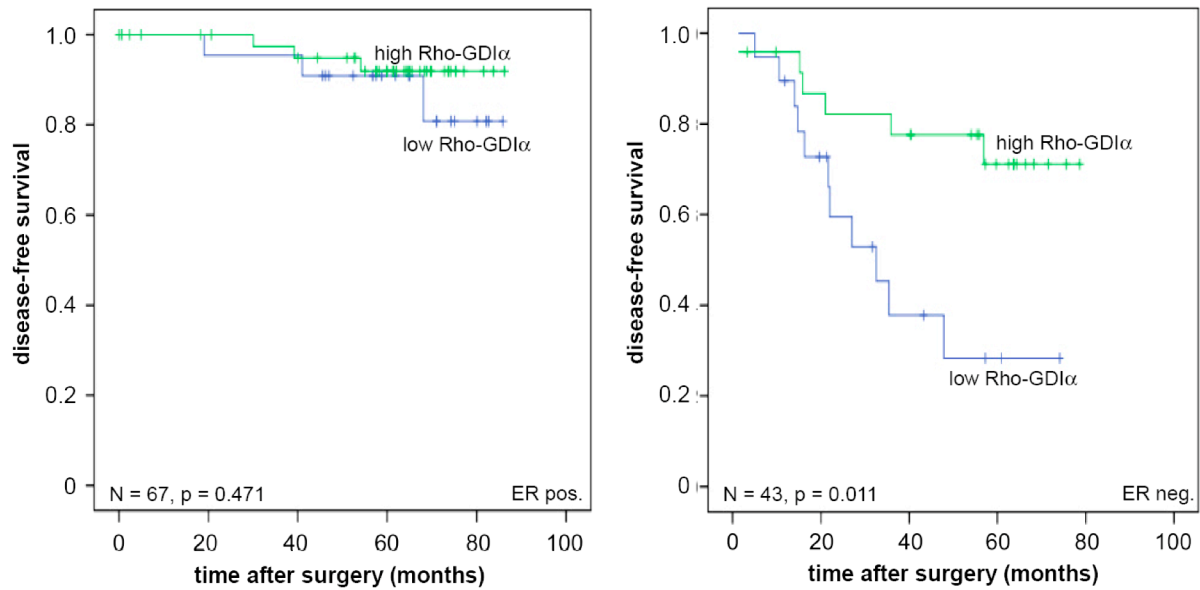


Abb. 19: Kaplan-Meier-Analyse für Patientinnen mit Mammakarzinomen, die Rho-GDI $\alpha$  stark oder schwach exprimieren bei Stratifizierung nach dem ER-Status.

Ein statistisch signifikanter Effekt eines hohen Proteinlevels von Rho-GDI $\alpha$  war im Zusammenhang mit PgR-negativen Tumoren zu erkennen (Abb. 20). Patientinnen mit PgR-negativen Mammakarzinomen zeigen im Gegensatz zu denen mit PgR-positiven Tumoren ein längeres krankheitsfreies Überleben bei einer hohen Expression von Rho-GDI $\alpha$  ( $p=0,003$ ).

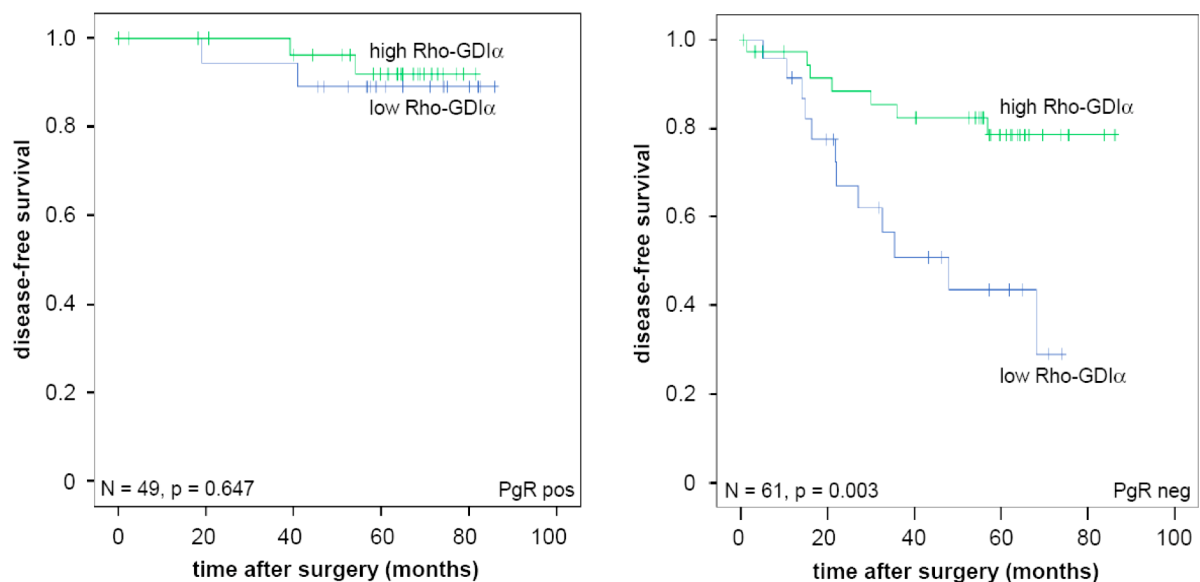


Abb. 20: Einfluss von Rho-GDI $\alpha$  auf das Überleben bei PgR-positiven und PgR-negativen Mammakarzinomen. Bei PgR-neg. Tumoren korreliert ein hoher Rho-GDI $\alpha$ -Proteinlevel signifikant mit einem längeren krankheitsfreien Überleben.

Ein starker Effekt von einer hohen Rho-GDI $\alpha$  Expression war auch bei der Stratifizierung nach dem Grading festzustellen ( $p= 0,01$ ). Patientinnen mit G3-Mammakarzinomen zeigten ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben, wenn Rho-GDI $\alpha$  hoch exprimiert wurde. G2-Karzinome mit einer starken Expression des Rho-GDI $\alpha$ -Proteins sind nicht mit einem längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Abb. 21).

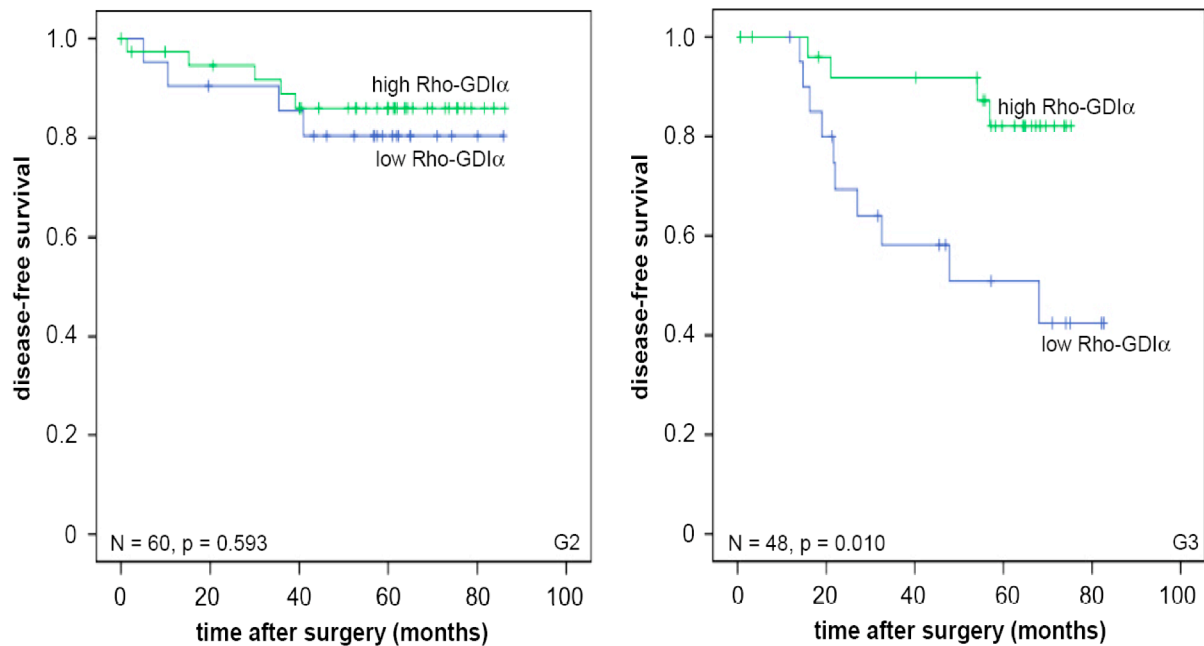


Abb. 21: Kaplan-Meier-Analyse für Mammakarzinom-Patientinnen mit niedrigen oder hohen Rho-GDI $\alpha$ -Proteinleveln, Stratifizierung nach Grading (G2 (links) im Vergleich zu G3 (rechts)).

Der Einfluss von jeweils hohen und niedrigen Expressionsleveln von Rho-GDI $\alpha$  auf das Überleben wurde im Zusammenhang mit der Tumorgöße statistisch analysiert (Abb. 22). Bei kleineren Tumoren (T1) ließ sich kein Effekt feststellen, wohingegen Patientinnen mit T2/T3-Tumoren und einer hohen Rho-GDI $\alpha$ -Expression einen längeren krankheitsfreien Verlauf zeigen ( $p= 0,028$ ).

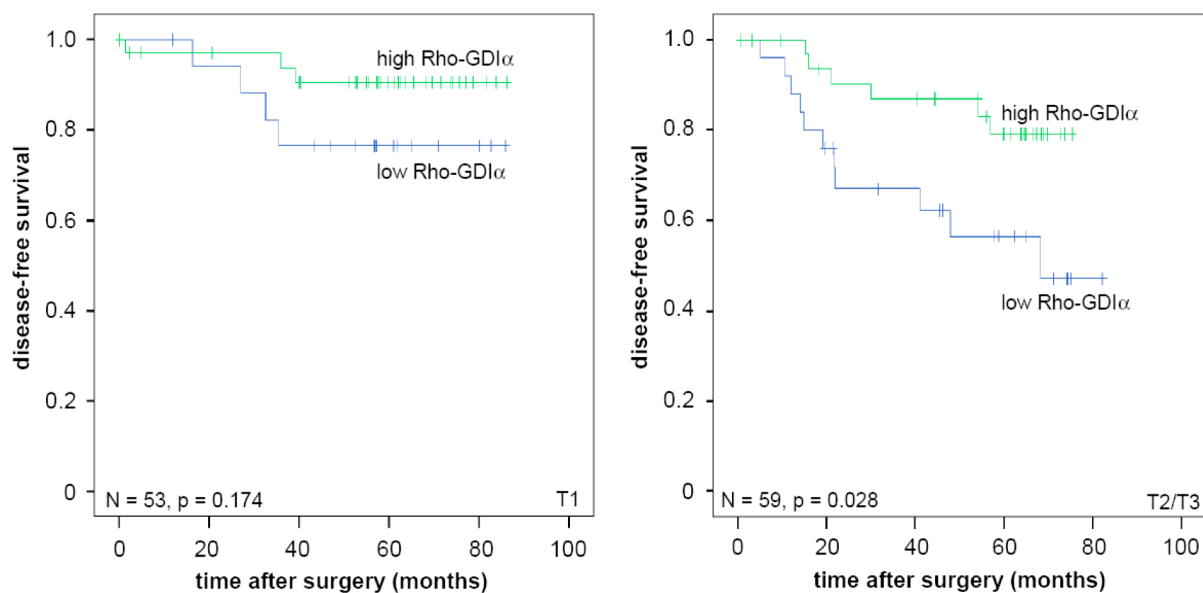


Abb. 22: Stratifizierung des Rho-GDI $\alpha$ -Status nach der TumorgroÙe. Patientinnen mit größeren Tumoren (T2/T3) und hohen Leveln von Rho-GDI $\alpha$  zeigen ein längeres Überleben.

Für Rho-GDI $\alpha$  wurde der Einfluss von Rho-GDI $\beta$  auf das Überleben untersucht. Wenn die Tumoren Rho-GDI $\beta$ -positiv sind, ist eine hohe Expression von Rho-GDI $\alpha$  nicht mit einem längeren krankheitsfreien Überleben der Patientinnen assoziiert (Abb.23). Bei den Rho-GDI $\beta$ -negativen Fällen korreliert eine hohe Expression Rho-GDI $\alpha$  signifikant mit einem längeren Überleben (p= 0,007).

