Aus dem Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin

DISSERTATION

Das humane Y-Box-Protein YB-1 und seine Bedeutung für die Prognose und den Therapieerfolg beim Mammakarzinom

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)
Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
Von Anja Schmidt geboren in Frankfurt / Oder

Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. PD Dr. med. habil Hans-Dieter Royer
2. Prof. Dr. H. Höfler
3. Priv.-Doz. Dr. med. H. Oettle

eingereicht: 21. 05. 2003
Datum der Promotion: 12. 12. 2003

Zusammenfassung

Einer der Gründe für das Scheitern derzeitiger Behandlungsmethoden beim Brustkrebs ist die Resistenz gegenüber der angewandten Chemotherapie. Eine große Rolle bei der Entstehung der Multiplen Medikamentenresistenz spielt das MDR1–Gen und sein Genprodukt, das P-Glykoprotein. Das Y-Box-Protein YB-1 reguliert die Expression des MDR1-Gens; eine Überexpression und nukleäre Lokalisation von YB-1 geht im Brustkrebs mit einer gesteigerten P-Glykoprotein Expression einher.

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben von 83 Brustkrebspatientinnen auf eine YB-1 Überexpression im Tumor und im peritumoralen Epithel untersucht. YB-1 wurde mittels der immunhistochemischen APAAP-Methode an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Brustkrebsgewebeproben nachgewiesen. Die klinische Relevanz der YB-1 Expression wurde untersucht, indem sie mit dem klinischen Verlauf in einem mittleren Beobachtungszeitraum von 61 Monaten und etablierten biologischen Tumorfaktoren wie Lymphknotenstatus, histologisches Grading, Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus, uPA und PAI-1 verglichen wurde.

In der Kohorte der Patientinnen mit einer postoperativen adjuvanten Chemotherapie zeigte sich eine 5-Jahres-Rezidivrate von 68 % bei einer hohen YB-1 Expression im Tumor und eine Rückfallrate von 39 % bei einer niedrigen YB-1 Expression. Unter Beachtung auch der YB-1 Expression im peritumoralen Epithel konnte ein noch größerer Unterschied hinsichtlich der 5-Jahres-Rezidivrate festgestellt werden. Diese betrug bei Patientinnen mit einer hohen YB-1 Expression 66 %, während bei Patientinnen mit einer niedrigen YB-1 Expression im Nachbeobachtungszeitraum kein Rezidiv festgestellt wurde. Bei der Gegenüberstellung der 5-Jahres-Rezidivraten in der Kohorte der Patientinnen ohne Zytostatikatherapie zeigte sich eine Rückfallrate von 30 % bei einer hohen YB-1 Expression und eine Rückfallrate von 0 % bei einer niedrigen YB-1 Expression. Eine hohe YB-1 Expression war demnach in beiden Kohorten mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert. Das Ergebnis in der Gruppe der Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie zeigt, dass YB-1 mit der Tumoraggressivität beim Brustkrebs korreliert. Eine Korrelation zwischen der YB-1 Expression und den etablierten prognostischen Faktoren Lymphknotenstatus, Tumorgröße und histologisches Grading konnte nicht festgestellt werden. Es wurde jedoch eine signifikante negative Korrelation zwischen der YB-1 Expression und dem Hormonrezeptorstatus und eine positive Korrelation zwischen YB-1 und den Faktoren uPA und PAI-1 gefunden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass YB-1 eine klinische Relevanz besitzt mit Hinblick sowohl auf eine prognostische als auch eine prädiktive Bedeutung bei der Identifikation von Hoch-Risiko-Patientinnen im Brustkrebs in Ab- und Anwesenheit einer postoperativen Chemotherapie.

Abstract

Intrinsic or acquired resistance to chemotherapy is one of the reasons for failure of current treatment regimens in breast cancer patients. P-glycoprotein and its gene *mdr1* plays a major role in the development of a multi-drug resistant tumor phenotype. The Y-box protein YB-1 regulates the expression of *mdr1*. In human breast cancer, overexpression and nuclear localization is associated with upregulation of P-glycoprotein.

In this study, tissues of 83 breast cancer patients have been analyzed with regard to YB-1 overexpression in tumor tissue and in surrounding benign breast epithelial cells. YB-1 has been detached by the immunohistochemical APAAP-method using formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues. Clinical relevance of YB-1 expression was analyzed by comparing it with clinical outcome after a median follow-up of 61 months and with tumor biological factors lymph-node status, tumor size, histological grading, hormone-receptor status and the factors uPA and PAI-1.

In patients who received postoperative chemotherapy, the 5-year-relapse rate was 68% in patients with high YB-1 expression in tumor cells and 39% in patients with low expression. With regard to YB-1 expression in surrounding benign breast epithelial cells, the 5-year-relapse rate was 66% in patients with high YB-1 expression whereas in patients with low expression no relapse has been observed so far. YB-1 thus indicates clinical drug resistance in breast cancer. In patients who

received no chemotherapy, the 5-year-relapse rate was 30% in patients with high YB-1 expression whereas in patients with low YB-1 expression no relapse occurred. YB-1 thus correlates with breast cancer aggressiveness. In both groups high YB-1 expression was associated with poor clinical outcome. A correlation between YB-1 and tumor biological factors lymph-node status, tumor size and histological grading has not been found. But a significant negative correlation has been observed between YB-1 and hormone-receptor status and a positive correlation between YB-1 and uPA and PAI-1.

This dissertation could show the clinical relevance of YB-1 with regard to a prognostic and predictive significance by identifying a high-risk group of breast cancer patients both in presence and absence of postoperative chemotherapy.

Schlagwörter:

YB-1, Y-Box-Proteine, Zytostatikaresistenz, Brustkrebs, Tumoraggressivität, Prognose

Keywords:

YB-1, Y-box proteins, drug-resistance, breast cancer, tumor aggressiveness, prognosis

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	8
1.1	Y-Box-Proteine	8
1.1.1	Struktur der prokaryontischen Y-Box-Proteine	8
1.1.2	Struktur der eukaryontischen Y-Box-Proteine	9
1.1.3	Y-Box-Proteine in Pflanzen und Pilzen	9
1.1.4	Funktion von Y-Box-Proteinen	10
1.2	Multidrug-Resistenz	11
1.2.1	Die atypische Multidrug-Resistenz	12
1.2.2	Die non-P-Glykoprotein-assoziierte Multidrug-Resistenz	12
1.2.3	Der klassische Phänotyp der Multidrug-Resistenz	13
1.2.4	Regulation der Transkription des MDR1-Gens	13
1.3	YB-1 als Marker für Prognose und Therapieerfolg beim Brustkrebs	14
1.4	Zielstellung der Arbeit	15
2	Materialien	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Antikörper	18
2.3	Kits	18
2.4	Filmmaterialien	18
2.5	Technische Geräte	18
2.6	Tumorgewebe	18
3	Methoden	20
3.1	Immunhistochemischer Nachweis von YB-1	20
3.1.1	Prinzip des immunhistochemischen APAAP-Nachweises	20
3.1.2	Reagenzien für den Nachweis mit der APAAP-Methode	21
3.1.3	Der immunhistochemische Nachweis von YB-1	21
3.2	Tumoreigenschaften	23
3.3	Immunhistochemische Bewertung der YB-1 Expression	23
3.4	Statistik	23
4	Ergebnisse	25
4.1	YB-1 Überexpression in Tumorgewebe und benignem Epithel	25
4.2	YB-1 Überexpression führt zu klinischer Medikamenten-Resistenz	26
4.3	YB-1 Überexpression bestimmt Tumor-Aggressivität	29
4.4	YB-1 Lokalisation ohne Einfluss auf Therapieerfolg	29

4.5 YB-1 korreliert mit Hormonrezeptorstatus und Tumorfaktoren 32
5 Diskussion 34
5.1 Medikamenten-Resistenz durch YB-1 Überexpression 34
5.2 YB-1 assoziiert mit Phänotyp größerer Malignität 35
5.3 Korrelation von YB-1 Expression mit etablierten Parametern 37
5.4 Einfluss der YB-1 Lokalisation auf dessen prognostische Bedeutung 38
5.5 Klinischer Ausblick 39
6 Literaturverzeichnis 41

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP–binding cassette–Transporter
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	breast cancer resistance protein
B.subtilis	Bacillus subtilis
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
chkYB-1	chicken YB-1
CspA	cold shock protein A
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluoruracil
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRE-1	downstream regulatory element 1
E.coli	Escherichia coli
FRGY1	frog Y-Box protein 1
GRP 2	glycine-rich protein 2
HTLV-I	human T-cell lymphotropic virus type I
kD	Kilo-Dalton
MDR	Multidrug Resistenz
MDR1	multiple drug resistance gene 1
MHC-II	major histocompatibility complex class II
MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
mRNA	messenger RNA
MRP	multidrug resistance–associated protein
NSEP1	nuclease-sensitive element protein 1
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
P-gp	P-Glykoprotein
RNA	Ribonucleinsäure
RNP	ribonucleoprotein particle
RSV	Rous-Sarcoma-Virus
RSV-EF-II	Rous sarcoma virus enhancer factor-II
unr	upstream of N-ras

uPA	urokinase-type plasminogen activator
X. laevis	Xenopus laevis

1 Einführung

Der Brustkrebs stellt eine der häufigsten Todesursachen bei Frauen in der heutigen Zeit dar. Im Allgemeinen wird er chirurgisch reseziert oder es wird eine radikale Mastektomie zur Tumorentfernung vorgenommen. In Abhängigkeit von Risikofaktoren wird in vielen Fällen weiterhin mit einer adjuvanten postoperativen Chemotherapie behandelt. Diese Therapie findet jedoch nicht in allen Fällen ein zufriedenstellendes Ansprechen. Einige Tumoren sind von Beginn an resistent gegen die angewendeten Zytostatika, während andere nach einem anfänglichen Ansprechen der Therapie im späteren Verlauf eine Resistenz entwickeln. Man nennt dieses Phänomen die Multidrug Resistenz. Dem humanen Y-Box-Protein YB-1 wird bei der Regulierung und Entwicklung der Multidrug Resistenz eine Rolle zugeschrieben. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die YB-1 Expression im Mammakarzinom Aussagen über den klinischen Verlauf der Erkrankung erlaubt. Dafür wird in der Einführung ein Überblick über die Familie der Y-Box-Proteine, deren Aufbau, Gemeinsamkeiten und Funktionen, und über das Phänomen der Multiplen Medikamentenresistenz mit seinen verschiedenen Phänotypen und Regulations-mechanismen gegeben.

1.1 Y-Box-Proteine

Y-Box-Proteine stellen eine Gruppe von Proteinen mit gemeinsamem Strukturmotiv dar. Es handelt sich dabei um eine Nukleinsäure-bindende Domäne, die während der Evolution von Prokaryonten sehr gut erhalten geblieben ist, und die man sowohl in Bakterien, Pflanzen und Tieren finden kann. Es wurde beobachtet, dass die in Bakterien gefundenen Y-Box-Proteine durch Kälteschock induzierbar sind. Die Kälteschock-Antwort erfolgt, wenn man exponentiell wachsende Zellen abrupt von 37°C auf 10°C abkühlt. Die Zellen reagieren mit einer über 100fach gesteigerten Synthese ihrer Y-Box-Proteine (z.B. CS7.4 von E. coli) bei gleichzeitig stark reduzierter allgemeiner Transkription und Translation. Aufgrund dieser Eigenschaft gab man den Y-Box-Proteinen von Bakterien auch den Namen der Kälteschock-Proteine (cold shock proteins).

Die ersten Mitglieder der Y-Box-Proteinfamilie wurden in eukaryonten Zellen gefunden und zeigten in vitro eine Bindung an ein doppelsträngiges Transkriptions-Regulations-Element, welches als Y-Box bekannt war. Daher bekam die Familie den Namen Y-Box-Proteine. Inzwischen wurde gezeigt, dass Y-Box-Proteine ebenfalls an Einzelstrang-DNA und RNA binden können. Diese Beobachtungen führten zu einer Reihe von Aufgaben und Funktionen, die dieser Familie zugeschrieben werden. Mitglieder der Y-Box-Proteinfamilie können als Transkriptionsaktivatoren und -repressoren, Chromatin-Modifikations-Proteine, DNA-Reparatur-Proteine, selektive Translationsrepressoren und RNA-Verpackungs-Proteine wirken.