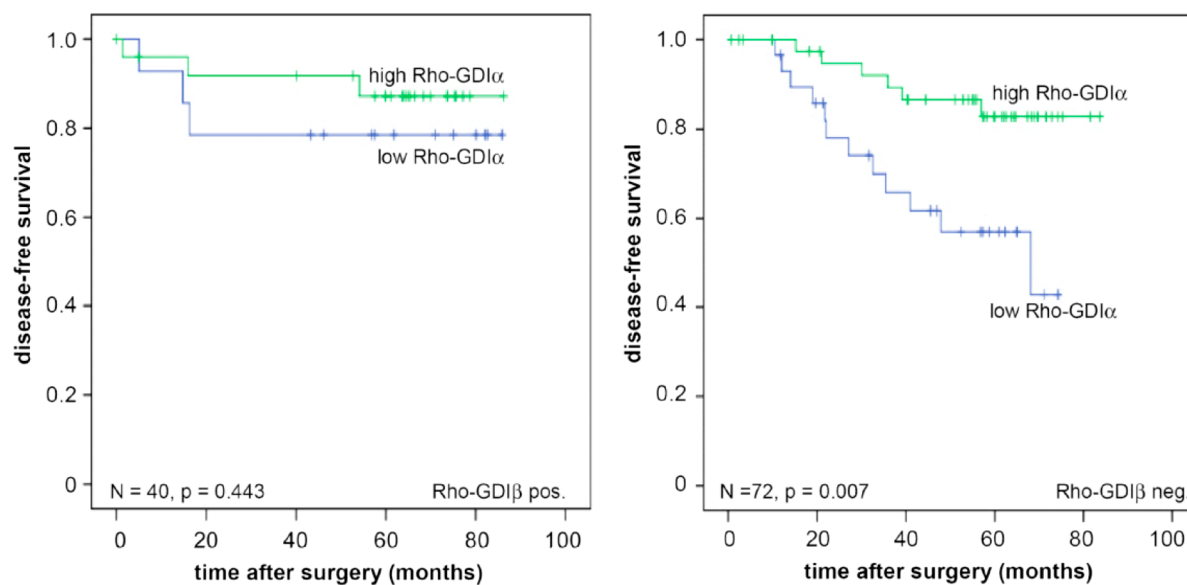


Abb.23: Effekt einer hohen und niedrigen Rho-GDI $\alpha$ -Expression bei einem positiven und negativen Rho-GDI $\beta$ -Status. Bei einem negativen Rho-GDI $\beta$ -Status korreliert eine hohe Rho-GDI $\alpha$ -Expression signifikant mit einem längeren krankheitsfreien Überleben.

#### 4.7.2 Univariate Überlebensanalyse des CMF-Subkollektivs für Rho-GDI $\alpha$

Aufgrund der großen Anzahl von chemotherapierten Patientinnen wurden diese gesondert in den statistischen Analysen betrachtet. Es wurde ein Subkollektiv von nach dem CMF-Schema therapierten Patientinnen gebildet und nach dem krankheitsfreien Überleben, dem ER- und PgR-Status, dem Grading und der Tumorgröße stratifiziert. Die Patientinnen, welche sich einer CMF-Chemotherapie unterzogen haben, zeigen bei einem hohen Expressionslevel des Rho-GDI $\alpha$ -Proteins ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben ( $p=0,001$ ) (Abb. 24).

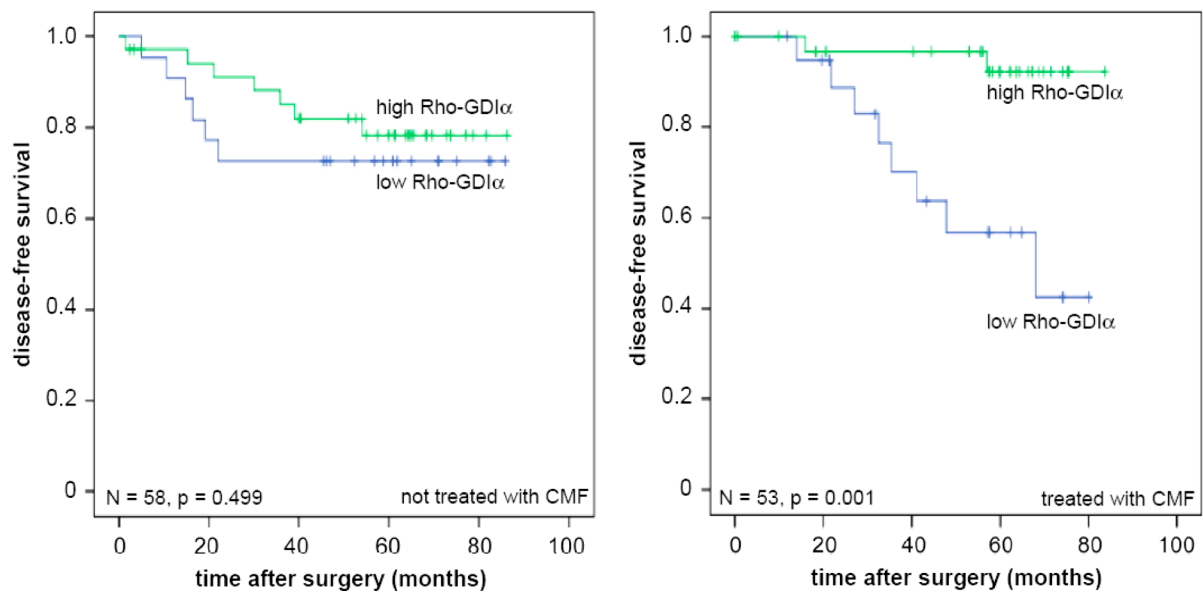


Abb. 24: Einfluss einer jeweils hohen und niedrigen Expression von Rho-GDI $\alpha$ - Expression auf das krankheitsfreie Überleben in Bezug auf die Therapieform (kein CMF vs. CMF). Patientinnen, die nach dem CMF-Schema therapiert wurden, zeigen einer hohen Expression von Rho-GDI $\alpha$  ein längeres krankheitsfreies Überleben ( $p=0,001$ ).

Die Analyse des Effektes von Rho-GDI $\alpha$  auf das krankheitsfreie Überleben wurde auch im Zusammenhang mit dem ER- und dem PgR-Status, dem Grading und der Tumorgröße durchgeführt. Die Aussagen, die getroffen werden können, sind im CMF- sowie im Gesamtkollektiv in Bezug auf den Rho-GDI $\alpha$ -Status gleich.

#### 4.7.3 Log-rank bei verschiedenen Schwellenwerten für die Rho-GDI $\alpha$ Expression

Für Rho-GDI $\alpha$  wurde der Einfluss des IRS-Schwellenwertes auf den log-rank der Kaplan-Meier-Analyse untersucht. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der univariaten Analyse in Bezug auf den Schwellenwert für Rho-GDI $\alpha$  für die Werte 3, 4, 6, 8 und 9 auf. Bei allen getesteten

Schwellenwerten war der Unterschied zwischen hoher und niedriger Rho-GDI $\alpha$ -Expression auf das krankheitsfreie Überleben signifikant (Schwellenwert 4 ( $p= 0,035$ ), 6 ( $p= 0,006$ ), 8 ( $p= 0,001$ ) und 9 ( $p= 0,023$ )). Unabhängig von der Festlegung des Schwellenwertes ist eine höhere Expression von Rho-GDI $\alpha$  mit einem günstigen Effekt verbunden.

Tabelle 7: Ergebnisse für verschiedene Schwellenwerte bei Rho-GDI $\alpha$  in der univariaten Analyse. 1) steht jeweils für eine niedrige Expression, 2) für eine hohe Expression. Der rot gekennzeichnete Wert wurde für die Auswertungen gewählt.

<b>Cut-off (IRS)</b>	<b>Rho-GDI<math>\alpha</math> negativ (N)</b>	<b>Rho-GDI<math>\alpha</math> positiv (N)</b>	<b>Signifikanz</b>
1) 0-3 2) 4-12	12	100	0,186
1) 0-4 2) 6-12	21	91	0,035
1) 0-6 2) 8-12	43	69	0,006
1) 0-8 2) 9-12	53	59	0,001
1) 0-9 2) 12	81	31	0,023

## 4.8 Multivariate Überlebensanalyse

### 4.8.1 Multivariate Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs

In der multivariaten Analyse wurden die Merkmale, welche in der univariaten Analyse signifikante Korrelationen mit krankheitsfreiem- oder Gesamtüberleben aufwiesen, mittels der Cox-Regression betrachtet. Die konventionellen Prognosefaktoren „Tumorgröße“ (T), „Nodalstatus“ (N), „Grading“, „PgR“- und „ER-Status“ sowie „Rho-GDI $\beta$ “ und „Rho-GDI $\alpha$ “ wurden aufeinander adjustiert (Tabelle 8).

Signifikante Ergebnisse konnten nur bei den Faktoren ER-Status und Rho-GDI $\alpha$  Status gefunden werden. Obwohl die statistische Signifikanz bei den anderen Faktoren nicht erreicht wurde, lassen sich die folgenden Aussagen aus der multivariaten Analyse für das betrachtete Kollektiv ableiten: Das Risiko für ein Ereignis bei nodalpositivem Status im Vergleich zu einem nodalnegativen Status ist um den Faktor 1,9 erhöht ( $p= 0,160$ ; {95% CI: 0,780 - 4,510}). Eine Tumorgröße von T2/T3 bedeutet ein im Gegensatz zu einer T1-Größe ein 2,1-

fach erhöhtes Risiko für ein Fortschreiten der Erkrankung ( $p=0,137$ ; {95% CI: 0,793 - 5,474}) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Multivariate Analyse (Cox-Regressionsmodell) des Gesamtkollektivs, das fettgedruckte Merkmal wurde mit dem in Klammern stehenden Merkmal verglichen und dessen Effekt statistisch analysiert.

Merkmal	Häufigkeit	hazard ratio	Signifikanz	95,0% Konfidenzintervall
<b>Rho-GDI<math>\beta</math> pos.</b> (vs. Rho-GDI $\beta$ neg.)	40 (vs. 70)	0,922	0,875	0,338 - 2,517
<b>Rho-GDI<math>\alpha</math> hoch</b> (vs. Rho-GDI $\alpha$ niedrig)	69 (vs. 41)	0,325	0,011	0,137 - 0,771
<b>Nodalstatus pos.</b> (vs. Nodalstatus neg.)	41 (vs. 69)	1,875	0,160	0,780 - 4,510
<b>Grading G3</b> (vs. Grading G1/G2)	48 (vs. 62)	0,647	0,383	0,243 - 1,723
<b>ER-Status pos.</b> (vs. ER-Status neg.)	67 (vs. 43)	0,215	0,012	0,064 - 0,718
<b>PgR-Status pos.</b> (vs. PgR-Status neg.)	49 (vs. 61)	0,344	0,101	0,096 - 1,234
<b>Tumorgröße</b> T2/T3 (vs. T1)	57 (vs. 53)	2,083	0,137	0,793 - 5,474

In dem hier untersuchten Kollektiv war ein G3-Status mit einem um den Faktor 1,5 erniedrigten Risiko für ein Fortschreiten der Erkrankung im Vergleich zu einem Status von G1/G2 verbunden. Literaturdaten zeigen jedoch, dass ein höheres Grading mit einer ungünstigeren Prognose verbunden ist (Sauer, 2005). Es ist allerdings zu vermerken, dass dieses Ergebnis mit einem p-Wert von 0,383 nicht signifikant ist und alle anderen Werte, die aus der multivariaten Analyse hervorgehen, vergleichsweise näher an der Signifikanzschwelle von  $p=0,05$  liegen. Außer den für G3 vs. G1/G2 entsprechen alle Ergebnisse tendenziell der generellen Lehrmeinung. Der ER-Status als etablierter Prognosemarker erwies sich in meiner Analyse mit  $p=0,012$  ({95% CI: 0,064 - 0,718}) als wichtiger unabhängiger prognostischer Faktor. Patientinnen mit einem positiven ER-Status haben ein um den Faktor 4,7 geringeres

Risiko, an Brustkrebs wieder zu erkranken oder daran zu sterben als Patientinnen mit einem negativen ER-Status. Ähnlich aussagekräftige Werte wurden für Rho-GDI $\alpha$  in der Cox-Regression erzielt. Sein unabhängiger prognostischer Wert ist mit einem p-Wert von 0,011 ({95% CI: 0,137 - 0,771}) ebenfalls signifikant. Die Ergebnisse zeigen, dass ein positiver Rho-GDI $\alpha$ -Status für eine Mammakarzinompatientin ein 3,1-fach geringeres Risiko für ein Krankheitsereignis im Vergleich zu einer Patientin mit einem negativen Rho-GDI $\alpha$  Status bedeutet. Rho-GDI $\alpha$  hat in dem betrachteten Patientinnenkollektiv nach dieser Analyse einen dem ER-Status vergleichbaren prognostischen Wert.