Vergleicht man die Struktur verschiedener Y-Box-Proteine, so kann man feststellen, dass sich ein bestimmter Teil überall finden lässt, die Kälteschock-Domäne. Bakterien besitzen nur diese eine Kälteschock-Domäne. In eukaryontischen Y-Box-Proteinen sind zusätzliche Domänen zu finden. Ein ungewöhnliches Y-Box-Protein von Säugetieren, das unr, besteht zum Beispiel aus fünf aufeinander folgenden Kälteschock-Domänen. Es stellt damit das Protein mit der am höchsten konservierten Anzahl an Kälteschock-Domänen dar. Die am häufigsten beschriebene eukaryontische Form von Y-Box-Proteinen besteht aus einer einzigen Kälteschock-Domäne, die mit einer Serie von typischerweise vier sich abwechselnden basischen und sauren Regionen gekoppelt ist. Zu den so aufgebauten Y-Box-Proteinen zählen das humane YB-1, das MSY1 der Maus und die beiden Xenopus-Proteine FRGY1 und FRGY2. Das humane NSEP1 (nuclease-sensitive element protein) und das RBYa von Ratten weisen eine andere Anordnung der geladenen Regionen auf. Das Y-Box-Protein der Pflanzen, das GRP2, besteht aus einer Kälteschock-Domäne, die mit einer Glycin-reichen Domäne verbunden ist.

1.1.1 Struktur der prokaryontischen Y-Box-Proteine

Kälte-Schock-Domänen sind verantwortlich für die spezifische Bindung eines cis-Elements, welches Y-Box genannt wird, an die DNA (Schnuchel et al., 1993). Die Kälte-Schock-Proteine von Escherichia coli (CspA bzw. CS7.4) und Bacillus subtilis (CspB) zeigen eine 43 %ige Übereinstimmung ihrer Sequenz mit der Nukleinsäure–bindenden Domäne von eukaryontischen Y-

Box-Faktoren. Es wurde mittels NMR-Spektroskopie (Newkirk et al., 1994; Schnuchel et al., 1993) und Röntgenkristallographie (Schindelin et al., 1993; Schindelin et al., 1994) herausgefunden, dass die beiden wichtigsten Kälte-Schock-Proteine von E.coli (CspA) und B.subtilis (CspB) in ihrer Struktur weitgehend übereinstimmen. 5 antiparallel angeordnete β-Stränge bilden eine geschlossene β-Röhre. Ein weiteres 3-strängiges β-Faltblatt enthält das RNA-bindende Motiv RNP1 und ein Motiv, welches dem RNP2 ähnlich ist, und besitzt auf seiner Oberfläche zahlreiche basische und aromatische Reste, die als Bindungsstellen für Einzelstrang-DNA dienen. Wie Landsman 1992 feststellen konnte, besitzen die Familie der RNA-bindenden Proteine und die Familie jener Proteine, die Kälte-Schock-Domänen enthalten, ein identisches RNP1-Motiv.

1.1.2 Struktur der eukaryontischen Y-Box-Proteine

Eine hervorzuhebende Eigenschaft von Y-Box-Proteinen ist deren Erhaltung durch die Evolution. Die zentrale Nukleinsäure-bindende Domäne der Wirbeltierproteine ist zu 43 % identisch mit dem Kälteschock-Protein (CS7.4 bzw. CspA) von Escherichia coli.

Die eukaryontischen Y-Box-Proteine wurden anfangs durch ihre Interaktion mit Doppelstrang-DNA, welche die Sequenz CCAAT enthält, charakterisiert. Vergleiche der Aminosäuresequenz verschiedener Y-Box-Proteine zeigten eine über 90 %ige Übereinstimmung in einer Region von 78 Aminosäuren, die als Nukleinsäure-Erkennungsregion der Proteine angesehen wird (Tafuri und Wolffe, 1992).

Das humane Protein YB-1 zeigte eine relative Spezifität für Doppelstrang-DNA mit der Sequenz CTGATTGG(C/T)(C/T)AA, welche als Y-Box bekannt ist (Didier et al., 1988). Diese Sequenz enthält eine reverse CCAAT-Box (oben unterstrichen), die man in Transkriptions-Kontroll-Regionen einer Reihe von eukaryontischen Genen finden kann. So zum Beispiel in den Major-Histocompatibility-Complex-Class II (MHC II)-Genen von Säugetieren, den Gameten-spezifischen Genen von Wirbeltieren und dem MDR1-Gen des Menschen (Dorn et al., 1987; Wolffe et al., 1992; Goldsmith et al., 1993).

Eukaryontische Y-Box-Proteine sind aus drei verschiedenen Domänen aufgebaut: ein variabler N-Terminus, eine hochkonservierte zentrale Nukleinsäure-bindende Domäne (die Kälteschock-Domäne) und ein hydrophiles C-terminales Ende. Die Enddomäne besteht aus alternierenden Regionen, in denen jeweils basische oder saure Aminosäuren vorherrschen. Jede dieser Regionen enthält ungefähr 30 Aminosäuren (Wolffe, 1994). Die sauren Regionen formen eine α-Helix (Tafuri und Wolffe, 1992), wohingegen die basischen Regionen eine wenig organisierte Struktur aufweisen. Sie sind jedoch reich an Phenylalanin- und Tyrosinresten und werden daher auch basisch / aromatische (B/A) Inseln genannt (Murray et al., 1992). Die Phenylalanin- und Tyrosinreste ermöglichen einen engen Kontakt zu RNA-Basen (Ladomery und Sommerville, 1994). Die basischen Regionen sind weiterhin reich an Arginin, Glutamin und Prolin und ähneln den Protaminen (Tafuri und Wolffe, 1990; Wolffe et al., 1992). Sie kommen in Gruppen vor, so dass extensive Wechselwirkungen mit negativ geladenen Zucker-Phosphat-Molekülen verhindert werden können. Diese Domäne enthält außerdem einige potentielle Stellen für eine Phosphorylierung durch die Kaseinkinase II.

In einigen Versuchen wurde durch Deletion nachgewiesen, dass für die Erkennung von Einzelstrang-DNA, Doppelstrang-DNA und von RNA allein die zentrale Kälteschock-Domäne benötigt wird (Tafuri und Wolffe, 1992; Kolluri et al., 1992). Das C-terminale Ende stabilisiert Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren und vermittelt Interaktionen zwischen Proteinen.

1.1.3 Y-Box-Proteine in Pflanzen und Pilzen

In Saccharomyces cerevisiae wurden einige Kälteschock-induzierbare Gene gefunden (Kondo und Inouye, 1991). Unter diesen befindet sich ein an Glycin und Arginin reiches Protein, das ebenfalls einige RNA-bindende Motive, eingeschlossen das RNP1, enthält. Dieses Protein, welches als NSR1 bezeichnet wird, spielt eine Rolle beim Aufbau der Prä-rRNA in Hefezellen (Kondo + Inouye, 1991; Kondo et al., 1992).

Gleichartige Glycin-reiche Proteine, die eine Homologie zu RNA-bindenden Proteinen aufweisen und ein RNP1-Motiv besitzen, wurden in Pflanzen beschrieben (van Nocker + Vierstra, 1993). Aber auch Proteine mit einer Homologie zu Y-Box-Proteinen wurden in Pflanzen gefunden. Sie bestehen, wie alle Y-Box-Proteine, aus einer Kälteschock-Domäne. Diese ist jedoch an eine Glycin-reiche Domäne gekoppelt, welche außerdem Serin-, Arginin- und Tyrosinreste enthält. Sie sind also ebenfalls reich an Glycin (de Oliviera et al., 1990; Obokata et al., 1991) und wurden deshalb GRP (glycine-rich proteins) genannt. Wahrscheinlich spielen auch diese Y-Box-Proteine eine Rolle im RNA-Metabolismus. Interessant ist auf jeden Fall die Tatsache, dass einige Pflanzenproteine, die Glycin-reiche Domänen enthalten, durch Umweltstress, wie zum Beispiel Verletzungen, induziert werden können (van Nocker und Vierstra, 1993).

1.1.4 Funktion von Y-Box-Proteinen

Eukaryontische Y-Box-Proteine können spezifisch sowohl an Einzelstrang-DNA als auch an Doppelstrang-DNA binden. Dabei konnte für das YB-1 der Säugetiere festgestellt werden, dass es bei seiner spezifischen Bindung an den DRA-Promotor des MHC-Klasse-II-Gens einzelsträngige Bereiche den doppelsträngigen vorzieht (Mac Donald et al., 1995). Für viele Y-Box-Faktoren konnte eine hohe Spezifität bei der Bindung an die sogenannte Y-Box, eine inverse CCAAT-Box, nachgewiesen werden, so z.B. für FRGY1 und FRGY2 aus X. laevis oder für YB-1.

Für einige andere Y-Box-Faktoren wurden andere Spezifitäten im Bindungsverhalten entdeckt. Das RSV-EF-II z.B., ein Y-Box-Faktor, der an die Enhancer-Region des Rous-Sarcoma-Virus bindet, bindet selektiv an eine einzelsträngige Oktamer-DNA-Sequenz, welche 5'-GTACCACC-3' lautet. Er bindet jedoch nicht an die inverse CCAAT-Box, die sich ebenfalls im RSV finden lässt (Claevinger et al., 1996).

Die im Bindungsverhalten von NSEP-1 bevorzugte Sequenz zeigt eine starke Asymmetrie zwischen Purin- und Pyrimidin-reichen DNA-Strängen. Diese asymmetrische Struktur kann man im Promotor des c-myc-Gens finden. Sie ist in der Lage, eine komplexe H-DNA-Struktur zu bilden, die sowohl H-y3 als auch H-y5 enthält und daher als "tandem H-DNA" bezeichnet wird (Firulli et al., 1992).

Im Gegensatz zum NSEP-1 bevorzugt der Y-Box-Faktor von Hühnern, chkYB-1, in seiner Bindung Pyrimidin-reiche DNA-Stränge, ohne dass dabei die Anwesenheit einer Y-Box eine Rolle spielt (Grant et al., 1993).

Bei der Expression von Genen gibt es grundsätzlich zwei Ebenen, an denen regulatorische Mechanismen ansetzen können. Zum einen handelt es sich dabei um die Transkription von DNA zu RNA und zum anderen um die Translation der gebildeten mRNA in Proteine. Die Transkription findet im Kern statt, während die Translation im Zytoplasma abläuft. Kontrollmechanismen während der Transkription beruhen auf der Tatsache, dass die Rekrutierung von RNA-Polymerasen mit unterschiedlicher Effizienz vonstatten geht, je nachdem, wie die DNA-Regulations-Elemente im Chromatin verpackt sind und welche Transkriptionsfaktoren gebunden haben. Unter der großen Vielfalt von Transkriptionsfaktoren lassen sich auch die Y-Box-Proteine finden. Y-Box-Proteine können die Transkription sowohl stimulieren als auch hemmen. So wurde festgestellt, dass im Promotor des hsp70-Gens in X. laevis eine Y-Box für die Expression in Oozyten essentiell ist. Ein Y-Box-bindender Transkriptionsfaktor interagiert mit einem Hitzeschock-Transkriptionsfaktor, woraufhin die Affinität von letzterem für den Promotor, und damit auch die Transkription, steigt (Bienz, 1986).

YB-1 wurde als ein negativer regulierender Faktor bei der Transkription von MHC-II-Genen beschrieben. Es unterdrückt die durch γ–Interferon induzierte Transkription von diesen Genen, indem es einzelsträngige Regionen innerhalb des Promotors bindet bzw. die Ausbildung von DNA-Einzelstrang-Strukturen fördert. Die so entstehende offene DNA-Struktur verhindert die Bindung anderer, positiv regulierender, Transkriptionsfaktoren (Didier et al., 1988; Ting et al., 1994; Mac Donald et al., 1995).

Es ist bekannt, dass das MDR1-Gen eine Y-Box enthält, welche für seine Expression essentiell ist. Dem Y-Box-Protein YB-1 konnte auch bei diesem Gen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Transkription zugeschrieben werden (Goldsmith et al., 1993; Asakuno et al., 1994;

Bargou et al., 1997).

Auch in Viren konnte eine transkriptionelle Kontrolle durch Y-Box-Proteine festgestellt werden. Im HTLV-I z.B. findet sich ein Element, das "downstream regulatory element" (DRE-1) genannt wird und für die basale Transkription des Virus benötigt wird. Es wurde ein Protein gefunden, das spezifisch an das DRE-1 bindet und das zunächst als p37 bezeichnet wurde. Tatsächlich handelt es sich bei p37 um YB-1, welches die basale HTLV-I-Transkription in T-Lymphozyten stark erhöht (Kashanchi et al., 1994). Auch beim humanen neurotropen JC-Polyoma-Virus spielt das YB-1 eine Rolle in der Transkriptionsregulation. YB-1 steigert die Transkription, indem es die Affinität von p65 für die NF-kappa-B-Region, einen Bestandteil der Transkriptions-Kontroll-Region des Virus, erhöht (Raj et al., 1996). Beim Humanen Papillomavirus (HPV) Typ 18 wurden ebenfalls Interaktionen zwischen YB-1 und der Enhancerregion des Virus beobachtet (Spitkovskii et al., 1993).

YB-1 spielt eine Rolle bei der Reaktion auf verschiedene Stressreize. Es scheint die Zellen vor den zytotoxischen Effekten von bestimmten Medikamenten, wie Cisplatin und Mitomycin C, sowie von UV-Strahlung zu schützen. Dabei fungiert der Transkriptionsfaktor als ein Erkennungsprotein für geschädigte DNA und spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur und bei der zellulären Antwort auf die DNA-Schädigung (Ohga et al., 1996; Ise et al., 1999). Für diese Funktion spricht auch die Tatsache, dass YB-1, welches sich hauptsächlich im Zytoplasma finden lässt, bei Einwirkung von UV-Strahlung in den Kern befördert wird (Koike et al., 1997).

Da die der nukleären Transkription der DNA folgende Translation der mRNA im Zytoplasma stattfindet, muss ihr ein Transport der gebildeten mRNAs aus dem Kern in das Zytoplasma vorausgehen. Es wird vermutet, dass dieser selektive mRNA-Export zwei Phasen aufweist. Zum einen die Freisetzung von messenger-Ribonukleoprotein-Partikeln (mRNP) aus speziellen nukleären Ankern und zum anderen die Bindung an spezielle Bestandteile, die sich in den Kernporen befinden (Maquat, 1991). Der Export von mRNA aus dem Nukleus wird von spezifischen Faktoren gesteuert. Sofort nachdem die mRNPs im Zytoplasma angelangt sind, wird die RNA auf die Ribosomen verteilt, wo die Translation stattfindet. Hier setzt die Kontrolle der Translation an. Die mRNA bleibt in Ribonukleoprotein-Partikeln verpackt, wobei einige der nukleären Proteine, die mit der mRNA zu einem Komplex zusammengefügt sind, durch zytoplasmatische Proteine ersetzt werden (Pinol-Roma + Dreyfuss, 1992). Die am meisten vorkommenden Proteine in den mRNPs sind Y-Box-Proteine. Bei in vitro-Experimenten konnte festgestellt werden, dass Y-Box-Proteine die Translation unterdrücken, wenn sie in großen Mengen an mRNA gebunden werden (Richter + Smith, 1984; Minich + Ovchinikov, 1992; Minich et al., 1993).

Am besten konnten die Translations-Regulations-Vorgänge bisher in der frühen Entwicklungsphase des Xenopus laevis erforscht werden. In den Oozyten von X. laevis wird mütterliche mRNA in zytoplasmatischen mRNPs gebunden. In diesen Partikeln ist die mRNA maskiert, d.h. sie ist translationsinaktiv. Erst nach der Befruchtung werden spezielle Teile der mRNA aktiviert und dem Prozess der Translation zugeführt (Tafuri und Wolffe, 1993). Die Hauptrolle bei der Verpackung der mRNA spielen Y-Box-Proteine. Es ist möglich, dass sie der RNA gleichsam als "Histone" dienen. Das FRGY2 wird in X. laevis in großer Anzahl zusammen mit der mRNA in den mRNPs gefunden. Die Expression von FRGY2 fördert die selektive Unterdrückung der Translation der mRNA (Ranjan et al., 1993; Bouvet und Wolffe, 1994). FRGY2 übt seinen Einfluss auf die Translation aus, indem es in der Lage ist, spezielle RNA-Sequenzen zu erkennen. Dazu benötigt es die den Y-Box-Proteinen eigene Kälteschock-Domäne. Erleichtert wird die RNA-Bindung durch die N- bzw. C-terminalen Domänen, welche die zentrale Kälteschock-Domäne flankieren (Bouvet et al., 1995).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Y-Box-Proteine eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen, wobei sie sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation wirken können.

1.2 Multidrug-Resistenz

Ein großes Problem bei der Behandlung von Malignomen, so auch von Brustkrebs, stellt deren Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika dar. Dieses Phänomen wird als Multidrug Resistenz (MDR) bezeichnet. Die Tumoren können von Beginn an ein Ansprechen auf die

Chemotherapie vermissen lassen oder auch erst im Laufe der Therapie eine Resistenz entwickeln.

Im folgenden sollen generelle molekulare Mechanismen, die der MDR zugrunde liegen können, sowie die drei bis jetzt näher charakterisierten Phänotypen der MDR näher beschrieben werden. Zu ihnen zählen die atypische MDR, die non P-Glykoprotein (P-gp)-assoziierte-MDR und die klassische, P-Glykoprotein-assoziierte MDR.

1.2.1 Die atypische Multidrug-Resistenz

Es werden verschiedene Mechanismen unter dem Begriff der atypischen MDR zusammengefasst. Zum einen ist die atypische MDR assoziiert mit quantitativen und qualitativen Veränderungen der Topoisomerase II. Dies ist ein Kern-Enzym, welches aktiv an den letalen Vorgängen von zytotoxischen Medikamenten teilnimmt. DNA–Topoisomerasen wirken mit bei verschiedenen Schritten des DNA–Metabolismus, wie z.B. bei bestimmten genetischen Rekombinationen, bei der DNA–Transkription und bei der Chromosomentrennung. Sie sind ein Angriffsziel für verschiedene Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Mitoxantron und VP16. Die Veränderungen führen zu einer verminderten Expression des wirksamen Enzyms. Diese Tatsache ist assoziiert mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Harris und Hochhauser, 1992).

Die atypische MDR kann auch assoziiert sein mit einer gesteigerten Aktivität von Glutathion und Glutathion-Transferasen. Letztere sind Enzyme, die Glutathion mit chemisch reaktiven Gruppen, basischen, sauren oder neutralen, konjugieren. Es wurde gezeigt, dass die Konjugation von Anthrazyklinen mit Glutathion den Eintritt der Therapeutika in den Kern verhindert. Dadurch werden deren zytotoxische Effekte verringert und eine verstärkte Aktivität des Glutathion-Systems kann zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika im Brustkrebs beitragen (Serafino et al., 1998).

Ein weiterer Mechanismus, der unter dem Begriff der atypischen MDR zusammengefasst wird, beruht auf einer gesteigerten DNA–Reparatur. Defekte DNA–Reparaturmechanismen können ein prädisponierender Faktor für die Entstehung zum Beispiel von Brustkrebs sein. Gesteigerte Reparaturmechanismen jedoch werden verantwortlich gemacht für die Resistenz zum Beispiel gegenüber Cisplatin. Es gibt einige Gene, die durch DNA–Schäden, wie sie durch Chemotherapeutika hervorgerufen werden, induziert werden und zu einer gesteigerten Aktivität der DNA–Reparatur führen (Harris und Hochhauser, 1992).

Als ein Mechanismus der atypischen MDR gilt auch die sog. Medikamenten–Aktivierung. Einige Chemotherapeutika, wie Mitomycin C, Cyclophosphamid und VP16 müssen erst aktiviert werden, um ihre Wirkung zu entfalten. In einigen resistenten Tumoren wurden verringerte Mengen an Cytochrom p450–Reduktase gefunden, was eine verringerte Aktivierung der Therapeutika zur Folge hat. So gelten die erniedrigten Mengen der Reduktase als assoziiert mit einer Resistenz gegenüber Mitomycin C (Harris und Hochhauser, 1992).

1.2.2 Die non-P-Glykoprotein-assoziierte Multidrug-Resistenz

Die nicht mit P-Glykoprotein assoziierte (non-Pgp) MDR beruht, ebenso wie die klassische, P-gp-assoziierte MDR auf einer Aktivierung von membrangebundenen Transportproteinen. Der non-Pgp Phänotyp wird verursacht durch die Überexpression des „multidrug resistance-associated protein“ (MRP)-Gens. Dieses kodiert für ein 190 kD membrangebundenes Glykoprotein, welches, wie das P-gp, der „ATP-binding cassette“ (ABC)–Superfamilie der Transportsysteme angehört. Das Glykoprotein arbeitet wahrscheinlich mit einer direkten Entfernung der Chemotherapeutika aus der Zelle und / oder mit einer Verbesserung der Sequestration der Medikamente in intrazelluläre Kompartimente. Dies führt zu einer Verringerung der wirksamen intrazellulären Konzentration der Medikamente und somit zu einer Verringerung ihrer zytotoxischen Effekte (Nooter und Stoter, 1996).

Ein weiteres Transporterprotein, welches nicht identisch ist mit P-gp oder MRP, wurde in Mitoxantron-resistenten Zelllinien entdeckt. Dieses Protein, das als „breast cancer resistance protein“ (BCRP) bezeichnet wird, ist ebenfalls ein „ATP-binding cassette“ (ABC) Transporter, der assoziiert ist mit der Resistenz gegenüber Mitoxantron und Anthrazyklinen. Eine Überexpression von BCRP mRNA wird häufig in gegenüber Chemotherapeutika resistenten Zelllinien beobachtet,

so dass von einer Bedeutung dieses Proteins in der Entwicklung von Resistenzen bei Brustkrebs ausgegangen werden muss (Ross et al., 1999).

1.2.3 Der klassische Phänotyp der Multidrug-Resistenz

Der klassische Phänotyp der MDR basiert auf der Expression des „multidrug resistance 1"–Gens (MDR1). MDR1 kodiert für ein membrangebundenes Transporterprotein der Superfamilie der ABC-Transporter, das P-Glykoprotein. P-Glykoprotein ist ein 170 kD Protein, welches zwei ATP-bindende Kassetten besitzt. Es ist in der Lage, Substanzen mit hydrophoben Regionen aus der Zelle zu schleusen. Dadurch führt es zu einer verringerten zellulären Akkumulation von vielen in der Tumorbehandlung eingesetzten Chemotherapeutika. Verschiedene Modelle für den Arbeitsmechanismus des Multidrug–Transporters (P-gp) werden diskutiert. Am Anfang wurde die Therapeutika–Resistenz als Folge einer Reduktion der Permeabilität der Plasmamembran für verschiedene Therapeutika gedeutet (Kasahara et al., 1991). Später wurde allein die Aktivität des P-gp als eine Ausstrom–Pumpe als Ursache für eine verringerte intrazelluläre Medikamenten–Anhäufung gesehen (Gottesman + Pastan, 1988a; Gottesman und Pastan, 1988b). Heute wird diskutiert, dass der Multidrug–Transporter beides kann, sowohl den Einstrom der Medikamente in das Zytosol reduzieren als auch deren Ausstrom steigern (Amada et al., 1995; Hamada et al., 1994). Das derzeitige Modell besitzt zwei Grundzüge. Zum einen werden die Medikamente erkannt, wenn sie in die Plasmamembran eindringen und werden im Sinne eines „hydrophoben Staubsaugers" ausgestoßen. Dieser Effekt ist die Ursache für den erniedrigten Wirkstoffspiegel im Zytosol. Zum anderen erfolgt der Transport nur durch einen einzigen Kanal im Transporter (Gottesman und Pastan, 1993). P-gp transportiert jedoch nicht alle beliebigen Chemotherapeutika. Eine Voraussetzung für den Transport von Medikamenten durch P-gp ist deren relative Hydrophobie (Zamora et al., 1988; Nogae et al., 1989). P-Glykoprotein verrichtet seine Arbeit ATP-abhängig. Es ist bekannt, dass beide ATP-bindende Kassetten zur Entfaltung der vollen Effizienz der Transporteraktivität benötigt werden (Azzaria et al., 1989), und dass die Medikamente selbst die ATPase–Aktivität stimulieren (Sarkadi et al., 1992; Ambudkar et al., 1992).