In der multivariaten Analyse blieben die Effekte von Rho-GDI $\beta$  unsignifikant. Ein positiver Status von Rho-GDI $\beta$  bedeutet für eine Brustkrebspatientin kein signifikant geringeres Risiko im Vergleich zum negativen Rho-GDI $\beta$  Status für einen krankheitsfreien Verlauf ( $p= 0,875$ ; {95% CI: 0,338 - 2,517}).

#### 4.8.2 Multivariate Analyse des CMF-Kollektivs

Die Patientinnen, welche eine Chemotherapie nach dem CMF-Schema erhalten haben, wurden separat mittels der Cox-Regression analysiert. Hier wurden ebenfalls die klinisch-pathologischen Faktoren „Tumorgröße“ (T), „Nodalstatus“ (N), „Grading“, „PgR“- und „ER-Status“ sowie „Rho-GDI $\beta$ “ und „Rho-GDI $\alpha$ “ aufeinander adjustiert und damit auf ihre unabhängige Aussagekraft hin überprüft (Tabelle 9).

Folgende Aussagen lassen sich nach der Cox-Regression für das CMF-Kollektiv treffen: Ein G3-Status bedeutet für Patientinnen aus dem CMF-Kollektiv ein 1,3-fach erhöhtes Risiko für ein Fortschreiten der Erkrankung, wobei die Signifikanz nicht erreicht wurde ( $p= 0,839$ ; {95% CI: 0,142 - 11,071}). Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor haben im Vergleich zu denen mit einem ER-negativen Status ein um den Faktor 2,8 niedrigeres Risiko für ein Ereignis im Krankheitsverlauf, jedoch fehlt hier die Signifikanz ( $p= 0,337$ ; {95% CI: 0,046 - 2,875}). Ein Rho-GDI $\beta$ -positiver Status bedeutet im Vergleich zu einem negativen Rho-GDI $\beta$ -Status ein um 1,8-fach erniedrigtes Risiko für ein Ereignis. Dieses Ergebnis ist jedoch statistisch nicht signifikant ( $p= 0,630$ ; {95% CI: 0,049 - 6,213}).



Tabelle 9: Multivariate Analyse (Cox-Regressionsmodell) des CMF-Kollektivs, das fettgedruckte Merkmal wurde mit dem in Klammern stehenden Merkmal verglichen und dessen Effekt statistisch analysiert.

Merkmal	Häufigkeit	hazard ratio	Signifikanz	95,0% Konfidenzintervall
<b>Rho-GDI<math>\beta</math> pos.</b> (vs.Rho-GDI $\beta$ neg.)	13 (vs.39)	0,552	0,630	0,049 - 6,213
<b>Rho-GDI<math>\alpha</math> pos.</b> (vs.Rho-GDI $\alpha$ neg.)	33 (vs. 19)	0,139	0,018	0,027 - 0,716
<b>Nodalstatus pos.</b> (vs.Nodalstatus neg.)	16 (vs. 36)	0,737	0,685	0,169 - 3,218
<b>Grading G3</b> (vs.Grading G1/G2)	28 (vs. 24)	1,253	0,839	0,142 - 11,071
<b>ER-Status pos.</b> (vs.ER-Status neg.)	24 (vs. 28)	0,363	0,337	0,046 - 2,875
<b>PgR-Status pos.</b> (vs.PgR-Status neg.)	18 (vs. 34)	0,410	0,546	0,023 - 7,407
<b>Tumorgröße</b> T2/T3 (vs. T1)	29 (vs. 23)	1,758	0,461	0,392 - 7,881

Eine statistische Signifikanz wurde nur für den Faktor „Rho-GDI $\alpha$ “ erreicht. Ein positiver Proteinlevel von Rho-GDI $\alpha$  bedeutet für CMF-therapierte Patientin eine signifikante Risikoreduktion für ein Krankheitsereignis um den Faktor 7,2 ( $p= 0,018$ ; {95% CI: 0,027-0,716}). Patientinnen aus dem CMF-Kollektiv zeigen, ebenso wie die Patientinnen aus dem Gesamtkollektiv (Tabelle 8), ein deutlich längeres krankheitsfreies Überleben bei hohen Rho-GDI $\alpha$ -Expressionsleveln.

#### 4.8.3 Multivariate Analyse bei verschiedenen Schwellenwerten für Rho-GDI $\beta$ (Gesamtkollektiv)

Für Rho-GDI $\beta$  wurden unterschiedliche Schwellenwerte bei einem IRS von 0, 2, 3, 4, 6 und 8 mittels der multivariaten Analyse auf die Hazard Ratio und statistische Signifikanz hin untersucht. Die betrachteten Schwellenwerte sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Bei der

multivariaten Analyse konnte bei keinem der untersuchten Schwellenwerte die statistische Signifikanz erreicht werden, wenn für die Merkmale „Rho-GDI $\beta$ “, „Rho-GDI $\alpha$ “, „Nodalstatus“, „Grading“, „ER-Status“, „PgR-Status“ und „Tumorgröße“ adjustiert wurde (Tabelle 10). Ich habe mich für den Schwellenwert 0 entschieden, womit alle Tumoren mit einem IRS= 0 in den Analysen als negativ und alle Tumoren ab einem IRS= 1 als positiv gewertet wurden.

Tabelle 10: Ergebnisse für verschiedene Schwellenwerte bei Rho-GDI $\beta$  in der multivariaten Analyse. 1) steht jeweils für eine negative Färbung, 2) für einen positiven Status. Der rot gekennzeichnete Schwellenwert wurde für die Auswertung gewählt.

Cut-off (IRS) 1) neg. 2) pos.	Rho-GDI $\beta$ negativ (N)	Rho-GDI $\beta$ positiv (N)	hazard ratio	Signifikanz	95% CI
<b>1) 0</b> <b>2) 1-12</b>	70	40	0,922	0,875	0,338 - 2,517
1) 0-2 2) 3-12	77	33	0,701	0,548	0,220 - 2,235
1) 0-3 2) 4-12	83	27	0,798	0,735	0,216 - 2,952
1) 0-4 2) 6-12	93	17	0,419	0,412	0,052 - 3,348
1) 0-6 2) 8-12	94	16	0,689	0,733	0,081 - 5,883
1) 0-8 2) 9-12	96	14	0,787	0,826	0,092 - 6,692

#### 4.8.4 Multivariate Analyse bei verschiedenen Schwellenwerten für Rho-GDI $\alpha$ (Gesamtkollektiv)

Für Rho-GDI $\alpha$  wurden verschiedene Schwellenwerte festgelegt und der Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben untersucht. In der Tabelle 11 sind die Ergebnisse der multivariaten Analyse in Bezug auf Rho-GDI $\alpha$  für verschiedene Schwellenwerte zusammengefasst, um die Festlegung des Schwellenwertes zu verdeutlichen. Die Adjustierung erfolgte für die Merkmale „Rho-GDI $\beta$ “, „Rho-GDI $\alpha$ “, „Nodalstatus“, „Grading“, „ER-Status“, „PgR-Status“ und „Tumorgröße“. Zunächst wurde für Rho-GDI $\alpha$  ein Schwellenwert bei 4 gesetzt, ab einem IRS von 6 wurden somit die Tumoren als positiv für Rho-GDI $\alpha$  gewertet. Mit dieser

Verschiebung des Schwellenwertes waren Patientinnen in den Gruppen mit hoher und niedriger Rho-GDI $\alpha$ -Expression nicht mehr gleich verteilt. Dennoch war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant. Wurde hingegen der Schwellenwert bei hoher Expression bei einem IRS von 9 für Rho-GDI $\alpha$  festgelegt (0-9: niedrige Expression), ging die Signifikanz verloren (Tabelle 11). Für alle weiteren Schwellenwerte, die für Rho-GDI $\alpha$  getestet wurden, zeigte sich stets ein signifikanter Effekt. Die p-Werte für diese Schwellenwerte sind in der multivariaten Analyse berechnet worden und in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Übersicht der Ergebnisse der multivariaten Analyse mit unterschiedlichen Schwellenwerten für Rho-GDI $\alpha$ . 1) steht jeweils für eine niedrige Proteinexpression, 2) für eine hohe Expression. Der rot gekennzeichnete Schwellenwert wurde für die Auswertung gewählt.

<b>Cut-off (IRS)</b> 1) niedrig 2) hoch	<b>Rho-GDI<math>\alpha</math> niedrige Expression (N)</b>	<b>Rho-GDI<math>\alpha</math> hohe Expression (N)</b>	<b>hazard ratio</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>95% CI</b>
1) 0-4 2) 6-12	21	89	0,330	0,016	0,134 - 0,812
1) <b>0-6</b> 2) <b>8-12</b>	<b>41</b>	<b>69</b>	<b>0,325</b>	<b>0,011</b>	<b>0,137 - 0,771</b>
1) 0-8 2) 9-12	51	59	0,236	0,004	0,089 - 0,627
1) 0-9 2) 12	79	31	0,324	0,137	0,074 - 1,430

---

## **5 Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der immunhistochemisch gemessenen Expressionsstärke zweier Rho-GDI-Proteine, dem Rho-GDI $\alpha$  und dem Rho-GDI $\beta$ -Protein, im primären invasiven Mammakarzinom und dem Krankheitsverlauf der Patientinnen untersucht. Rho-GDI $\beta$  konnte in Tumorzellen bei 36,8% der untersuchten Proben nachgewiesen werden. In einem anderen Kollektiv von primären Mammakarzinomen, das mittels Westernblotanalyse untersucht wurde, waren ebenfalls knapp 40% der Fälle Rho-GDI $\beta$ -positiv. Eine erhöhte Expression von Rho-GDI $\alpha$  wurde in 61,6% der immunhistochemisch untersuchten Tumoren beobachtet.

### **5.1 Korrelationen von Rho-GDI $\alpha$ und Rho-GDI $\beta$ mit klinisch-pathologischen Parametern**

In der univariaten Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier habe ich die Einflüsse der untersuchten Rho-GDIs auf den Krankheitsverlauf in Subgruppen untersucht. Die Expression der beiden Rho-GDIs wurde nach etablierten Prognosefaktoren stratifiziert.

Rho-GDI $\beta$  korrelierte mit keinem der klinisch-pathologischen Faktoren signifikant (Abb. 11-17). Es konnte jedoch festgestellt werden, dass Patientinnen mit positivem Rho-GDI $\beta$ -Status ein längeres krankheitsfreies Überleben zeigen, wenn der Proteinlevel von Rho-GDI $\alpha$  gleichzeitig niedrig ist (Abb. 16). Eine statistische Signifikanz war nicht vorhanden ( $p=0,178$ ). Eine positiver Status von Rho-GDI $\beta$  hatte einen tendenziell günstigen Effekt auf das krankheitsfreie Überleben (Abb. 11), welcher jedoch nicht signifikant war ( $p=0,149$ ). In einem Subkollektiv von Patientinnen, die eine Chemotherapie nach dem CMF-Schema erhalten haben, konnte im krankheitsfreien Überleben ein tendenziell günstiger Effekt eines Rho-GDI $\beta$ -positiven Status gefunden werden, wobei dieser nicht statistisch signifikant war (Abb. 17).

Ein hoher Proteinlevel von Rho-GDI $\alpha$  korrelierte hingegen signifikant mit einem längeren krankheitsfreien Überleben. Dieser Effekt war stark ausgeprägt, wenn nach den Merkmalen ER-Status, PgR-Status, Grading und Tumorgröße und stratifiziert wurde (Abb. 19-22). Patientinnen mit G3, PgR- oder ER-negativen Tumoren profitierten ebenso wie die mit größeren Tumoren von T2/T3 von einer erhöhten Expression von Rho-GDI $\alpha$ . Patientinnen mit G2-, PgR- oder ER-positiven oder T1-Tumoren hingegen hatten keinen signifikanten

Benefit von Rho-GDI $\alpha$ . Diese Ergebnisse zeigen, dass gerade für Patientinnen mit aggressiveren Tumoren die hohe Expression von Rho-GDI $\alpha$  von Vorteil ist.

In der multivariaten Analyse wurden diese Ergebnisse auf ihre prognostische Aussagekraft und ihre Unabhängigkeit hin überprüft. Die Rho-GDI $\alpha$ -Expressionstärke korreliert signifikant mit dem krankheitsfreien Überleben. Eine starke Expression von Rho-GDI $\alpha$  bedeutet im Vergleich zum niedrigen Proteinlevel ein um den Faktor 3,1 verringertes Risiko, an Brustkrebs wieder zu erkranken oder daran zu sterben ( $p=0,011$ ). Im Vergleich dazu bedeutet ein positiver ER-Status eine Reduzierung des Risikos um den Faktor 4,7 ( $p=0,012$ ). Nach diesen Ergebnissen hat Rho-GDI $\alpha$  einen unabhängigen prognostischen Wert im primären Mammakarzinom, der vergleichbar mit dem des ER-Status ist.

Die Analyse eines Subkollektivs von Patientinnen, welche eine CMF-Chemotherapie bekommen haben, zeigte ebenfalls deutlich, dass die Stärke der Rho-GDI $\alpha$ -Expression einen deutlichen Effekt auf das Überleben hat. Die multivariate Analyse zeigte hier, dass CMF-therapierte mit hohen Proteinleveln im Tumor ein um den Faktor 7,2 niedrigeres Risiko haben, ein Ereignis im Krankheitsverlauf zu erleiden ( $p=0,018$ ).

Rho-GDI-Proteine hemmen die migrationsfördernden Rho-GTPasen. Häufig werden Rho-GTPasen als erhöht in Tumoren verschiedener Ursprungsgewebe beschrieben. In Adenokarzinomen des Pankreas korreliert die Expression von Rho-GTPasen mit der Progression und einer ungünstigen Prognose (Suwa et al., 1998). In Bronchialkarzinomen wird RhoC als ein die Aggressivität des Tumors bestimmender Faktor in Betracht gezogen (Shikada et al., 2003). In Harnblasenkarzinomen sind RhoA und RhoC überexprimiert (Kamai et al., 2003). Im IBC wird RhoC als prokarzinogener Faktor beschrieben (van Golen et al., 2000), RhoA- und RhoB-Überexpression korrelieren mit hohem Tumorgrading (Fritz et al., 2002). Ein Erkrankungsprogress und Metastasierungsgeschehen werden unter anderem durch ein Ungleichgewicht zwischen Rho-GTPasen und ihren Rho-GDIs erklärt (Jiang et al., 2003). Allerdings gibt es auch tumorfördernde Wirkungen von Rho-GDIs, die für Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  jeweils unterschiedlich sein können.

## **5.2 Bedeutung von Rho-GDI $\beta$ beim Mammakarzinom**

Rho-GDI $\beta$  ist von wissenschaftlichem und klinischem Interesse. Dieses Protein wird physiologischerweise nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist dennoch auch in Tumorzellen präsent. Weiterhin ist es bemerkenswert, dass Rho-GDI $\beta$  von dem Onkoprotein Ets1 reguliert wird (Vetter et al., 2005, Schunke et al., 2007), obwohl es aufgrund seiner anti-

migratorischen Wirkung eher als Tumorsuppressorprotein einzustufen ist. Ets1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Karzinomen mit Neovaskularisation und Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen in Zusammenhang gebracht wird (Dittmer, 2003). Hohe Level von Ets1 korrelieren mit einer ungünstigen Prognose z.B. im Brustkrebs (Span et al., 2003). Ebenso ist Rho-GDI $\beta$  in Adenokarzinomen des Ovars stark exprimiert, wohingegen in benignen Kontrollen dieses Protein nicht detektierbar war (Tapper et al., 2000). Zhang et al. konnten in MDA-MB-231-Zelllinien einen eindeutig invasionsfördernden Effekt von Rho-GDI $\beta$  feststellen. Mit derselben Zelllinie konnte unsere Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen Rho-GDI $\beta$  und dem Onkoprotein Cox-2 nachweisen. Cox-2 ist ein bekannter Tumorpromotor beim Mammakarzinom (Ristimäki et al., 2002). Diese Daten stützen die Hypothese, dass Rho-GDI $\beta$  auch Tumorpromotor-Aktivitäten besitzt. Auf der anderen Seite beschreiben Gildea et al. Rho-GDI $\beta$  als Metastasierungssuppressor im Harnblasenkarzinom und sehen in dem Funktionsverlust von Rho-GDI-Proteinen einen entscheidenden Punkt in der Entstehung von invasive Tumoren (2002). Theoderescu et al. konnten ebenfalls ein kürzeres progressionsfreies Überleben beim Harnblasenkarzinom mit niedrigen oder nicht nachweisbaren Rho-GDI $\beta$  Leveln nachweisen. Eine starke Korrelation bestand zwischen dem Verlust von Rho-GDI $\beta$  und höherem Staging der Tumoren. Bei immunsupprimierten Mäusen konnte nach Rho-GDI $\beta$ -Transfektion experimentell eine verminderte Lungenmetastasierung nachgewiesen werden (Gildea et al., 2002).

Diese gegenteiligen Effekte können zum Einen mit den verschiedenen Tumorentitäten erklärt werden. Es lässt sich durchaus vermuten, dass Rho-GDI $\beta$  zweierlei Eigenschaften besitzt, eine tumorfördernde und eine tumorhemmende. Es konnte ihm eindeutig ein migrationshemmender Effekt nachgewiesen werden und ebenso zeigt Rho-GDI $\beta$  durch mehrere progressionsfördernde Begleitfaktoren progressionsförderndes Verhalten in der Genese des Mammakarzinoms. Es ist denkbar, dass sich beide Eigenschaften gegenseitig kompensieren. Dieser Effekt kann eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit kein Effekt durch Rho-GDI $\beta$ -Expression auf den Krankheitsverlauf des Mammakarzinoms festgestellt werden konnte. Ähnliche Ergebnisse konnten auch erzielt werden, wenn Rho-GDI $\beta$ -RNA untersucht wurde (Dario Schunke, Promotion 2008).

### **5.3 Bedeutung von Rho-GDI $\alpha$ beim Mammakarzinom**

Von Rho-GDI $\alpha$  werden konträre Eigenschaften beschrieben: Rho-GDI $\alpha$  korreliert im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom mit einem prognostisch ungünstigen hohen Grading

(Blackhall et al., 2004). In Ovarialkarzinomen wird Rho-GDI $\alpha$  stark exprimiert, wohingegen dieses GDI-Protein in Proben mit einem niedrigmalignen Potential kaum gefunden werden konnte (Jones et al., 2002).

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen konnten hingegen einen positiven Effekt bei hoher Expression beim invasiven Mammakarzinom zeigen. Meine Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Jiang et al. (2003) überein. Niedrige Expressionslevel von Rho-GDI $\alpha$  gingen hier mit einem invasiven Verhalten von Mammakarzinomen und einer ungünstigen Prognose einher. Signifikante Korrelationen sind in der vorliegenden Arbeit in der univariaten Analyse zwischen hohen Expressionsleveln und dem krankheitsfreiem Überleben im Zusammenhang mit ER- und PgR-negativen, T2/T3- und G3-Tumoren festzustellen (Abb: 19-22). In der multivariaten Analyse konnte gezeigt werden, dass Rho-GDI $\alpha$  einen unabhängigen, günstigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Dieser Effekt war ähnlich stark ausgeprägt wie der eines positiven ER-Status, dessen prognostischer und prädiktiver Wert längst erwiesen ist. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Rho-GDI $\alpha$  einen prognostischen Wert im Mammakarzinom hat. Ein kausaler Zusammenhang zwischen hoher Rho-GDI $\alpha$ -Expression und längerem krankheitsfreiem Überleben kann vermutet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den potenziell tumorsupprimierenden Effekt von Rho-GDI $\alpha$ .

Es soll darauf hingewiesen werden, dass von den Patientinnen des gewählten Kollektivs 5,2% eine neoadjuvante und 67,5% eine adjuvante systemische Chemotherapie erhielten. Es ist zu berücksichtigen, dass der Effekt von Rho-GDI $\alpha$  auf den Krankheitsverlauf zum größten Teil unter Einwirkung von Chemotherapien beobachtet wurde. Rho-GDI $\alpha$  wird oft mit Resistenzen gegen Chemotherapeutika in Tumoren verschiedener Entitäten in Verbindung gebracht (Poland et al., 2002). In Zelllinien des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (H157) induzierte Rho-GDI $\alpha$  eine Paclitaxelresistenz, die Apoptose der Zellen unter der Behandlung war deutlich verringert (MacKeigan et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse fanden Zhang et al. bei Mammakarzinom- (MDA-MB-231) und Lymphom-Zelllinien (JLP-119) mit Etoposid- und Doxorubicin- behandelten Zellen. Zhang et al. konnten eine Hemmung der durch Doxorubicin induzierten Apoptose von Mammakarzinomzellen mit hoher Rho-GDI $\alpha$ -Expression zeigen (Zhang et al., 2005). Diese Ergebnisse sprechen für einen negativen Einfluss von Rho-GDI $\alpha$  auf die Progression und die Therapierbarkeit des Mammakarzinoms unter Chemotherapie. Ein möglicher Mechanismus für die Induktion einer Chemoresistenz ist, dass Rho-GDI $\alpha$  die Caspase-vermittelte Spaltung der Rho-GTPase Rac1 verhindert, indem es die Region, in der die Spaltung stattfindet, verdeckt. (Zhang et al., 2005). Rac1 bleibt aktiv und die

---

Apoptose der Zelle findet nicht statt. Eine Spaltung von Rac1 ist notwendig für den programmierten Zelltod (Zhang et al., 2003), um die Bad-Kinase, ein antiapoptotischer Effektor von Rac1, zu deaktivieren (Zhang et al., 2004). Diese Ergebnisse von in vitro-Analysen an Zellkulturen stehen im Widerspruch zu meinen Daten, die aus Untersuchungen anhand klinischer Proben hervorgegangen sind. Diese Diskrepanz könnte u.a. dadurch erklärt werden, dass für die Rho-GTPasen, und dadurch auch für die Rho-GDIs, sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften bekannt sind (Coleman and Olson, 2001; Liu et al., 2001). Des Weiteren könnte es sein, dass in Tumoren im Gegensatz zu isolierten Tumorzellen die proapoptotischen Eigenschaften von Rho-GDI $\alpha$  mehr zum Tragen kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Patientinnen, die eine Chemotherapie nach dem CMF-Schema erhalten haben, separat in Form eines Subkollektivs den statistischen Analysen zugeführt. Meine aus diesen Analysen erhobenen Daten deuten darauf hin, dass eine hohe Expression von Rho-GDI $\alpha$  mit einem günstigeren Verlauf der Krankheit unter Chemotherapie korreliert. Die oft beschriebene Induktion einer Chemoresistenz bei Rho-GDI $\alpha$ -positiven Tumorzellen konnte ich in den Auswertungen nicht erkennen. In dem CMF-Kollektiv hatte eine hohe Expression von Rho-GDI $\alpha$  einen signifikant günstigeren Effekt auf das krankheitsfreie Überleben in der univariaten Analyse (Abb. 24;  $p=0,001$ ). Dieser Effekt erwies sich in der multivariaten Analyse als unabhängig von anderen klinisch-pathologischen Faktoren. Der Einfluss von hohen Rho-GDI $\alpha$ -Leveln auf das krankheitsfreie Überleben wurde auch mittels RT-PCR an einem Tumorkollektiv aus dem Department of Chemical Endocrinology der Radboud University (Nijmegen Medical Centre, Niederlande) untersucht (Ronneburg et al., 2009, eingereicht). Hier profitierten Patientinnen mit einem primären invasiven Mammakarzinom unter CMF-Therapie signifikant von einem hohen Rho-GDI $\alpha$ -RNA-Level ( $p=0,028$ ). Zum Vergleich standen 72 Tumorproben von Patientinnen, die keine adjuvante Therapie erhalten hatten, zur Verfügung. In diesem Subkollektiv hatten Patientinnen mit niedrigen Rho-GDI $\alpha$ -RNA-Leveln einen tendenziellen, wenn auch nicht signifikanten Vorteil ( $p=0,183$ ). Bei Patientinnen, die nur mit einer antihormonellen Therapie behandelt wurden, konnte kein günstiger Einfluss von Rho-GDI $\alpha$  auf den Krankheitsverlauf festgestellt werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Höhe der Rho-GDI $\alpha$ -Expression Aussagen über den Erfolg einer chemotherapeutischen Behandlung beim Mammakarzinom erlaubt und damit einen prädiktiven Faktor darstellt. Es besteht die Möglichkeit, dass Rho-GDI $\alpha$  die Tumorzellen auf die Chemotherapie sensitiviert und den Behandlungsverlauf auf diese Weise günstig beeinflusst.