MDR1 wird in vielen normalen Geweben exprimiert. So lässt seine Lokalisation in Hirn-, Hoden- und Plazentagewebe auf eine mögliche Barriere-Funktion von P-Glykoprotein schließen, die verhindern soll, dass sich toxische Stoffe in diesen Geweben anreichern.

Die höchste Expression von P-gp wird in solchen Tumoren gefunden, die von jenen Geweben abstammen, die normalerweise das MDR1-Gen exprimieren. Dies sind Tumoren der Leber, des Darmes, der Nieren, des Pankreas (Goldstein et al., 1989). Diese Tumoren zeigen klinisch eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Entsprechende Chemotherapeutika sind Anthrazykline, Vincaalkaloide, Epipodophyllotoxine und Taxane (Gottesmann und Pastan, 1993). Andere Tumoren, wie zum Beispiel der Brustkrebs, die von einem Gewebe abstammen, das normalerweise kein P-gp exprimiert, zeigen eine geringere Expression von MDR1 in einem variablen Prozentsatz der Fälle. So ist in 30 % der primären Brustkrebsfälle eine P-gp-Überexpression zu finden (Sanfilippo et al, 1991). Oft sind diese Tumoren anfangs sensibel gegenüber der Chemotherapie, werden jedoch im Laufe der Behandlung resistent gegenüber den Therapeutika. In 60 bis 70 % des metastatischen Brustkrebses konnten demnach auch erhöhte Expressionen des P-gp nachgewiesen werden (Verelle et al., 1991; Schneider et al., 1994; Lehnert, 1998). Dies führte zu der Vermutung, dass P-gp und somit die MDR einen prognostischen Marker in diesen Tumoren darstellt (Bradley und Ling, 1994). Allerdings wird diese Vermutung auch sehr kontrovers diskutiert, so dass der prognostische Stellenwert des P-gp von anderen Seiten noch sehr in Frage gestellt wird (Kaye, 1997). Es ist möglich, dass in Tumoren, die nicht natürlicherweise P-gp exprimieren, die Expression von MDR1 erhöht wird als die Konsequenz eines Phänotyps größerer Malignität bzw. durch die Induktion von P-gp als Folge einer Chemotherapie. Zumindest im Brustkrebs wurde eine positive Korrelation zwischen P-gp-Expression und einem Phänotyp größerer Malignität gefunden (Linn et al., 1996).

1.2.4 Regulation der Transkription des MDR1-Gens

Das MDR1–Gen ist in seiner Expression stress-induzierbar. Es wird durch Hitzeschock, Schwermetalle (Chin et al., 1990a), zytotoxische Medikamente (Chin et al., 1990b), Karzinogene,

Onkogene sowie Tumor-Suppressor-Gene (Chin et al., 1992) und einen Defekt in der regulierenden Untereinheit von cAMP–abhängigen Proteinkinasen (Abraham et al., 1990) reguliert.

Ein stromaufwärts (upstream) und ein stromabwärts (downstream) gerichteter Promotor regulieren das MDR1-Gen (Gottesman und Pastan, 1993). Der stromabwärts gerichtete Promotor wird in Medikamenten–selektierten Zellen aktiviert. Er wird stimuliert durch Produkte des c-Ha-Ras Onkogens und des mutierten p53 Tumor-Suppressor-Gens. Diese Genprodukte sind ihrerseits assoziiert mit Tumor-Progression (Chin et al., 1992). Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, dass die Expression des MDR1–Gens assoziiert ist mit der Aktivierung von Onkogenen und / oder dem Verlust an Funktionen von Tumor-Suppressor-Genen während der Tumorentstehung. Inzwischen ist deutlich geworden, dass an der Regulierung des MDR1-Gens ebenfalls nukleäre Faktoren beteiligt sind (Kohno et al., 1994). Ein solcher regulierender Transkriptionsfaktor ist z.B. MDR-NF1, das, wie mit Hilfe von Sequenz–Analysen festgestellt werden konnte, dem YB-1 entspricht.

Der stromabwärts gerichtete Promotor des MDR1–Gens besitzt kein TATA–Element, aber neben einer Reihe von Erkennungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren eine Y-Box, welche für die basale Expression des humanen MDR1–Gens in Gewebekulturen notwendig ist (Goldsmith et al., 1993). Analysen zeigten, dass eine Region zwischen den Nukleotid–Positionen –85 und –70 die Sequenz CTGATTGGCT enthält, welche mit der Sequenz der Y-Box übereinstimmt. Eine Mutation dieser Sequenz zu CTGAGTGGCT hatte zur Folge, dass Proteine nicht mehr gebunden werden konnten, und eine Deletion der Y-Box–Region führte zu einer merklich reduzierten Expression von MDR–Promotor / CAT–Konstrukten. Diese Tatsache weist auf eine mögliche Beteiligung von Y-Box–Proteinen an der Regulation des MDR1–Gens hin (Goldsmith et al., 1993; Asakuno et al., 1994).

Bargou et al. untersuchten 1997 eine mögliche Beteiligung von YB-1 an der Regulation der intrinsischen MDR1-Genexpression. Mit immunzytochemischen Methoden wurden Medikamenten-sensitive MCF-7 Brustkrebszellen und Multidrug-resistente MCF-7 Brustkrebszellen, die in der Anwesenheit von Doxorubicin entstanden sind, auf eine YB-1 und P-Glykoprotein Expression untersucht. Die sensitiven Zellen exprimierten kein P-gp, und YB-1 zeigte sich nur im Zytoplasma. Eine Behandlung dieser Zellen mit Doxorubicin hatte den Zelltod zur Folge. Die resistenten Zellen hingegen exprimierten P-gp und wiesen eine YB-1 Lokalisation ebenfalls im Nukleus auf. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die nukleäre YB-1 Lokalisation als Folge der Doxorubicin-Behandlung auftrat und dass YB-1 in die Regulation der MDR1-Genexpression eingreift. Mit immunhistochemischen Methoden wurden weiterhin 27 unbehandelte Gewebsproben primärer Mammakarzinome dahingehend untersucht, ob es eine Korrelation gibt zwischen der YB-1 Expression und der P-Glykoprotein Expression. In allen 27 Proben wurde im Zytoplasma eine YB-1 Überexpression gefunden. In 9 von den 27 konnte eine P-gp Expression festgestellt werden. In diesen 9 Proben war YB-1 im Nukleus zu finden. Bemerkenswert war diese Feststellung insofern als dass jene Proben, bei denen YB-1 nur im Zytoplasma zu finden war, keine P-gp Expression aufwiesen. Somit konnte zusammenfassend die Vermutung aufgestellt werden, dass eine erhöhte und nukleäre YB-1 Expression funktionell mit der P-gp Expression und der MDR1-Genexpression im Brustkrebs verbunden ist, und dass YB-1 daher einen potentiellen molekularen Mechanismus für die Entstehung der Multiplen Medikamentenresistenz in diesen Tumoren darstellt.

1.3 YB-1 als Marker für Prognose und Therapieerfolg beim Brustkrebs

Es wurden schon einige Marker als aussagekräftig im Hinblick auf die Prognose und den Therapieerfolg beim Brustkrebs angesehen. Das Multidrug Resistenz–assoziierte Protein (MRP) wird als ein Marker für eine schlechte Prognose bei Patientinnen mit Brustkrebs diskutiert (Ito et al., 1998). Weiterhin wurde herausgefunden, dass die nukleäre Anhäufung des mutierten Tumor-Suppressor-Gens p53 oft gleichzeitig stattfindet mit der Expression von P-Glykoprotein. Diese gleichzeitige Expression von p53 und P-gp ist assoziiert mit einer kürzeren Überlebenszeit von Patientinnen mit klinisch fortgeschrittenem Brustkrebs (Linn et al., 1996). Die Expression des MDR1-Gens und dessen Genprodukts, des P-Glykoproteins, ist ebenfalls von Interesse im Hinblick auf Prognose und Therapieerfolg bei Patientinnen mit Brustkrebs. Die Bedeutung des P-gp als ein prognostischer Marker im Brustkrebs wird kontrovers diskutiert. Die Expression des P-gp variiert und ist mit einer Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika und mit einer kürzeren progressionsfreien Überlebenszeit verbunden (Verelle et al., 1991). Damit wird vermutet, dass das

MDR1 im Brustkrebs einen negativen prognostischen Marker darstellt (Bradley und Ling, 1994), was von anderer Seite (Kaye, 1997) jedoch sehr stark hinterfragt wird. Auch scheint eine positive Korrelation zu bestehen zwischen der P-gp-Expression und einem Phänotyp, der mit einer höheren Malignität einhergeht (Linn et al., 1996). Jedoch lässt die P-gp-Expression keine Aussagen über das Ansprechen einer Chemotherapie zu (Linn et al., 1997) und sie stellt keinen unabhängigen prognostischen Marker für die (krankheitsfreie) Überlebenszeit dar (Honkoop et al., 1998). Wie oben erwähnt, wurde nachgewiesen, dass YB-1 bei der Transkription des MDR1-Gens eine entscheidende Rolle spielt (Bargou et al., 1997). Aufgrund dieser Korrelation zwischen einer nukleären Lokalisation von YB-1 und der Expression von P-gp in Brustkrebszellen, liegt die Vermutung nahe, dass die nukleäre Lokalisation von YB-1 ein Marker für den klinischen Verlauf bei Patientinnen mit Brustkrebs sein könnte. Diese Überlegung wird dadurch unterstützt, dass festgestellt werden konnte, dass die nukleäre Expression von YB-1 im Ovarialkarzinom als ein prognostischer Marker angesehen werden kann und die Sensitivität von Ovarialkarzinomen auf Chemotherapie widerspiegelt (Kamura et al., 1999). Die Aufklärung des prognostischen und / oder prädiktiven Wertes von YB-1 im Brustkrebs ist die Hauptfrage dieser Arbeit und ist von großem Interesse und klinischer Bedeutung in der Therapie des Brustkrebses.

1.4 Zielstellung der Arbeit

1. YB-1, ein humanes Y-Box-bindendes Protein, ist ein Nukleinsäure-bindendes Protein, das die Genexpression auf DNA– und RNA-Ebene beeinflussen kann. Es fungiert als ein Transkriptionsfaktor.

1997 konnten Bargou et al. feststellen, dass in MCF-7 Brustkrebszellen eine nukleäre YB-1 Lokalisation als Folge einer Doxorubicin-Behandlung auftrat, und dass diese Zellen resistent waren gegen Doxorubicin, wohingegen Zellen, die nur eine zytoplasmatische YB-1 Lokalisation aufweisen, sensitiv waren für Doxorubicin. Eine Rolle der nukleären YB-1 Lokalisation wurde daher diskutiert. Bargou et al. untersuchten ebenfalls, ob es eine Korrelation gibt zwischen der YB-1 Expression und der Expression von P-Glykoprotein in primären unbehandelten Mammakarzinomen. Dabei konnte in allen Gewebsproben eine YB-1 Überexpression gefunden werden. In ca. 30 % der Fälle konnte eine P-gp Expression festgestellt werden. Genau diese Proben wiesen eine nukleäre YB-1 Lokalisation auf, während Proben mit zytoplasmatischer Lokalisation von YB-1 eine P-gp Expression vermissen ließen. Somit lag die Vermutung nahe, dass YB-1 einen Einfluss auf die MDR-1 Genexpression und damit auf die P-gp Expression hat und über diesen Einfluss die Entstehung einer Multiplen Medikamentenresistenz begünstigt.