In den statistischen Analysen des Gesamtkollektivs konnten Zusammenhänge zwischen Rho-GDI $\alpha$  und dem ER-Status gefunden werden: Rho-GDI $\alpha$  ging mit einem signifikant längeren krankheitsfreien Überleben bei negativem ER-Status einher. Bei ER-positiven Tumoren ließ sich kein Effekt erkennen (Abb. 19). Alle Patientinnen mit einem negativen ER-Status erhielten eine Chemotherapie. Der deutlich günstige Effekt von Rho-GDI $\alpha$  lässt wieder eine prädiktive Bedeutung dieses Proteins zu.

In einigen Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen Rho-GTPasen, Rho-GDIs und der Transkription des Estrogenrezeptors beschrieben. Da die Expression des ER eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und der Progression des Mammakarzinoms hat, ist dies von besonderem wissenschaftlichen Interesse. ER $\alpha$  ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor und reguliert Zielgene, welche in die Zellproliferation involviert sind (Su et al., 2000). Es konnte eine von Rho-GDI $\alpha$  ausgehende Regulation auf die Transkription des ER in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt werden (Su et al., 2000). Es wird beschrieben, dass Rho-GDI $\alpha$  die Regulation der ER $\alpha$ -Transkription zum Einen über die Hemmung von Rho-GTPasen, welchen ein hemmender Effekt in der Transkription des ER in MCF-7-Zellen zugeschrieben wird, mit steuert (Su et al., 2000). Zum Anderen kooperiert Rho-GDI $\alpha$  mit GRIP1, einem Transkriptions-Koregulatur und nimmt Einfluss auf die Transkription des ER (Su et al., 2001). In einer anderen Arbeit konnte demonstriert werden, dass Rho-GDI $\alpha$  nicht nur im Zytoplasma sondern auch Kern von MCF-7 Brustkrebs-Zelllinien exprimiert wird, direkt an den ER $\alpha$  bindet und seine Transkriptionsaktivität beeinflusst (Marzouk et al., 2007). Die Arbeiten beschreiben eine von Rho-GDI $\alpha$  ausgehende Induzierung der ER $\alpha$ -Expression. Es ist anzunehmen, dass über diesen Mechanismus die Prognose des Mammakarzinoms teilweise mit beeinflusst werden kann. Ein positiver ER-Status bedeutet eine deutlich bessere Therapierbarkeit der Erkrankung. Die Korrelation zwischen der Rho-GDI $\alpha$ -Expression und dem ER-Status in der Subgruppenanalyse (Abb. 19) erscheint zunächst widersprüchlich. Es ist dennoch möglich, dass Rho-GDI $\alpha$  die Transkription des ER teilweise mitreguliert und bei ER-Negativität einen prognostisch und prädiktiv günstigen Effekt entfaltet.

Bislang sind für Rho-GDI $\alpha$  keine umfassenden Regulationsmechanismen, wie sie für Rho-GDI $\beta$  unter 5.2 aufgezeigt wurden, bekannt. Es ist denkbar, dass auch Rho-GDI $\alpha$  von Onkogenen oder Faktoren mit prokarzinogenen Eigenschaften moduliert wird. Dies könnte ebenfalls ein Erklärungsansatz für die widersprüchlichen Ergebnisse der bislang erfolgten Forschung sein. Es werden noch weitere Studien notwendig sein, um ein tieferes Verständnis für die vermutlich sehr komplexe Regulation von Rho-GDI $\alpha$  zu gewinnen.

## 5.4 Einflüsse der beiden Rho-GDIs aufeinander

In den Auswertungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  Einflüsse aufeinander haben. Wenn beide GDIs hoch exprimiert wurden, ergab sich kein Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben (Abb. 16 und Abb. 23). Wenn ein Rho-GDI einen niedrigen Level im Mammakarzinom aufwies, hatte das entsprechend andere GDI einen positiven Effekt auf das Überleben. Bei Rho-GDI $\beta$ -negativem Status war der Effekt von hohem Rho-GDI $\alpha$ -Leveln signifikant ( $p$ : 0,007; Abb. 23). Eine Möglichkeit wäre, dass Rho-GDI $\alpha$  und  $\beta$  im Tumor ähnliche Hauptfunktionen und gleiche Regulatoren oder Zielproteine haben. Es ist denkbar, dass die beiden Rho-GDIs teilweise Funktionen des jeweils anderen im Tumor übernehmen können.

## 5.5 Schlussbetrachtung und Ausblick

### 5.5.1 Rho-GDI $\alpha$ als potenzieller Biomarker

Bei Patientinnen mit ER-negativen Mammakarzinomen konnte ich einen günstigen Einfluss von Rho-GDI $\alpha$  auf den Krankheitsverlauf feststellen. Hohe Proteinlevel von Rho-GDI $\alpha$  waren signifikant mit einem längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Abb. 18,  $p$ = 0,01). In der univariaten Überlebensanalyse konnte ein günstiger Effekt einer hohen Rho-GDI $\alpha$ -Expression ebenfalls bei Tumoren mit einem Grading von G3 festgestellt werden. Patientinnen mit dem prognostisch ungünstigen G3-Status profitieren signifikant von einer hohen Rho-GDI $\alpha$ -Expression (Abb. 21,  $p$ = 0,01). In der multivariaten Analyse konnte gezeigt werden, dass der Rho-GDI $\alpha$ -Status eine unabhängige Aussagekraft auf den Krankheitsverlauf von Mammakarzinom-Patientinnen besitzt (Tabelle 8).

Rho-GDI $\alpha$  hat sich in meinen Analysen als unabhängiger prognostischer Faktor erwiesen. Der Rho-GDI $\alpha$ -Status hatte in der vorliegenden Arbeit eine vergleichbare Aussagekraft wie der ER-Status, welcher ein etablierter prognostischer- und prädiktiver Faktor ist (Tabelle 8). Die Ergebnisse lassen weiter vermuten, dass die Stärke der Expression von Rho-GDI $\alpha$ -Protein eine Relevanz im Zusammenhang mit Chemotherapien hat. Wie die uni- und die multivariaten Analysen zeigen konnten, hat ein hohes Level von Rho-GDI $\alpha$  einen deutlich positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf von Patientinnen, welche mit einer CMF-Chemotherapie behandelt wurden (Abb. 24, Tabelle 9). Rho-GDI $\alpha$  hat in meinen Analysen somit den Wert eines prädiktiven Faktors. Das Schema der CMF-Chemotherapie war lange Zeit Therapie der Wahl bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom. Heute erhalten die Patientinnen, welche von einer Chemotherapie profitieren, andere Kombinationen. Das CMF-

Schema wurde von Anthrazyklinen (Poole et al., 2006) und Taxanen (AGO, 2007) weitestgehend abgelöst. In dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv von 1999 wurden diese Chemotherapien noch selten durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene prädiktive Relevanz von Rho-GDI $\alpha$  bei CMF-behandelten Patientinnen könnte auch bei der Therapie mit Anthrazyklinen und Taxanen eine Rolle spielen. Für die zukünftige Forschung in Bezug auf Rho-GDI-Proteine stellt dieser Zusammenhang eine interessante und wichtige Fragestellung dar.

Meine Ergebnisse lassen vermuten, dass eine hohe Rho-GDI $\alpha$ -Expression einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf von prognostisch ungünstigen Tumoren und auf den von chemotherapierten Patientinnen hat. In diesem Zusammenhang könnte Rho-GDI $\alpha$  ein potenziell wertvoller Biomarker sein.

## **6 Zusammenfassung**

Rho-GTPasen sind kleine GTPasen, die fundamentale Prozesse in der Zellbiologie regulieren. Unter anderem beeinflussen sie entscheidend die Zellmigration, die Zell-Zell-Adhäsion, die Apoptose und die Transkription. Aufgrund dieser Eigenschaften spielen Rho-GTPasen eine große Rolle in der Entstehung und Progression von Karzinomen. Die Aktivität von Rho-GTPasen wird u.a. durch Rho-GDIs reguliert. Die beiden wichtigen RhoGDIs, Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$ , werden auch in Tumorzellen exprimiert. Der Einfluss von Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  auf das Tumorgeschehen ist abhängig von der Art des Tumors.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinexpression von Rho-GDI $\alpha$  und  $\beta$  in 117 invasiven Mammakarzinomen bestimmt und mit klinisch-pathologischen Parametern und dem Verlauf der Erkrankung in Beziehung gesetzt. 36,8% der untersuchten Tumoren waren nach immunhistochemischer Analyse Rho-GDI $\beta$ -positiv. Eine Westernblotanalyse von 87 Mammakarzinomproben wies die Expression von Rho-GDI $\beta$  in etwa 40% der Fälle nach. Für Rho-GDI $\beta$  konnte keine Korrelation seiner Expression mit dem Status klinisch-pathologischer Faktoren nachgewiesen werden. Ebenso konnte kein Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Patientinnen festgestellt werden. Möglicherweise gleicht sich die potenziell durch Rho-GTPase-Hemmung tumorsupprimierende Wirkung von Rho-GDI $\beta$  mit seiner potenziell tumorfördernden Wirkung aus (Schunke et al., 2007). Obwohl Rho-GDI $\alpha$  und Rho-GDI $\beta$  sich strukturell und funktionell sehr ähnlich sind, ergaben die Untersuchungen für Rho-GDI $\alpha$  im Mammakarzinom andere Ergebnisse. Die starke Expression von Rho-GDI $\alpha$  ist mit einem besseren krankheitsfreien- und Gesamtüberleben verbunden. Insbesondere Patientinnen mit negativen ER- oder PgR-Status, hohem Grading, großer Tumorgroße oder fehlender Rho-GDI $\beta$ -Expression zeigen ein längeres krankheitsfreies Überleben wenn Rho GDI $\alpha$  hoch exprimiert wird. Hingegen hat Rho-GDI $\alpha$  keine signifikante Bedeutung für Patientinnen mit positivem ER- und PgR-Status, niedrigem Grading, kleineren Tumoren oder positivem Rho-GDI $\beta$ -Status. Die Daten zeigen, dass trotz ähnlicher Funktionen der beiden Proteine nur Rho-GDI $\alpha$  als Biomarker klinisch relevant sein könnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rho-GDI $\alpha$  einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von Patientinnen hat, welche mit einer Chemotherapie nach dem CMF-Schema behandelt wurden. Eine hohe Expression von Rho-GDI $\alpha$ -Proteins korreliert deutlich mit einem längeren krankheitsfreien Überleben. Möglicherweise könnte Rho-GDI $\alpha$  auch als prädiktiver Faktor eine Relevanz besitzen.

## **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) 2964–2973.
2. Adamson P., Marshall CJ, Hall A-, Tilbrook PA: Posttranslational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 267 (1992) 20033–20038.
3. Adra CN, Manor D., Ko JL, Zhu S., Horiuchi T., Van Aelst L., Cerione RA, Lim B.: RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 4279–4284.
4. Aghazadeh B., Lowry WE, Huang XY, Rosen MK: Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* 102 (2000) 625–633.
5. Aktories K.: Bacterial toxins that target rho proteins, *J Clin Invest*, 99 (1997) 827-829.
6. Andreasen PA, Kjölller L., Christensen L., Duffy MJ: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer* 72 (1997) 1–22.
7. Alory C. and Balch WE: Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: The functional basis for choroideremia disease. *Traffic* 2 (2001) 532–543.
8. Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie e.V., Kommission Mamma, State of the Art: Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome, Zuckschwerdt Verlag (2007).
9. Arsenian S., Weinhold B., Oelgeschläger M., Rütger U., Nordheim: Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *A.Embo J.* 21 (1998) 6289-99.
10. Aznar S., Fernández-Valerón P., Espina C., Lacal JC: Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy. *Cancer Lett.* 2 (2004) 181-91.
11. Barbacid M.: ras genes. *Annu Rev Biochem.* 56 (1987) 779-827.
12. Bartelink H., Horiot JC, Poortmanns P. et al.: Euroocean Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Breast Cancer Groups. Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med* 345 (2001) 1378-1387.
13. Bässler R., Böcker W., Hermanek P. et al.: Die gegenwärtige Situation des Grading beim Mammakarzinom. *Pathologie* 13 (1992) 130–134.
14. Bässler R.: Histopathologie und aktuelle Klassifikationen des Mammakarzinoms, *Der Onkologe* 4 (1998) 878–895.
15. Bauerfeind I.: Kongressbericht St. Gallen, Brustkrebs Deutschland e.V. (2005)
16. Bauerfeind I., Hims I., Kahlert S., Linke R., Lebeau A., Untch M., Hepp H.: Sentinel-Lymphknoten-Untersuchung beim Mammakarzinom Aktueller Stand, *Der Gynäkologe* 38 (2005) 236–242.
17. Beatson G.: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrive cases. *Lancet* 2 (1896) 104–107.
18. Beckmann M.W., Lux M.P.: Hereditäres Mammakarzinom Prädiktive Diagnostik und präventive Maßnahmen, *Onkologe* 10 (2004) 20–28.
19. Bi F., Debreceni B., Zhu K., Salani B., Eva A., Zheng Y.: Autoinhibition mechanism of proto-Dbl. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 1463–1474.
20. Bishop A. L., Hall A.: Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348 (2000), 241– 255

21. 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.S.: Validating the prognostic value of marker genes derived from a non-small cell lung cancer microarray study. *Lung Cancer* 46 (2004) 197-204.
22. Boettner B., Van Aelst L.: The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* 286 (2002) 155–174.
23. Bonadonna G., Brusamolino E., Valagussa P., Rossi A., Brugnatelli L., Brambilla C., De Lena M., Tancini G., Bajetta E., Musumeci R., Veronesi U.: Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med.* 294 (1976) 405-10.
24. Bourmeyster N., Vignais P.V.: Phosphorylation of Rho GDI stabilizes the RhoA-Rho GDI complex in neutrophil cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218 (1996) 54–60.
25. Bos J.L.: ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49 (1989): 4682-9.
26. Braga V. M., Machesky L.M., Hall A., Hotchin N.: The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* 137 (1997) 1421-1431.
27. Brooks P.C., Clark R.A., Cheresch D.A.: Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264 (1994) 569-71.
28. Buyse M., Loi S., van't Veer L., Viale G., Delorenzi M., Glas A.M., Mahasti d'Assignies S., Bergh J., Lidereau S., Ellis P., Harris A., Bogaerts J., Therasse P., Floore A., Amakrane M., Piette F., Rutgers E., Sotirios C., Cardoso F., Piccart M.J.: Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer, On behalf of the TRANSBIG Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 98, No. 17 (2006) 1183-1192.
29. Caraglia M., Marra M., Leonetti C., Meo G., D'Alessandro A.M., Baldi A., Santini D., Tonini G., Bertieri R., Zuoi G., Budillon A., Abbruzzese A.: R115777 (Zarnestra)/Zoledronic acid (Zometa) cooperation on inhibition of prostate cancer proliferation is paralleled by Erk/Akt inactivation and reduced Bcl-2 and bad phosphorylation. *J Cell Physiol.* 211 (2007) 533-43.
30. Cardoso F., Van't Veer L., Rutgers E., Loi S., Mook S., and Piccart-Gebhart M.J.: Clinical application of the 70-gene profile: The MINDACT Trial. *J Clin Oncol* 26 (2008) 729-735.
31. Carter C.L., Allen C., Henson D.E.: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63 (1989) 181-7.
32. Cattoretti G., Suurmeijer A.J.H.: Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using microwaves: a review. *Adv Anat Pathol* 2 (1995) 2-9.
33. Chen Z., Sun J.Z., Pradines A., Favre G., Adnane J., Sebti S.M.: Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J. Biol. Chem.* 275 (2000): 17974 –17978.
34. Cherfils J. and Chardin P.: GEFs: Structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 306–311.
35. Clark E.A., Golub T.R., Lander E.S., Hynes R.O.: Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature (Lond.)* 406 (2000) 532–535.
36. Clark G.: Prognostic and predictive factors, In: Harris JR, Lippmann ME, Morrow M, Osborne CK (eds) *Diseases of the breast*, 2nd edn. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia pp (2000) 489–514.
37. Clemons M., Goss P.: Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344 (2001) 276–285.

38. Cobleigh A., Vogel C.L., Tripathy D. et al.: Multinational Study of the efficacy and safety of humanized anti-HER-2 monoclonal antibody in women who have HER-overexpressing metastatic Breast Cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17 (1999) 2639–2648.
39. Coleman M.L., Olson M.F.: Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ.* 9 (2002) 493-504.
40. Cooper R.: Combination chemotherapy in hormone resistant breast cancer. *Am Ass Cancer Res* 10 (1969) 15.
41. DerMardirossian C., Rocklin G., Seo J.Y., Bokoch G.M.: Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. *Mol Biol Cell* 17 (2006) 4760–8.
42. DerMardirossian C., Bokoch G.M.: GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15 (2005) 356-63.
43. Ditsch N., Kahlert S., Lenhard M., Kümper C., Bauerfeind I., Untch M.: Immunologische Therapie beim Mammakarzinom, *Onkologe* 12 (2006) 945–954.
44. Dittmer A. and Dittmer. J:  $\beta$ -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27 (2006) 2844–2845.
45. Dittmer J.: The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2 (2003) 29.
46. Dovas A. and Couchman J.R.: RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J.* 390 (2005) 1–9.
47. Dunn G.A.: Mechanisms of fibroblast locomotion in cell adhesion and motility. A.S.G. Curtis and J.D. Pitts, editors. Cambridge University Press, Cambridge (1980) 409–423.
48. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365 (2005) 1687-1717.
49. Easton D.F.: Familial risks of breast cancer. *Breast Cancer Res* 4 (2002) 179–181.
50. El Marzouk S., Schultz-Norton J.R., Likhite V.S., McLeod I.X., Yates J.R. and Nardulli A.M.: Rho GDP dissociation inhibitor  $\alpha$  interacts with estrogen receptor  $\alpha$  and regulates estrogen responsiveness. *J. of Mol. Endocrinology* 39 (2007) 249-259.
51. Elledge R.M., Green S., Ciocca D., Pugh R., Allred D.C., Clark G.M., Hill J., Ravdin P., O'Sullivan J., Martino S., Osborne C.K.: HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 4 (1998) 7-12.
52. Erikson J.W., Cerione R.A., Hart M.J.: Identification of an actin cytoskeletal complex that includes IQGAP and Cdc42 GTPases. *J Biol. Chem.* 272 (1997) 443-47.
53. Etienne-Manneville S., Hall A.: Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106 (2001) 489–98.
54. Fauré J., Dagher M.C.: Interactions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI). *Biochimie* 83 (2001) 409–414.
55. Fisher B., Anderson S., Redmond C.K., Wolmark N., Wickerham D.L., Cronin W.M.: Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 333 (1995) 1456–1461.
56. Freeman J.L., Kreck M.L., Uhlinger D.J., Lambeth J.D.: Ras effector-homologue region on Rac regulates protein associations in the neutrophil respiratory burst oxidase complex. *Biochemistry* 33 (1994) 13431-13435.
57. 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) 635–644.

58. Fukata M., Nakagawa M., Kaibuchi K.: Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Current Opinion in Cell Biology* 15 (2003) 590–597.
59. Fukata M. et al.: Involvement of IQGAP1, an effector of Rac1 and Cdc42 GTPases, in cell–cell dissociation during cell scattering. *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 2165–2183.
60. Fukuhara T., Shimizu K., Kawakatsu T., Fukuyama T., Minami Y. et al.: Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF. *J. Cell Biol.* 166 (2004) 393–405.
61. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends, 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken (2006).
62. Gideon P., John J., Frech M., Lautwein A., Clark R., Scheffler J.E., Wittinghofer A.: Mutational and kinetic analysis of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for fully activity. *Mol Cell Biol* 12 (1992) 2050-2056.
63. 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.
64. Giordano S.H., Buzdar A.U., Smith T.L., Kau S.W., Yang Y., Hortobagyi G.N.: Is breast cancer survival improving? *Cancer* 100 (2004) 44–52.
65. Gomez del Pulgar T., Benitah S.A., Pilar F. Espina V., Espina C. and Lacal J.C.: Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays* 27 (2005) 602-613.
66. Gosser Y.Q. Nomanbhoy T.K., Aghazadeh B., Manor D., Combs C., Cerione R.A., Rosen M.K.: C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* 387 (1997) 814–819.
67. Graeff H., Wilmanns W., Jänicke F., Sauer H., Classen S.: Prognostische und therapierelevante Faktoren beim Mammakarzinom – Ergebnisse einer Konsensus konferenz. *Onkologe* 3 (1997) 409–412.
68. 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) 50121–50130.
69. Hall A.: Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 10 (1994) 31-54.
70. Hall A. and Nobes C.D.: Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355 (2000) 965-970.
71. Harbeck N, Aigner M, Kuschel B, Kiechle M, Mammakarzinom – prognostische und prädiktive Faktoren, *Der Onkologe* (2002), 8: 808-816.
72. Harbeck N., Kates R., Schmitt M.: Clinical relevance of invasion factors uPA and PAI-1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncology* 20 (2002) 1000–1009.
73. Hart M.J., Eva A., Evans T., Aaronson S.A., Cerione R.A.: Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* 354 (1991) 311–314.
74. Hinz M., Krappmann D., Eichten A., Heder A., Scheidereit C., Strauss M.: NF- $\kappa$ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 2690–2698.
75. Hirama T., Koeffler H.P.: Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86 (1995) 841-54.



76. Hoffman G.R., Cerione R.A.: Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett* 513 (2002) 85–91.
77. 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.
78. Hudis C.A.: Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357 (2007) 39–51.
79. Ingram D.A., Hiatt K.m, King A.J., Fisher L., Shivakumar R., Derstine C., Wenning M.J., Diaz B., Travers J.B., Hood A., Marshall M., Williams D.A., Clapp D.W.: : Hyperactivation of p21(Ras) and the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, cooperate to alter the proliferation of neurofibromin-deficient mast cells in vivo and in vitro. *J. Exp. Med.* 194 (2001) 57–69.
80. Jaffe A.B., Hall A.: Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv.Cancer Res.* 84 (2002) 57– 80.
81. Jaffe A.B., Hall A., Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005) 247–69.
82. Jallal H., Valentino M.L., Chen G., Boschelli F., Ali S., Rabbani S.A.: A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 67 (2007) 1580–8.
83. Jänicke F., Prechtel A., Thomssen C.: Randomized adjuvant therapy trial in high-risk lymphnode-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type I. *J Natl Cancer Inst* 93 (2001) 913–920.
84. Jakesz R., Frey M.: *Mammakarzinom: Operative Behandlungskonzepte*, Springer Verlag, Wien (2007).
85. Jauliac S., Lopez-Rodriguez 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.
86. 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.
87. Joberty G., Petersen C., Gao L., Macara I.G.: The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol.* 2 (2000) 531–9.
88. Johnson D.I., Pringle J.R.: Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity, *J Cell Biol.* 111 (1990) 143–52.
89. Jones M.B., Krutzsch H., Shu H., Zhao Y., Liotta L.A., Kohn E.C., Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2 (2002) 76–84.
90. Kamai T., Arai K., Sumi S., Tsujii T., Honda M., Yamanishi T., and Yoshida K.I.: The rho/rho-kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumour. *Br. J. Urol. Int.*, 89 (2002) 449 – 453.
91. Kamai T., Tsujii T., Arai K., Takagi K., Asami H., et al. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 2632–2641.
92. Katzav S.: Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood* 103 (2004) 2443–51.
93. 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.