Das Interesse galt daher auch in der vorliegenden Arbeit der Verteilung von nukleärer und zytoplasmatischer YB-1 Lokalisation und der Frage inwiefern die Lokalisation einen Einfluss hat auf die Ausübung der Funktionen von YB-1 und damit auf einen möglichen prognostischen und prädiktiven Aussagewert des Proteins.

2. Eine Beteiligung von YB-1 an der Regulation der Expression des MDR1–Gens wurde in verschiedenen Veröffentlichungen nachgewiesen. MDR1 und sein Genprodukt, das P-Glykoprotein, scheinen aufgrund ihrer Assoziation mit einer Multidrug–Resistenz negative prognostische Marker für den Brustkrebs darzustellen (Verrelle et al., 1991; Bradley und Ling 1994). Es konnte festgestellt werden, dass eine positive Korrelation besteht zwischen der P-Glykoprotein–Expression und der Ausprägung eines Phänotyps höherer Malignität (Linn et al., 1996). Daraus ergibt sich die entscheidende Zielstellung, herauszufinden, ob eine Korrelation besteht zwischen der Expression von YB-1 in primären Brustkrebsgeweben und der Prognose der Patientinnen mit Blick auf ein Ansprechen auf die Chemotherapie, das rezidivfreie Intervall oder die Überlebenszeit. Die Tatsache, dass nachgewiesen werden konnte, dass im Ovarialkarzinom tatsächlich eine Korrelation besteht zwischen der nukleären YB-1 Expression und der Länge des krankheitsfreien Intervalls bzw. der Sensitivität gegenüber einer Chemotherapie (Kamura et al., 1999), unterstützt das entscheidende Ziel dieser Arbeit, nämlich die Aufklärung des prognostischen Wertes von YB-1 im Mamma-Karzinom und die Fragestellung, ob auch YB-1 mit einem Phänotyp höherer Malignität assoziiert ist. Von großer klinischer Bedeutung ist die Frage, ob YB-1 einen Marker für den klinischen Verlauf, die Tumoraggressivität oder das Ansprechen auf eine Zytostatikatherapie beim Mammakarzinom darstellt, der es erlaubt, Risikostratifizierungen durchzuführen.

Die Frage nach dem prognostischen Wert von YB-1 im Brustkrebs spielt insofern eine große Rolle als dass die Inhibierung des Transkriptionsfaktors eine Alternative zur pharmakologischen Blockade des P-Glykoproteins in der Behandlung der Multidrug–Resistenz spielen könnte.

3. Weiterhin gilt das Interesse dieser Arbeit der Frage, ob es Korrelationen gibt zwischen der Expression des YB-1 Proteins und etablierten histomorphologischen Parametern wie Lymphknotenstatus, Tumorgröße, histologisches Grading und Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron. Außerdem stellt sich die Frage nach einer möglichen Assoziation von YB-1 mit den biologischen Faktoren uPA (urokinase-type plasminogen activator) und PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), die als Komponenten des Plasminogen-Aktivierungssystems eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen spielen und als unabhängige prognostische Faktoren im Mammakarzinom gelten (Grondahl-Hansen et al., 1997; Knoop et al., 1998; Harbeck et al., 2000; Foekens et al., 2000; Jänicke et al., 2001).

Da noch nicht bekannt ist, in wiefern YB-1 eine klinische Relevanz besitzt, sollte in dieser Arbeit geklärt werden, welchen Einfluß eine YB-1 Expression, verglichen mit Faktoren, die zur Zeit für klinische Risikoklassifizierung genutzt werden, auf den klinischen Verlauf von Brustkrebspatientinnen ausübt.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Aldrich Chemie, Deutschland

Neufuchsin

Fluka

Natriumnitrit

Naphthol-As-Bi-Phosphat

GibcoBRL Life Technologies, Paisley, Großbritannien

RPMI 1640 Medium

Hoechst AG, Frankfurt a.M., Deutschland

Mowiol

Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

Immersionsöl

C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Ethanol

Roti-Phenol

Roti-Purent

Salzsäure

tri-Natriumzitrat-dihydrat

Serva

Natriumazid

RPMI

Sigma, St. Louis, USA

ACS Reagent

BSA

Levamisol

Natriumchlorid

N, N-Dimethylformamid

Tris

Tris / HCl

2.2 Antikörper

DAKO A/S, Glostrup, Dänemark

Anti-Kaninchen-Immunglobulin (Maus, monoklonal)

Anti-Maus-Immunglobulin (Kaninchen)

2.3 Kits

DAKO A/S, Glostrup, Dänemark

APAAP (Maus, monoklonal)

2.4 Filmmaterialien

Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA

Elite 400 (Farbdiafilm)

2.5 Technische Geräte

Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA

32 pH-Meßgerät

Heidolph, Deutschland

Polymax 2040 (Schüttler)

Millipore Corp., Bedford, USA

Reinstwasseranlage

2.6 Tumorgewebe

Die Untersuchungsmaterialien, welche im Rahmen einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit von der Frauenklinik der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt wurden, waren Gewebsschnitte von 83 Patientinnen, die zwischen 1987 und 1996 in dieser Frauenklinik wegen Brustkrebs behandelt wurden. Alle Patientinnen wurden entweder einer modifizierten radikalen Mastektomie oder einer Brust-erhaltenden Operation mit anschließender Bestrahlung unterzogen. Jede Patientin hatte vor der Operation ihre schriftliche Einwilligung zur wissenschaftlichen Untersuchung des Tumorgewebes erteilt. Eine Entscheidung über die Art der Behandlung wurde aufgrund klinischer und etablierter histomorphologischer Parameter, wozu der Lymphknoten-Status, die Tumorgröße, das histologische Grading und der Steroid-Rezeptor-Status gehören, gefällt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Tumoreigenschaften

Tumoreigenschaften		Patientinnen gesamt (n = 83)	Patientinnen mit postop. Chemotherapie (n = 41)	Patientinnen ohne postop. Chemotherapie(n = 42)
Menopausaler Status	pre / peri	30 (37 %)	14 (35 %)	16 (38 %)
	post	52 (63 %)	26 (65 %)	26 (62 %)
Lymphknotenstatus	N 0	45 (55 %)	5 (12 %)	40 (98 %)
	N +	37 (45 %)	36 (88 %)	1 (2 %)
Tumorgröße	≤ 2 cm	30 (38 %)	12 (32 %)	18 (44 %)
	> 2 cm	48 (62 %)	25 (68 %)	23 (56 %)
Hormonrezeptorstatus	postiv	67 (81 %)	30 (73 %)	37 (88 %)
	negativ	16 (19 %)	11 (27 %)	5 (12 %)
Östrogenrezeptorstatus	positiv	56 (76 %)	27 (66 %)	29 (88 %)
	negativ	18 (24 %)	14 (34 %)	4 (12 %)
Progesteronrezeptorstatus	positiv	51 (69 %)	23 (56 %)	28 (85 %)
	negativ	23 (31 %)	18 (44 %)	5 (15 %)
Histologisches Grading	G 1 / 2	43 (52 %)	12 (29 %)	31 (74 %)
	G 3 / 4	39 (48 %)	28 (71 %)	11 (26 %)

41 der 83 Patientinnen wurden nach der Operation mit Chemotherapie behandelt. 88% dieser Patientinnen wies einen positiven Lymphknotenbefall auf. Die Medikation war wie folgt verteilt: 34 der 41 Chemotherapie-Patientinnen wurden mit Anthrazyclin-enthaltenden Medikamenten behandelt, 4 erhielten CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluoruracil) und 3 eine andere Medikation.

13 der 83 Patientinnen erhielten sowohl eine Chemo- als auch eine Hormontherapie im Anschluss an die Operation. 5 Patientinnen wurden nur mit Tamoxifen im Rahmen einer postoperativen Hormontherapie behandelt. 42 Patientinnen, von welchen 95 % einen negativen Lymphknotenbefall aufwiesen, wurden nicht mit postoperativer Chemotherapie behandelt.

Zur Zeit der Operation betrug das mittlere Alter der Patientinnen 54 Jahre, wobei die Spanne von 31 bis 82 Jahren reichte. Nach der Operation wurden in regelmäßigen Abständen Nachfolgeuntersuchungen durchgeführt (Harbeck et al., 1999b). Die durchschnittliche Zeit, während der die Patientinnen nach der Operation zu regelmäßigen Zeitpunkten untersucht wurden, betrug 61 Monate, mit einer Spanne von 1 bis 139 Monaten. Nach der Operation trat innerhalb der Untersuchungszeit bei 22 Patientinnen (27 %) ein Rezidiv auf und 13 Patientinnen (16%) verstarben.

3 Methoden

3.1 Immunhistochemischer Nachweis von YB-1

Die Tumorgewebeproben wurden mittels Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Das in der Arbeit untersuchte Antigen YB-1 wurde mit Hilfe immunhistochemischer Methoden nachgewiesen. Dabei wurde nach den gängigen Protokollen des Nachweises mittels Alkalischer-Phosphatase-Anti-Alkalischer-Phosphatase verfahren.

3.1.1 Prinzip des immunhistochemischen APAAP-Nachweises

1970 entwickelte Sternberger den immunhistochemischen Nachweis mittels Peroxidase-Anti-Peroxidase, dessen Methode als Vorbild für die heutigen immunhistochemischen Nachweise dient. Bei der direkten Methode können im Gewebe liegende Antikörper oder Antigene direkt nachgewiesen werden. Bei der indirekten Methode, zu der auch der Nachweis mit Alkalischer-Phosphatase-Anti-Alkalischer-Phosphatase gehört, wird das entsprechende nachzuweisende Antigen mit einem Primärantikörper, einem Sekundärantikörper und erst dann mit einer Markersubstanz inkubiert (Abbildung 1). Durch diese verschiedenen "Etagen" von Antikörpern wird eine Verstärkung des Signals erreicht, da die Bindungsstellen für die Markersubstanz vervielfacht werden. Dadurch können auch geringe Mengen an Antigenen nachgewiesen werden.

Bei fixierten Gewebsschnitten muss vor der Inkubation mit den Antikörpern die Fixierung entfernt werden. Danach wird mit der absteigenden Alkoholreihe gespült, was zu einer besseren Penetration der Antikörper führen soll. Die Lösung der Antikörper in Rinderserum soll dafür sorgen, dass nicht-spezifische antigene Bestandteile des Gewebes blockiert werden.

Der Primärantikörper wird gewonnen, indem man das entsprechende (humane) Antigen in ein Tier injiziert. Somit erhält man einen tierischen Antikörper gegen das humane Antigen. Im Fall des YB-1 Nachweises mit der APAAP- Methode wurde der Primärantikörper von einem Kaninchen gebildet. Der Sekundärantikörper soll die Brücke bilden zwischen dem Primärantikörper und dem APAAP-Komplex. Der Sekundärantikörper ist ein IgG-Antikörper, der gegen die konstante Region des Primärantikörpers gerichtet ist. Folglich muss er einen anderen tierischen Ursprung aufweisen. Im Fall des YB-1 Nachweises stammt der Sekundärantikörper aus der Maus und richtet sich mit einem Fab gegen den Kaninchen-Primärantikörper und mit dem anderen Fab gegen den ebenfalls aus dem Kaninchen stammenden Tertiärantikörper, der mit der Alkalischen Phosphatase verbunden ist. Dieses Enzym hat die Funktion, ein farbloses Chromogen in ein finales Produkt umzuwandeln, das dem markierten Antigen eine rote Farbe geben kann. Das wird erreicht, indem zum Schluss eine Inkubation erfolgt mit einem IgG, das gegen die Alkalische Phosphatase gerichtet ist und aus der Maus stammt. Der gesamte Komplex wird mit Neufuchsin eingefärbt und erhält so seine rote Farbe.