94. Fernandez-Zapico M.E., Gonzalez-Paz N.C., Weiss E. et al.: Ectopic expression of Vav1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell* 7 (2005) 39–49.
95. Keep N.H., Barnes M., Barsukov I., Badii K., Lian L.Y., Segal A.W., Moody P.C.E., Roberts G.C.K.: A modulator of Rho family G proteins, RhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. *Structure* 5 (1997), 623–633.
96. Kleer C.G., van Golen K.L., Merajver S.D.: Molecular biology of breast cancer metastasis. *Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. Breast Cancer Res* 2 (2000) 423–429.
97. Kozma R., Ahmed S., Best A., Lim L.: The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 1942-1952.
98. Kreienberg R., Volm T., Möbus V., Alt D. (Hrsg.), *Management des Mammakarzinoms*, 2. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg; New York, (2002).
99. Lacour J., Bucalossi P., Cacers E., Jacobelli G., Koszarowski T., Le M., Rumeau-Rouquette C., Veronesi U.: Radical mastectomy versus radical mastectomy plus internal mammary dissection. Five-year results of an international cooperative study. *Cancer* 37 (1976) 206-14.
100. Ladwein M., Rottner K.: On the Rho'd: The regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases. *FEBS Letters* 582 (2008) 2066–2074.
101. Lebeau A., Deimling D., Kaltz C. et al.: HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of Immunohisto chemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 19 (2001) 354-63.
102. Lebowitz P.F., Davide J.P., Prendergast G.C.: Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol.* (1995) 6613-22.
103. Leopold K.A., Recht A., Schnitt S.J., Connolly J.L., Rose M.A., Silver B: Results of conservative surgery and radiation therapy for multiple synchronous cancers of the breast. *Oncol Biol Phys* 16 (1989)11-6.
104. Levine M.N., Bramwell V.H., Pritchard K.L. et al.: Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 16 (1998) 2651-2658.
105. Lin M., van Golen K.L.: Rho-regulatory proteins in breast cancer cell motility and invasion. *Breast Cancer Research and Treatment* 84 (2004) 49–60.
106. Liu A.X., Cerniglia G.J., Bernhard E.J., Prendergast G.C.: RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001): 6192-7.
107. Löhrs B., Bauerfeind I.: *Kongressbericht St. Gallen 2007, Brustkrebs Deutschland e.V.*
108. Look M.P., van Putten W.L.J., Duffy M.J. et al.: Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in 8,377 breast cancer patients. *JNatl Cancer Inst* 94 (2002) 116–128.
109. Macara I.G., Lounsbury K.M., Richards S.A., McKiernan C., Bar-Sagi D.: The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J.* 10 (1996): 625–630.
110. Madaule P., Axel R.: A novel ras-related gene family. *Cell* 41(1985) 31-40.
111. Malliri A., van Es S., Huveneers S., Collard J.: The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesion. *J.Biol.Chem.*27(2004)92-98.

112. Marty M., Cognetti F., Maraninchi D. et al.: Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment the M77001 study group. *J Clin Oncol* 23 (2005) 4265–4274.
113. Mc Guire W.L.: Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (1991) 154-5.
114. Miura Y., Kikuchi A., Musha T., Kuroda S., Yaku H., Sasaki T., Takai Y.: Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 268 (1993) 510–515.
115. Mueller-Decker K., Albert C., Lukanov T., Winde G., Marks F., Furstenberg G.: Cellular localization of cyclooxygenase isoenzymes in Crohn's disease and colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 14 (1999) 212–228.
116. Murray M.J., Cunningham J.M., Parada L.F., Dautry F., Lebowitz P., Weinberg R.A.: The HL-60 transforming sequence: a ras oncogene coexisting with altered myc genes in hematopoietic tumors. *Cell* 33 (1983) 749-57.
117. Nelson J., Bagnato A., Battistini B., Nisen P.: The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 110-6.
118. Nixon A.J., Neuberg D., Hayes D.F., Gelman R., Connolly J.L., Schnitt S., Abner A., Recht A., Vicini F. Harris J.R.: Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I and II breast cancer. *J Clin Oncol* 12 (1994) 888–894.
119. Nobes C.D., Hall A.: Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 144 (1999) 1235-44.
120. Nobes C.D., Hall A.: Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multi molecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell* 81 (1995) 53-62.
121. Noll S, Schaub-Kuhnen S: *Praxis der Immunhistochemie*, Urban und Fischer Verlag, München-Jena, 2000.
122. Olofsson B.: Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* (1999) 11 545–54.
123. Olson M.F., Ashworth A., Hall A.: An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269 (1995) 1270–72.
124. Overbeck A.F., Brtva T.R., Cox A.D., Graham S.M., Huff S.Y., Khosravi-Far R., Quilliam L.A., Soliski P.A., Der C.J.: Guanine nucleotide exchange factors: activators of Ras superfamily proteins. *Mol Reprod Dev* 42 (1995) 468–476.
125. Pandey A., Podtelejnikov A.V., Blagoev B., Bustelo X.R., Mann M., Lodish H.F.: Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 179–184.
126. Paik S., Shak S., Tang G., et al: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351 (2004) 2817-2826.
127. Paik S., Tang G., Shak S., Kim C., Baker J., Kim W., Cronin M., Baehner F.L., Watson D., Bryant J., Costantino J.P., Geyer Jr. C.E., Wickerham D.L. and Wolmark N.: Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, Estrogen Receptor–positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24 (2006) 3726–3734.
128. Perona R., Montaner S., Saniger L., Sanchez-Perez I., Bravo R., Lacal J.C.: Activation of the nuclear factor- $\kappa$  B by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 11 (1997) 463–475.
129. del Peso L., Hernandez-Alcoceba R., Embade N., Carnero A., Esteve P.: Rho proteins induce metastatic properties in vivo. *Oncogene* 15 (1997) 3047 – 3057.

130. Peto R.: Highlights from the early breast cancer trialists' collaborative group (EBCTCG) 2005-2006 worldwide overview. 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 14-17.12, abstract book; Abstract 40 (2006).
131. Poland J., Schadendorf D., Lage H., Schnolzer M., Celis J.E., Sinha P.: Study of therapy resistance in cancer cells with functional proteome analysis. *Clin Chem Lab Med* 40 (2002).
132. Ponder B.A.J.: Cancer genetics. *Nature* 411 (2001) 336–341.
133. Poole C.J., Earl H.M., Hiller L. et al.: Epirubicin and Cyclophosphamide, Metotrexate and Fluorouracil Adjuvant Therapy for Early Breast Cancer. *N Engl J Med* 355 (2006) 1851-1862
134. Qui R.G., Chen J., Kirn D., McCormick F., Symons M.: An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374 (1995) 457–459.
135. Ragaz J., Olivetto I.A., Spinelli J.J. et al.: Locoregional radiation therapy in patients with high-risk breast cancer receiving adjuvant chemotherapy: 20-year results of the British Columbia randomized trial, *J Nat Cancer Inst* 97 (2005) 116-126.
136. Ravdin P.M., Green S., Albain K.S.: Initial report of the SWOG Biological Correlative Study of c-erbB-2 expression as a predictor of outcome in a trial comparing adjuvant CAF with tamoxifen (T) alone. *Proc ASCO* 17(1998) 97a.
137. Reiner A., Reiner G., Spona J. et al.: Histopathologic characterization of human breast cancer with estrogen receptor status. *Cancer* 61 (1988) 1149–1154.
138. Remmele W., Stegner H.E.: Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunreaktiven Scores (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis (ER-ICA) in Mammagewebe. *Pathologe* 8 (1987) 138–140.
139. Revillon F., Bonnetterre J., Peyrat J.P.: Review: ERBB2 Oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34 (1998) 791–808.
140. Ridley A., Hall A.: The Small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70 (1992) 389–399
141. Ridley A.: Molecular switches in metastasis. *Nature (Lond.)* 406 (2000) 466 – 467.
142. 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.
143. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage (2008).
144. Robert Koch Institut und Statistisches Bundesamt, Heft 25: Brustkrebs, Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2005).
145. Romond E.H., Perez E.A., Bryant J. et al.: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable Her2- positive breast cancer; *N Engl J Med* 353 (2005) 1673–1684.
146. Ron D., Zannini M., Lewis M., Wickner R.B., Hunt L.T., Graziani G., Tronick S.R., Aaronson S.A., Eva A.: A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol* 3 (1991) 372–379.
147. Ronneburg H., Span P., Kantelhardt E., Dittmer A., Schunke D., Holzhausen H.-J., Sweep F., Dittmer J., eingereicht 02/2009
148. Rosen P.P.: Rosen's Breast Pathology. Lippincott-Raven, Philadelphia New York (1997)
149. Rückert S., Lenhard M.R., Hasmüller S., Kahlert K., Friese, Bauerfeind I.: Neuigkeiten zur Therapie des Mammakarzinoms Bericht vom 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium 2006, *Gynäkologe* 40 (2007) 295–302.

150. Sachdev P., Zeng L., Wang L.H.: Distinct role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho family GTPases in Vav3- induced cell transformation, cell motility, and morphological changes. *J Biol Chem* 277 (2002) 17638–17648.
151. Sahai E., Marshall C.J.: RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 133-42.
152. Sander E.E., van Delft S., Klooster J.P., Reid T., van der Kammen R.A. et al.: 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.
153. Sarrazin D., Lê M.G., Arriagada R., Contesso G., Fontaine F., Spielmann M., Rochard F., Le Chevalier T., Lacour J.: Ten-year results of a randomized trial comparing a conservative treatment to mastectomy in early breast cancer. *Radiother Oncol.* 14 (1989): 177-84.
154. Sauer H.J.: Manual. Mammakarzinome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 10. Auflage, Zuckschwerdt Verlag, München Wien New York, 2005.
155. Seabra M.C., Wasmeier C.: Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 451–457.
156. Scheffzek K., Ahmadian M.R., Wittinghofer A.: GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site, *TIBS*, 23 (1998) 257-262.
157. 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.
158. 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 USA* 90 (1993) 7568-72.
159. Schmidt A., Hall A.: Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the Switch. *Genes & Development* 16 (2002) 1587–1609.
160. Schön D., Bertz J., Görsch B., Haberland J., Kurth B.M.: Robert Koch-Institut, Berlin Die Dachdokumentation Krebs Gesundheitsschutz 47 (2004) 429–436.
161. 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 –525.
162. Shih C., Padhy L.C., Murray M., Weinberg R.A.: Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts *Nature*; 290 (1981) 261-264.
163. Shikada Y., Yoshino I., Okamoto T., Fukuyama S., Kameyama T.: Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 5282–528
164. Simler N.R., Brenchley P.E., Horrocks A.W., Greaves S.M., Hasleton P.S., Egan J.J.: Angiogenic cytokines in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Thorax* 59 (2004) 581–5.
165. Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S. et al.: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *N Engl J Med* 344 (2001)
166. Small J.V., Anderson K., Rottner K.: Actin and coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Bioscience Reports.* 16 (1996) 351–368.
167. Smith K., Fennelly J.A., Neal D.E., Hall R.R., Harris A.L.: Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer Res.* 49 (1989) 5810 –5815.

168. Schunke D., Span P., Ronneburg H., Dittmer A., Vetter M., Holzhausen H.J., Kantelhardt E., Krenkel S., Mueller 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.
169. 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.
170. Stowers L., Yelon D., Berg L.J., Chant J.: Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related small GTPase Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 5027-5031.
171. Su L. F., Knoblauch R., Garabedian M. J.: Rho GTPases as modulators of the estrogen receptor transcriptional response. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 3231-3237.
172. Su L.F., Wang Z., Garabedian M.J.: Regulation of GRIP1 and CBP coactivator activity by Rho GDI modulates estrogen receptor transcriptional. enhancement. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37037-37044.
173. Subauste M.C., Von Herrath M., Benard V. et al.: Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 9725-9733.
174. Suwa H., Ohshio G., Imamura T., Watanabe G., Arie 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* 177 (1998) 147-152.
175. Takahashi K., Sasaki T., Mammoto A., Takaishi K., Kameyama T. Tsukita, S., Takai Y.: Direct interaction of the RhoGDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 272 (1997) 23371-5.
176. Takaishi K. Sasaki T., Kotani H., Nishioka H., Takai Y.: Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol.* 139 (1997) 1047-59.
177. Tamas P., Solti Z., Buday L.: Membrane-targeting is critical for the phosphorylation of Vav2 by activated EGF receptor. *Cell Signal* 13 (2001) 475-481.
178. Tapper J., Kettunen E., El-Rifai W., Seppälä M., Andersson L.C., Knuutila S.: Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 128 (2001) 1-6.
179. Theodorescu D., Sapinoso L.M., Conaway M.R., Oxford G., Hampton G.M., Frierson Jr. H.F.: Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clinical Cancer Research* 10 (2004) 3800 -3806.
180. Thomas L.: Labor und Diagnose, 6.Aufl., TH-Books, Frankfurt, 2005
181. Thomssen C.: Mammakarzinom – Standards in der Versorgung heute und morgen. *Onkologie* 11 (2005) 265-272.
182. Thomssen C.: Mammakarzinom: Inzidenz und Mortalität in den letzten 25 Jahren: Was haben wir erreicht? *Gynäkologie* 35 (2002) 680-688.
183. Togawa, A., Miyoshi J., Ishizaki H., Tanaka M., Takakura A., Nishioka H., Yoshida H., Doi T., Mizoguchi A., Matsuura N., Niho Y., Nishimune Y., Nishikawa S.I., Takai Y.: Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GD1alpha. *Oncogene* 18 (1999) 5373-5380.
184. Trinkaus J.P.: Cells into Organs: The Forces That Shape the Embryo. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. (1984).
185. UICC: TNM classification of malignant tumours. New York: Wiley-Liss (2002) Vol 6th

186. Untch M., Eidtmann H., du Bois A. et al.: Cardiac safety of trastuzumab in combination with epirubicin and caclophosphamide in women with metastatic breast cancer: results of a phase I trial. *Eur J Cancer* 40 (2004) 988– 997.
187. Untch M., Kahlert S., Thomssen C., Jänicke F.: Prognose- und Prädikтивfaktoren beim Mammakarzinom. *Gynäkologe* 31 (1998) 1067-1074.
188. Van Aelst L., D’Souza-Schorey C.: Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11 (1997) 2295–2322.
189. van Golen K.L., Davies S., Wu Z.F., Wang Y.F., 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* 5 (1999) 2511–2519.
190. van Golen K.L., Wu Z.F., Qiao X.T., Bao L.W., Merajver, S.D.: RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia*, 2 (2000) 418 – 425.
191. 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) 5832–5838.
192. van’t Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M.: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 (2002) 530 – 6.
193. Vega F.M., Ridley A.J.: Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Letters* 582 (2008) 2093–2101
194. Veronesi U., Salvadori B., Luini A. et al.: Breast conservation is a safe method in patients with small cancer of the breast. Longterm results of three randomised trials on 1,973 patients. *Eur J Cancer* 31(1995) 1574–1579.
195. Veronesi U., Salvadori B., Luini A.: Extent of metastatic axillary involvement in 1446 cases of breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 16 (1990) 127–133.
196. 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.
197. Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D. et al.: First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* 61 (2001) 37–42.
198. Wennerberg K. and Der C.J.: Rho-family GTPases: it’s not only Rac and Rho (and I like it) *Journal of Cell Science* 117 (2004) 1301-1312.
199. Westwick J.K., Lambert Q.T., Clark G.J., Symons M., Van Aelst L.,: Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) 1324–35.
200. Wittekind C., Wagner G. (Hrsg), TNM-Klassifikation maligner Tumoren 5.Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1997).
201. Wolff A.C.: Liposomal anthracyclines and new treatment approaches for breast cancer. *Oncologist* 8 (2003) 25–30.
202. Worthylake R.A., Lemoine S., Watson J.M., Burrige K.: RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J. Cell Biol.* 154 (2001) 147–160.
203. Yamamoto M., Marui N., Sakai T., Morii N., Kozaki S.: ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* 8 (1993) 1449–55.
204. Yarden Y.: The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 (2001) 3-8.

205. 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.
206. Yu W., Datta A., Leroy P., O'Brien L.E., Mak G.:  $\beta$  1-integrin orients epithelial polarity via Rac1 and laminin. *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 433–45.
207. 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.
208. 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.
209. 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.
210. Zhang Y., Zhang B.: D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res* 66 (2006) 5592–8.
211. Zhu K., Gerbino E., Beaupre D.M., Mackley P.A., Muro-Cacho C., Beam C., Hamilton A.D., Lichtenheld M.G., Kerr W.G., Dalton W., Alsina M., Sebt S.M.: Farnesyltransferase inhibitor R115777 (Zarnestra, Tipifarnib) synergizes with paclitaxel to induce apoptosis and mitotic arrest and to inhibit tumor growth of multiple myeloma cells. *Blood* 15 (2005) 4759–66.
212. 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) 16248–16256.



## **8 Thesen**

1. Das ursprünglich exklusiv in hämatopoetischen Geweben beschriebene Rho-GDI $\beta$  wird auch in Tumoren exprimiert.
2. Rho-GDI $\beta$  wird in etwa einem Drittel der invasiven Mammakarzinome exprimiert.
3. Die Expression von Rho-GDI $\beta$  korreliert nicht signifikant mit dem Status eines klinisch-pathologischen Parameters.
4. Rho-GDI $\beta$  zeigt keinen Effekt auf das krankheitsfreie Überleben im Mammakarzinom.
5. Das ubiquitär vorkommende Rho-GDI $\alpha$  wird auch in Mammakarzinomzellen exprimiert.
6. Im Gegensatz zu Rho-GDI $\beta$  ist bei hoher Expression von Rho-GDI $\alpha$  das krankheitsfreie Überleben verlängert.
7. Rho-GDI $\alpha$  hat einen unabhängigen prognostischen Wert beim invasiven Mammakarzinom.
8. Rho-GDI $\alpha$  hat einen unabhängigen prädiktiven Wert bei Patientinnen, welche mit einer Chemotherapie nach dem CMF-Schema behandelt wurden.
9. Besonders bei einem negativen ER-Status korreliert ein hohes Expressionslevel von Rho-GDI $\alpha$  mit einem längeren krankheitsfreien Überleben, während das Protein keinen Effekt auf den Krankheitsverlauf bei ER-positiven Mammakarzinomen hat.
10. Hohe Expressionslevel von Rho-GDI $\alpha$  erbringen einen Vorteil in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben in aggressiveren Mammakarzinomen (Grade G3).
11. Der Effekt von Rho-GDI $\alpha$  auf den Krankheitsverlauf ist auch von dem Expressionslevel von Rho-GDI $\beta$  abhängig. Ist letzterer niedrig, ist der Effekt besonders ausgeprägt, ist letzterer hoch, ist kein Effekt zu beobachten.

## Lebenslauf

Name: Henrike Ronneburg  
Geburtsdatum/ -ort: 19.04.1982 in Lüneburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife 2001

### Tabellarischer Lebenslauf:

#### *Schulbildung*

1988 – 1992: Grundschule Deutsch Evern  
1992 – 1994: Orientierungsstufe Stadtmitte, Lüneburg  
1994 – 2001: Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule, Lüneburg

#### *Hochschulstudium:*

2001 – 2008: Studium der Humanmedizin (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)  
Frühjahr 2004: Ärztliche Vorprüfung  
2007 - 2008: Praktisches Jahr:  
1. Abschnitt: St. Elisabeth-Krankenhaus, Halle: Medizinische Klinik II  
2. Abschnitt: BG-Kliniken Bergmannstrost Halle: Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
3. Abschnitt: Universitätsklinikum Halle: Uniklinik und Poliklinik für Gynäkologie  
Herbst 2008: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation

#### *Praktische Tätigkeiten:*

2005-2006: Tätigkeit als studentische Hilfskraft auf der Station für Frührehabilitation, BG Kliniken Bergmannstrost, Halle  
Halle (Saale),

Henrike Ronneburg

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, Henrike Ronneburg, die vorliegende Arbeit „Prognostische Relevanz von Rho-GDP dissociation inhibitor Proteinen beim Mammakarzinom“ selbständig angefertigt zu haben. Von mir genutzte Hilfsmittel und Literatur sind vollständig angegeben.

Halle (Saale),

Henrike Ronneburg

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Henrike Ronneburg, dass die vorliegende Arbeit „Prognostische Relevanz von Rho-GDP dissociation inhibitor Proteinen beim Mammakarzinom“ zur Erlangung des akademischen Doktorgrades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstmalig von mir eingereicht wird. Es liegen keine weiteren Promotionsarbeiten von mir an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder an anderen Universitäten zur Begutachtung vor.

Halle (Saale),

Henrike Ronneburg

## Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert.

### Publikationen in Fachjournalen

„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. C.G.J., Thomssen, C., Dittmer J.,  
Cancer Research, 67 (22), 2007, 10694-702

### Manuskript eingereicht zur Publikation in einem Fachjournal

„Rho GDP dissociation inhibitor  $\alpha$  is a predictive marker for patients with invasive ductal breast cancer”

Henrike Ronneburg, Paul Span, Eva Kantelhardt, Angela Dittmer, Dario Schunke, Hans-Jürgen Holzhausen, Fred C.G.J. Sweep, Jürgen Dittmer

Eingereicht: Februar 2009

### 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

„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

„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

„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.; 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

„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“

Schunke, D.; Span, P.; Ronneburg, H.; Dittmer, A.; Vetter, M.; Holzhausen, H.-J.; Kantelhardt, E.; Krenkel, S.; Müller, V.; Sweep C.G.J.; Thomssen, C. und Dittmer, J. Poster, Herbsttagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., Landesgruppe Sachsen-Anhalt, Magdeburg, 01.12.2007

„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, Eva Kantelhardt, Volkmar Müller, Fred C.G.J. Sweep, Christoph Thomssen, Jürgen Dittmer EBCC-6 (European breast cancer conference) 15-19 April 2008, Berlin

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

Dittmer Jürgen, Schunke Dario, Span Paul, Ronneburg Henrike, Dittmer Angela, Vetter Martina, Holzhausen Hans-Jürgen, Kantelhardt Eva, Krenkel Sylke, Müller Volkmar 4, Sweep Fred C.G.J., Thomssen Christoph, 33th FEBS Federation of European Biochemical Societies Congress and 11th IUBMB International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference, 28. Juni-2. Juli 2008, Athen

### **Eigener Kongressbeitrag**

„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.; 04. - 05. Mai 2007, Dresden

## **Danksagung**

Als Erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer danken, der mir diese Arbeit anvertraut hat. Seine kompetente und unermüdliche Unterstützung hat das Gelingen meiner Doktorarbeit möglich gemacht. Durch sein stets offenes Ohr konnten Unklarheiten und Probleme immer sofort beseitigt werden. Die Arbeit war nicht zuletzt durch die sehr gute und freundliche Atmosphäre im Forschungslabor der Klinik für Gynäkologie immer sehr angenehm und hat Freude bereitet. Er hat mir einen fundierten Einblick in die Forschung ermöglicht, wovon ich sehr profitieren werde. Danke für die schöne und lehrreiche Zeit!

Mein Dank gilt auch Angela Dittmer, die mir immer mit ihrer praktischen Erfahrung weiterhelfen konnte. Sie hat mich stets unterstützt, auch außerhalb des Labors.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen für seine geduldige Hilfe bei der Bewertung der Immunhistochemie.

Ich möchte mich bei Frau Dr. med. Eva Kantelhardt bedanken. Frau Dr. rer. nat. Martina Vetter möchte ich für die Hilfe im Labor danken.

Dank auch an die Doktoranden, die zeitgleich mit mir im Labor an ihren Dissertationen gearbeitet haben, insbesondere Cornelia Willing, Felicitas Kramer und Dario Schunke. Vielen Dank für jede Hilfe und die schöne Laborzeit.

Ich danke meiner lieben Mutter Gertraude Ronneburg. Besonderer Dank gilt meinem Vater Dr. med. dent. Jörg Ronneburg, der mich in wirklich jeder Lebenslage unterstützt und immer für mich da ist. Meiner Schwester Cornelia will ich ebenfalls dafür danken, dass ich mich immer auf sie verlassen kann. Auch möchte ich mich bei der Lebensgefährtin meines Vaters, Frau Dr. med. Inge Bärenklau bedanken.

Ich danke meinen lieben Freunden, insbesondere Sabrina, Dagmar, Titia, Tine, Ina und Franz. Danke für alles, was ihr für mich tut.

Nicht zuletzt möchte ich Cornelius für alles danken. Ich bin sehr froh, dass es Dich gibt!

Mein herzlicher Dank gehört auch allen nicht namentlich erwähnten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.