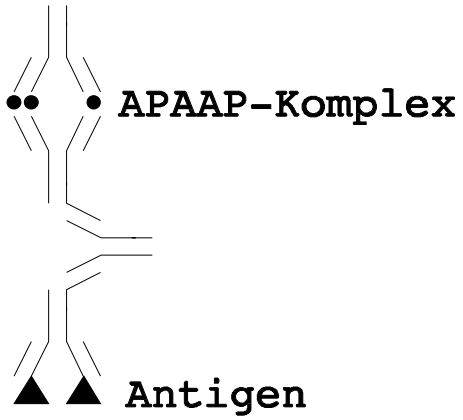

Abbildung 1: Antigen-Antikörper-Komplex bei der APAAP-Methode

Die Abbildung 1 veranschaulicht das Prinzip der Signalverstärkung durch das Auftragen mehrerer

"Etagen" von Antikörpern. Der Primärantikörper bindet an das Antigen, während der Sekundärantikörper eine Brücke darstellt zwischen dem Primärantikörper und dem Tertiärantikörper, der das Enzym trägt. Erst als vierte "Etage" wird das IgG gegen das Enzym aufgetragen, welches nun mehrere Bindungsstellen zur Verfügung hat.

3.1.2 Reagenzien für den Nachweis mit der APAAP-Methode

Folgende Reagenzien wurden für die immunhistochemische Nachweismethode mittels der APAAP-Methode benötigt:

Xylol

absteigende Alkoholreihe:

(Rotisol, 80 %ige Ethanollösung, 70 %ige Ethanollösung, 50 %ige Ethanollösung)

destilliertes Wasser

Tris Puffer:

(Tris-Base, Tris-Salzsäure, Natriumchlorid, destilliertes Wasser)

RPMI – Verdünnungsmedium:

(RPMI, destilliertes Wasser, inaktiviertes Rinderserum, Natriumazid)

polyklonaler Primärantikörper (Anti-YB-1) aus Kaninchen

monoklonaler Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) aus Maus

mit Alkalischer Phosphatase gespicktes Anti-Mausimmunglobulin aus Kaninchen

APAAP (monoklonal) aus Maus

Neufuchsin-Entwicklerlösung:

Entwicklungstrispuffer:

(Tris-Base, Tris-Salzsäure, Natriumchlorid, destilliertes Wasser)

AMPD-Levamisol-Lösung:

(Levamisol, 0,2M 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol: AMPD, destilliertes Wasser)

Naphthol-As-Bi-Phosphat

N, N-Dimethylformamid

4 %ige Natriumnitritlösung:

(Natriumnitrit, destilliertes Wasser)

5 %ige Neufuchsin-Stammlösung:

(Neufuchsin, 2 N Salzsäure)

2 N Salzsäure (Eichlösung)

Hämatoxylin

Mowiol

3.1.3 Der immunhistochemische Nachweis von YB-1

Die Brustkrebs-Gewebsschnitte wurden entparaffiniert mit Xylol, worin sie zweimal je 10 Minuten

aufbewahrt wurden. Anschließend wurden sie mittels einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert. Um überschüssige Alkoholreste zu entfernen, wurden die Objektträger danach mit destilliertem Wasser gespült.

Um die Arbeitsschritte der Färbung beginnen zu können, wurden die Objektträger mit Hilfe des Tris-Puffers auf Klammern aufgezogen. Dieser Arbeitsschritt soll eine gleichmäßige Verteilung der aufzutragenden Antikörper auf den Objektträgern und eine ebenso gleichmäßige Färbung gewährleisten. Danach wurden die Objektträger mit den Klammern in einer speziellen Halterung befestigt.

Schritt 1 der Färbung ist das Auftragen des Primärantikörpers. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:300 mit dem Verdünnungsmedium RPMI auf die Objektträger gegeben. Das RPMI-Medium wurde zuvor wie folgt angesetzt:

50 ml RPMI

450 ml destilliertes Wasser

50 ml inaktiviertes Rinderserum

0,5 g Natriumazid

Das RPMI-Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,4 - 7,6 eingestellt.

Im RPMI-Verdünnungsmedium wurde der Primärantikörper - wie alle im weiteren Verlauf der Färbung verwendeten Antikörper - für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den Objektträgern belassen. Nichtgebundene Antikörper wurden nach der Einwirkzeit mit Tris-Puffer abgespült.

Nach 10 Minuten wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen. Nach anschließender erneuter Spülung mit Tris-Puffer wurde der Brückenantikörper in einer Verdünnung von 1:100 auf die Objektträger gegeben. Nachdem wiederum mit Tris-Puffer gespült wurde, wurde APAAP in einer Verdünnung von 1:80 aufgetragen und wie die Antikörper 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Objektträger von den Klammern getrennt und nachdem sie mit destilliertem Wasser abgespült wurden, in eine Küvette mit Neufuchsin-Entwicklerlösung gegeben.

Die Neufuchsin-Entwicklerlösung wurde zuvor wie folgt frisch zubereitet:

Ansatz für eine Standküvette (=60 ml):

Glas A:

44 ml Entwicklungs-Tris-Puffer:

(4,9 g Tris-Base

und 1,5 g Tris-HCl

und 8,7 g NaCl

ad 1 l mit Aqua bidest.

auf pH 8,7 mit 1 N HCl einstellen)

15,5 ml AMPD-Levamisol-Lösung

(25 ml Levamisol gelöst in:

15,5 ml 0,2 M 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol: 21 g AMPD und 1 l Aqua bidest.))

Glas B:

31 mg Naphthol-As-Bi-Phosphat

375 ml N, N-Dimethylformamid

Glas C:

320 ml 4 %ige Na-nitritlösung:

(12,8 mg Na-nitrit

und 320 ml Aqua bidest.)

125 ml 5 %ige Neufuchsin-Stammlösung:

5 g Neufuchsin

und 100 ml 2 N HCl

Erst den Inhalt von Glas C in Glas A geben und durch leichtes Schütteln eine Lösung der verschiedenen Substanzen abwarten. Dann Glas B dazu geben und ca. 1 Minute reagieren lassen. Den pH-Wert wurde unter ständigem Rühren mit Hilfe von 1 N HCl auf 8,7 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und in eine Standküvette eingefüllt.

Die Küvette wurde mit den Objektträgern auf einen Schüttler gestellt und dort 30 Minuten belassen.

Die Objektträger wurden aus der Entwicklerlösung entfernt und Reste der Lösung mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurde mit Hilfe von Hämatoxylin gegengefärbt. Die Objektträger wurden wenige Minuten im Hämatoxylin belassen und anschließend in Leitungswasser gestellt bis eine zufriedenstellende Färbung erzielt war. Die so gefärbten Objektträger wurden zum Schluss mit Hilfe von Mowiol eingedeckt.

3.2 Tumoreigenschaften

Verschiedene Eigenschaften der Tumoren wurden erfasst. Die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus und das histologische Grading wurden, wie bei Harbeck et al. (1999a) beschrieben, bestimmt. Weiterhin wurde der Steroidrezeptorstatus für Östrogen (ER) und Progesteron (PR) untersucht. Wie bei Schmitt et al. (1997) beschrieben, wurde er in "positiv" und "negativ" eingeteilt. Der Rezeptorstatus wurde als positiv angesehen, wenn Rezeptoren entweder eines der beiden Hormone oder beider Hormone gefunden wurden.

3.3 Immunhistochemische Bewertung der YB-1 Expression

Nach der Durchführung des unten beschriebenen immunhistochemischen Nachweises von YB-1 wurde der Prozentsatz der in einer Gewebsprobe YB-1 - positiven Zellen bestimmt und dann in 4 Kategorien eingeteilt: unter 10%, unter 50%, unter 80% und über bzw. gleich 80%. Die Intensität der Färbung wurde mittels einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 3 (starke Färbung) beurteilt. Aus diesen beiden Merkmalen wurde eine immunoreaktive Wertung erstellt (von 0-12), indem die Kategorie des Prozentsatzes der YB-1 - positiven Zellen mit dem Skalenwert der Färbungsintensität multipliziert wurde (Beck et al., 1994). Somit wurden bei dieser Wertung sowohl die Quantität als auch die Qualität der immunhistochemischen Färbung berücksichtigt.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde durch Frau Ursula Berger, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München, und PD Dr. med. Nadia Harbeck, Frauenklinik der Technischen Universität München, vorgenommen. Um Patientinnen mit niedrigem Risiko von denen mit hohem Risiko zu unterscheiden, wurden kontinuierliche Variablen in zweiwertige Variablen umgewandelt (Harbeck et al., 1999a). Für die immunoreaktive Wertung wurde mittels eines logarithmischen Rangsystems ein optimierter Diskriminatorwert eingeführt. Die Diskriminatorwerte wurden jeweils für Patientinnen mit und Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie getrennt erstellt. Für Patientinnen mit postoperativer Chemotherapie wurde als Diskriminatorwert eine immunoreaktive Wertung von 4 für YB-1 im Tumorgewebe (YB-1 / Tumor) und eine Wertung von 0 für YB-1 im Tumor-assoziierten Brustepithelgewebe (YB-1 / Epithel) ermittelt. In der Gruppe der Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie wurden immunoreaktive Wertungen von 1 für YB-1 im Tumorgewebe und 4 für YB-

1 im Tumor-assoziierten Brustepithelgewebe als Diskriminatorwert bestimmt. Die Kombination von YB-1 / Tumor und YB-1 / Epithel wurde bewertet mit der Unterteilung, dass entweder beide Faktoren hoch sind oder beide Faktoren niedrig. Zum Vergleich der YB-1 Immunoreaktivität zwischen dem Tumorgewebe, dem Tumor-assoziiertem Brustepithel und normalen Kontrollen wurden, soweit angebracht, der Wilcoxon Test, der Mann-Whitney U-Test oder der chi^2 -Test eingesetzt. Mittels des Mann-Whitney U-Tests wurden mögliche Zusammenhänge zwischen YB-1 und anderen zweiwertigen Variablen untersucht. Die krankheitsfreie Überlebenszeit (disease-free survival, DFS) wurde gemäß Kaplan und Meier (1958) kalkuliert und mit Hilfe einer logarithmischen Rangstatistik verglichen. Aufgrund der geringen Anzahl von Patientinnen wurden die p-Werte von den exakten Verteilungen der logarithmischen Rangstatistik ermittelt. Alle Tests wurden bei einem Signifikanzwert von α=0.05 durchgeführt.

4 Ergebnisse

Es wurden Gewebeproben von 83 Brustkrebspatientinnen untersucht. Ein Teil der Patientinnen (n = 41) hatte im Anschluss an die Operation eine adjuvante Chemotherapie erhalten, der andere (n = 42) nicht. Entsprechend wurde die Kohorte in 2 Gruppen eingeteilt. Die Tumoreigenschaften (Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron und Histologisches Grading) und die klinischen Parameter (Menopausaler Status und Lymphknotenstatus) wurden durch das Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München erfasst. Durch die Frauenklinik der Technischen Universität München wurden über eine durchschnittliche Zeitspanne von 61 Monaten (1-139 Monate) in regelmäßigen Zeitabständen komplette klinische Nachfolgeuntersuchungen durchgeführt (Harbeck et al., 1999b).

In den mikroskopischen Präparaten dieser Mammakarzinome wurde mittels der immunhistochemischen Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode die Expression des YB-1 Proteins im Tumorgewebe (YB-1 / Tumor) und im Tumor-assoziierten benignen Brustepithelgewebe (YB-1 / Epithel) nachgewiesen. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, der Frage nach der Expression von YB-1 in primären Brustkrebsgeweben nachzugehen und zu untersuchen, ob Korrelationen bestehen zwischen der Stärke und / oder dem Muster der Expression von YB-1 und der Länge der krankheitsfreien Überlebenszeit, dem Ansprechen auf Chemotherapie und der Ausprägung eines Phänotyps höherer Malignität.

4.1 YB-1 Überexpression in Tumorgewebe und benignem Epithel

Neben den 83 Gewebeproben von Patientinnen mit Brustkrebs wurden auch in 12 Gewebeproben, die jeweils während einer reduktiven Mammoplastie gewonnen worden waren, die YB-1 Expressionen untersucht. Diese Fälle dienten als Kontrolle, um die YB-1 Expression in normalem Brustgewebe zu bestimmen. Nach der immunhistochemischen Färbung mittels der APAAP-Methode fand sich bei allen 12 Proben normalen Brustgewebes keine YB-1 Expression. Dies stimmt überein mit vorherigen Beobachtungen (Bargou et al., 1997) und bekräftigt, dass in nicht-malignem Brustepithel keine YB-1 Expression zu beobachten ist.

Von den 83 Brustkrebs-Gewebeproben, die jeweils während entweder einer modifizierten radikalen Mastektomie oder einer Brust-erhaltenden Operation mit Tumorresektion gewonnen worden waren, konnte in 63 Proben (76%) eine Expression von YB-1 (immunoreaktive Wertung > 0) nachgewiesen werden. In einigen Fällen war darüber hinaus auch eine YB-1 Überexpression im nicht-malignem Brustepithel, das an den Tumor angrenzt, zu finden. Diese Tatsache war Anlass zu einer näheren Untersuchung des Verhältnisses der YB-1 Expression im Tumor (YB-1 / Tumor) und der YB-1 Expression im umgebenden Brustgewebe (YB-1 / Epithel). 28 Gewebeproben bestanden jedoch nur aus Tumorgewebe und zeigten keinerlei normales Brustepithel. Diese Proben konnten nicht in die Untersuchung einbezogen werden.

Bei den anderen Proben, bei denen man sowohl das Tumorgewebe als auch das umgebende normale Brustgewebe beurteilen konnte, wurde auf eine Verteilung der YB-1 Expression im Tumor bzw. benignen Epithel geachtet. 35 Proben wiesen eine YB-1 Überexpression sowohl im Tumor als auch im peritumoralen Brustepithelgewebe auf. In 11 Proben konnte keine YB-1 Expression gefunden werden, d.h., YB-1 war weder im Tumor noch im normalen Gewebe nachzuweisen. In 7 Schnitten konnte eine hohe YB-1 Expression im Tumor festgestellt werden, eine Expression des Proteins im Tumor-angrenzenden Gewebe war jedoch nicht zu finden. Lediglich in 2 Gewebeproben war eine hohe Expression von YB-1 im den Tumor umgebenden normalen Brustepithelgewebe verbunden mit einer Nicht-Expression im Tumor selbst.

Um Zusammenhänge zwischen diesen Ergebnissen besser herausstellen zu können, wurde die immunhistochemische Auswertung durch statistische Analysen vervollständigt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die immunoreaktive Wertung (Produkt des Prozentsatzes der YB-1-positiven Zellen mit Skalenwert der Färbungsintensität) für YB-1 im Tumor signifikant höher lag als für YB-1 im normalen Epithel ($P < 0,001$). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die YB-1 Expression im Tumorgewebe und im umgebenden Epithel signifikant höher lag als die YB-1 Expression in den Kontrollen normalen Brustgewebes ($P < 0,001$ für YB-1 / Tumor und $P = 0,009$ für YB-1 / Epithel). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für den Brustkrebs eine neue Untergruppe gefunden werden konnte. Diese Gruppe weist sich durch eine YB-1 Überexpression

sowohl im Tumor selbst als auch im Tumor-assoziierten normalen Brustepithelgewebe aus.

4.2 YB-1 Überexpression führt zu klinischer Medikamenten-Resistenz

Eine der beiden Kohorten, die in der Auswertung getrennt beurteilt wurden, war die Gruppe der 41 Patientinnen, welche jeweils nach ihrer Operation eine adjuvante systemische Chemotherapie erhalten hatten. Bei 36 dieser 41 Patientinnen (88 %) wurde während der Tumorresektion bzw. Mastektomie eine Lymphknotenbeteiligung festgestellt. Diese Tatsache war neben weiteren etablierten histomorphologischen Parametern wie Tumorgröße, histologisches Grading und Hormonrezeptorstatus ein entscheidendes Kriterium für die Durchführung einer postoperativen Chemotherapie. Der YB-1 Nachweis mittels der APAAP-Methode ergab in dieser Gruppe folgendes Ergebnis: in 21 der 41 Gewebeproben war die immunoreaktive Wertung für die YB-1 Expression im Tumor niedrig (immunoreaktive Wertung < 4), während in 20 Proben eine starke YB-1 Expression im Tumor zu finden war (Tabelle 2).

Tabelle 2: YB-1 Expression im Brustkrebs der Patientinnen mit postoperativer Chemotherapie

		Patientinnen mit postop. Chemotherapie (n = 41)
YB-1/Tumor	**niedrig**	21 (51 %)
	hoch	20 (49 %)
YB-1/Epithel	**niedrig**	11 (39 %)
	hoch	17 (61 %)
YB-1/Tumor und Epith.	**beide Faktoren niedrig**	10 (29 %)
	einer oder beide hoch	25 (71 %)

Aufgrund regelmäßiger Nachsorgeuntersuchungen (Harbeck et al., 1999b) konnte auf die 5-Jahres-Rezidivrate geschlossen werden. Bei dieser Rückfallrate zeigen sich je nach YB-1 Expression im Tumor Unterschiede: So erlitten bei jenem Patientinnen-Kollektiv, das durch eine niedrige YB-1 Expression im Tumor gekennzeichnet ist, 3 der 21 Patientinnen ein Rezidiv. Dies ergibt eine 5-Jahres-Rezidivrate von 39 %. Im Gegensatz dazu erlitten von den 20 Patientinnen, die in ihren Tumoren eine starke YB-1 Überexpression aufweisen, in den ersten 5 postoperativen Jahren 7 (was einer Rückfallrate von 68 % entspricht) ein Rezidiv. Diese Unterschiede weisen eine grenzwertige Signifikanz von P = 0,071 auf (Abbildung 2). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich die große Mehrheit der Rezidive bei den Patientinnen mit starker YB-1 Expression, nämlich 6 von 7, in den ersten 1 1/2 Jahren nach der Operation ereignet haben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine starke YB-1 Expression im Tumor bei jenen Brustkrebs-Patientinnen, die eine postoperative adjuvante Chemotherapie erhalten haben, assoziiert ist mit einer Resistenz gegen Chemotherapeutika, was zu einem Versagen der medikamentösen Therapie führt.

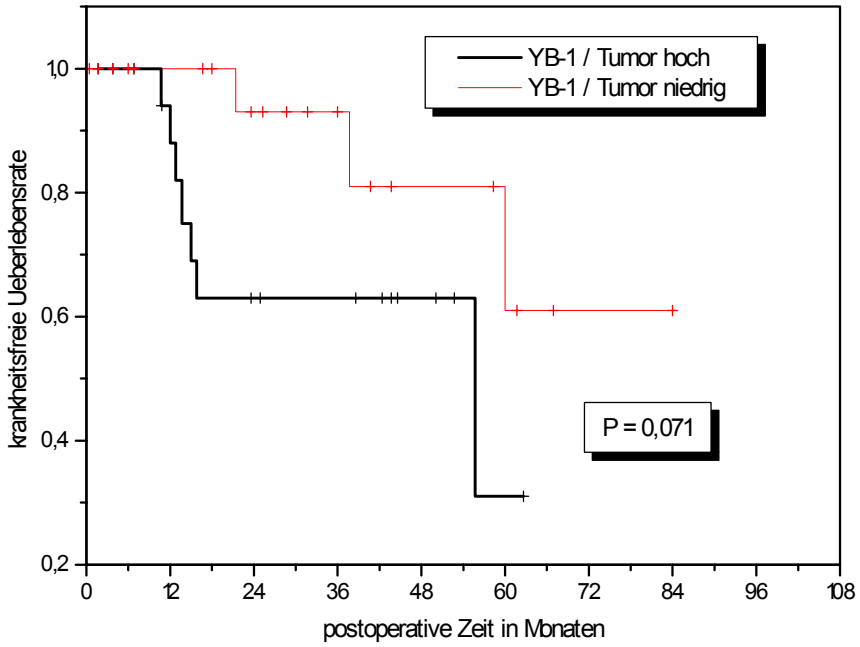

Abbildung 2: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens bei Patientinnen mit postoperativer Chemotherapie in Abhängigkeit von der YB-1 Expression in den Tumorzellen; Von 21 Patientinnen, bei denen nur eine niedrige YB-1 Expression in den Tumorzellen gefunden werden konnte, erlitten 3 ein Rezidiv (rote Kurve), während bei 20 Patientinnen mit einer hohen YB-1 Expression im Tumor (schwarze Kurve) 7 Rezidive im Beobachtungszeitraum auftraten (p = 0,071)

Bei einer zweiten Analyse wurden Untersuchungen durchgeführt, die sowohl die YB-1 Expression im Tumor (YB-1 / Tumor) als auch im angrenzenden Gewebe (YB-1 / Epithel) berücksichtigen (Tabelle 2). Einige der Proben konnten nicht in diese Untersuchung einbezogen werden, da sich nur Tumorgewebe auf dem Objektträger befand, jedoch kein normales Brustgewebe. Bei 10 der Gewebeproben der Patientinnen mit postoperativer Chemotherapie zeigte sich nur eine niedrige Expression von YB-1 sowohl im Tumor als auch im den Tumor umgebenden Epithel. In dieser Gruppe konnte im Beobachtungszeitraum bisher kein Rezidiv festgestellt werden. 25 der Gewebeproben wiesen eine starke YB-1 Expression sowohl in den Tumorzellen als auch im benignen Tumor-benachbarten Gewebe auf. Von diesen 25 Patientinnen erlitten im Nachbeobachtungszeitraum 9 ein Rezidiv. Dies entspricht einer Rückfallrate von 66 %, der als Vergleich eine Rückfallrate von 0 % gegenübersteht. Dabei handelt es sich um einen statistisch signifikanten Unterschied von P = 0,037 in den Rückfallraten (Abbildung 3). Diese Daten weisen darauf hin, dass das Ansprechen auf eine postoperative Chemotherapie sehr gut ist, wenn in den Brustkrebszellen und in den normalen Brustepithelzellen, die den Tumor umgeben, eine niedrige YB-1 Expression gefunden werden kann.

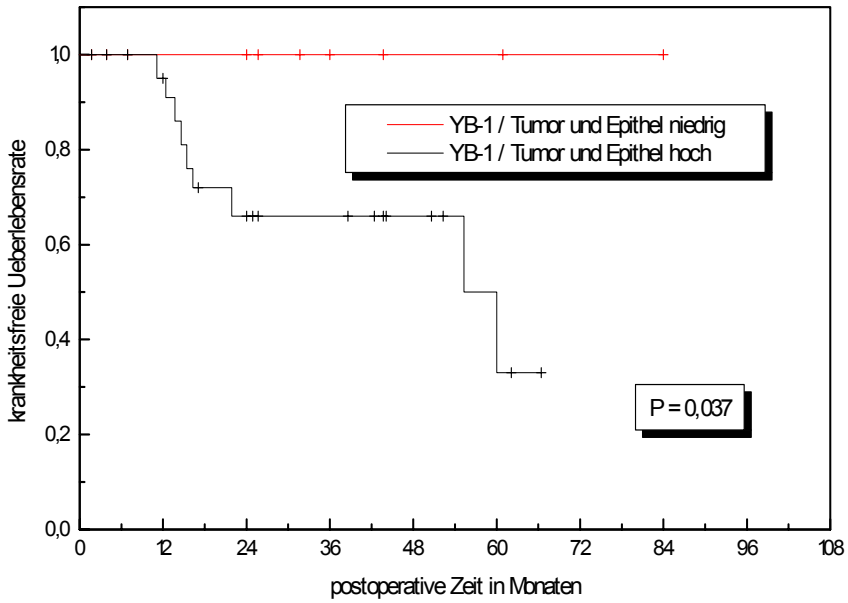

Abbildung 3: Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens bei Patientinnen mit postoperativer Chemotherapie in Abhängigkeit von der YB-1 Expression in den Tumorzellen und im Tumor-angrenzenden benignen Brustepithel; von 10 Patientinnen mit einer niedrigen Expression erlitt keine ein Rezidiv (rote Kurve) und von 25 Patientinnen mit einer hohen Expression von YB-1 (schwarze Kurve) erlitten 9 ein Rezidiv (p = 0,037)

Weitere statistische Untersuchungen mit den Daten der mit Chemotherapie behandelten Patientinnen zeigten eine Korrelation der YB-1 Expression im Tumor-assoziierten normalen Brustepithelgewebe mit der Überlebenszeit ohne Krankheits-Rückfall. Diese Korrelation wies eine Signifikanz von P = 0,046 auf. Es konnte festgestellt werden, dass ein hochsignifikanter Zusammenhang besteht zwischen der YB-1 Expression in den Tumorzellen und der Expression dieses Proteins im den Tumor umgebenden benignen Brustepithel (P = 0,001). Nur eine von 13 Patientinnen, deren Tumoren eine starke YB-1 Expression zeigten, wiesen keine Expression im Tumor-angrenzenden normalen Gewebe auf. Von 10 Patientinnen, welche mit postoperativer Chemotherapie behandelt wurden und bei denen sich eine niedrige YB-1 Expression sowohl im Tumor selbst als auch im benignen Epithelgewebe fand, erlitt keine Patientin bisher ein Rezidiv. Dies veranschaulicht, dass die prognostische Aussagekraft der YB-1 Expression deutlich erhöht wird, wenn die Expression dieses Proteins sowohl in den Tumorzellen als auch in den normalen peritumoralen Epithelzellen kombiniert betrachtet wird.

Zusammenfassend lassen sich für die Gruppe der Patientinnen mit postoperativer Chemotherapie folgende Schlüsse ziehen: Eine YB-1 Überexpression im Tumorgewebe oder im angrenzenden Brustepithel deutet auf eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika hin, was eine schlechte Prognose hinsichtlich der krankheitsfreien Überlebenszeit zur Folge hat. Eine niedrige Expression dieses Proteins sowohl im Tumor selbst als auch im angrenzenden normalen Epithel hingegen bietet eine gute Prognose im Hinblick auf das Ansprechen auf eine Chemotherapie und somit auf das krankheitsfreie Überleben. Eine hohe YB-1 Expression stellt daher einen negativen Marker für das Ansprechen einer postoperativen systemischen Chemotherapie dar.

4.3 YB-1 Überexpression bestimmt Tumor-Aggressivität

Die andere der beiden Kohorten, die bei der Auswertung getrennt beurteilt wurden, war die Gruppe der 42 Patientinnen, die nach ihren Operationen keine adjuvante systemische Chemotherapie erhalten hatten. Bei den Operationen wurde bei 98 % der Patientinnen keine Lymphknotenbeteiligung festgestellt, so dass dies neben den anderen oben erwähnten histomorphologischen Parametern das entscheidende Kriterium gegen die Behandlungsoption postoperative Chemotherapie war.

Die immunhistologische Untersuchung der Brustkrebsgewebeproben dieser 42 Patientinnen hinsichtlich der Expression des YB-1 Proteins ergab folgende Ergebnisse (Tabelle 3): bei 10 der Patientinnen war eine niedrige YB-1 Expression in den Tumorzellen zu beobachten, während bei 32 der 42 Patientinnen das Protein im Tumor stark exprimiert war. Die Auswertung der Rückfallraten der Patientinnen im Hinblick auf die Stärke der YB-1 Expression im Tumor zeigte, dass bei den 10 Patientinnen mit niedrigem immunoreaktivem Wert die 5-Jahres-Rezidivrate 0 % beträgt, d. h., bei keiner der 10 Patientinnen ist die Krankheit zurückgekehrt. Im Gegensatz dazu haben von den 32 Patientinnen, die einen hohen immunoreaktiven Wert aufwiesen, 12 im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv erlitten. Dies entspricht einer Rückfallrate von 30 %. Zwischen diesen beiden Gruppen besteht folglich ein statistisch signifikanter Unterschied von P = 0,011.

Tabelle 3: YB-1 Expression im Brustkrebs der Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie

		Patientinnen ohne postop. Chemotherapie (n = 42)
YB-1/Tumor	**niedrig**	10 (24 %)
	hoch	32 (76 %)
YB-1/Epithel	**niedrig**	21 (50 %)
	hoch	6 (78 %)
YB-1/Tumor und Epith.	**beide Faktoren niedrig**	8 (20 %)
	einer oder beide hoch	32 (80 %)

Weitere Auswertungen in der Gruppe der Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie ergaben, dass bei keiner der Patientinnen, die in den Tumorzellen eine niedrige YB-1 Expression aufwiesen, eine hohe Expression dieses Proteins im Tumor-assoziierten benignen Brustepithel zu finden war. Wie auch schon in der Gruppe der Patientinnen mit postoperativer Chemotherapie, zeigte die kontinuierliche Betrachtung der YB-1 Expression in den Tumorzellen und im Epithel eine hohe prognostische Signifikanz. So konnte im Nachbeobachtungszeitraum bei den 8 Patientinnen, deren YB-1 Expression sowohl im Tumor selbst, als auch im umgebenden Epithelgewebe einen niedrigen immunoreaktiven Wert aufwies, kein Rezidiv entdeckt werden. Dagegen erkrankten aus der Gruppe der Patientinnen, deren Gewebeproben im Tumor und im benignen Gewebe oder nur in einer der beiden Bereiche eine hohe YB-1 Expression zeigten, 30 % der Patientinnen erneut in den ersten 5 postoperativen Jahren (P = 0,038).

Diese Ergebnisse lassen folgende Vermutung zu: eine hohe YB-1 Expression im Brustkrebs bestimmt einen aggressiveren Phänotyp dieses Malignoms und führt daher häufiger zu Rezidiven als bei Patientinnen mit einer niedrigen YB-1 Expression, obwohl bei 98 % aller ohne Chemotherapie behandelten Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation kein Befall der Lymphknoten festgestellt werden konnte. Eine eventuelle spätere Metastasierung mit der Ausprägung eines aggressiveren Phänotyps des Brustkrebses könnte durch eine YB-1 Expression induziert werden. Somit stellt auch bei den Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie die Expression des YB-1-Proteins einen negativen prognostischen Marker hinsichtlich der krankheitsfreien Überlebenszeit nach der Operation dar.

4.4 YB-1 Lokalisation ohne Einfluss auf Therapieerfolg

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit bestand darin festzustellen, ob es ein Muster gibt hinsichtlich der Lokalisation des YB-1 Proteins im Brustkrebs. Weiterhin war von großer Bedeutung, ob eine Abhängigkeit besteht zwischen der Lokalisation des Proteins und seinem prognostischen Aussagewert. So zum Beispiel, ob eine nukleäre Lokalisation von YB-1 hinsichtlich der Ausbildung einer Multidrug Resistenz eine entscheidendere Rolle spielt als eine andere Lokalisation.

Zu diesem Zweck wurde ein gezieltes Augenmerk auf den Lokalisationsort der Färbung in den Zellen gerichtet (Abbildung 4).

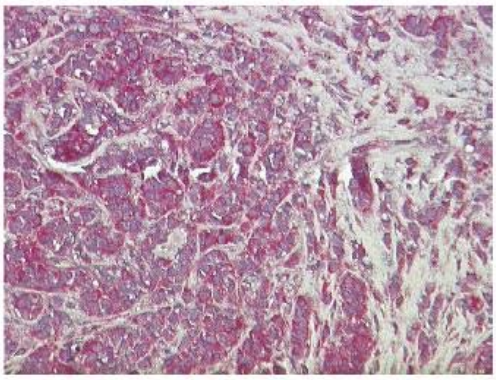

Abbildung 4a

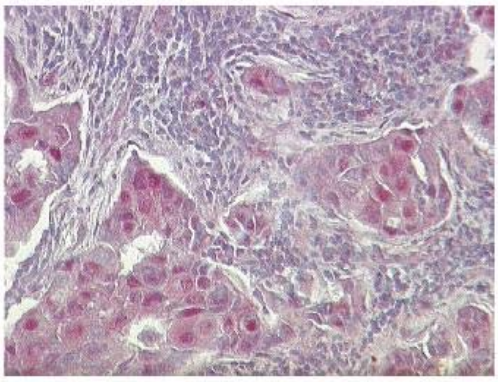

Abbildung 4b

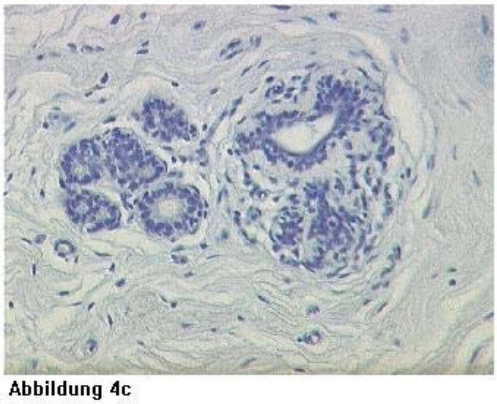

Abbildung 4c

Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis von YB-1 mittels der Alkalische-Phosphatase – Anti-Alkalische-Phosphatase Methode. Die Abbildung zeigt deutlich, dass das rote Signal, welches YB-1 bei dieser Methode gibt, in unterschiedlichen Lokalisationen zu finden ist. Abbildung 4a zeigt eine zytoplasmatische YB-1 Lokalisation, während in der Abbildung 4b YB-1 im Nukleus lokalisiert ist. Die Abbildung 4c zeigt eine Negativkontrolle – eine Gewebeprobe, die bei einer reduktiven Mammoplastie gewonnen wurde und keine YB-1 Expression enthält. Daher ist auch keine Rotfärbung zu sehen.

Die hauptsächliche Lokalisation der YB-1 Expression im Tumorgewebe stellte das Zytoplasma dar (Abbildung 4a), in dem sich bei 62 % aller Gewebeproben eine YB-1 Überexpression zeigte (Tabelle 4). In 11 % der Fälle konnte YB-1 auch im Kern (Abbildung 4b) der Tumorzellen gefunden werden. 48 % der Tumorgewebeproben wiesen eine YB-1 Expression in der Membran der Tumorzellen auf.

20 % aller Gewebeproben wiesen keinerlei YB-1 Expression im Tumor auf. In 19 % der YB-1 positiven Tumoren war das Protein nur im Zytoplasma zu finden, während es in 3 % nur im Kern und in 11 % nur in der Membran der Tumoren zu erkennen war. Dies zeigt, wie auch schon die oben erwähnten Daten, dass YB-1 im Tumor hauptsächlich im Zytoplasma zu finden ist.

Tabelle 4: Aufteilung der YB-1 Lokalisation im Tumor; am häufigsten war YB-1 im Zytoplasma lokalisiert, d.h. bei 62 % der Gewebeproben konnte YB-1 im Zytoplasma gefunden werden, während nur bei 11 % der Proben YB-1 im Nukleus zu finden war

	insg. positiv
Zytopl.	62 %
Nukleus	11 %
Membran	48 %

Nur insgesamt 11 % aller Proben wiesen eine positive YB-1 Expression im Nukleus auf. Somit fand sich ein niedrigerer Prozentsatz für eine YB-1 Lokalisation im Nukleus als bei vorherigen Untersuchungen (Bargou et al.; 1997).

In 80 % bzw. 82 % der Fälle, in denen eine YB-1 Expression in Membran bzw. Nukleus zu finden war, konnte ebenfalls eine Färbung im Zytoplasma festgestellt werden. Die YB-1 Expression im Zytoplasma scheint eine Ausgangsrolle für eine entsprechende Lokalisation in Membran bzw. Nukleus zu spielen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass bei keiner Probe eine YB-1 Expression im Zytoplasma des Tumors fehlte, wenn sowohl Nukleus als auch Membran ein Signal für das Protein aufwiesen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass kein Muster in der Lokalisation der YB-1 Expression in den Tumorzellen zu erkennen ist. Auffällig ist nur, dass eine YB-1 Lokalisation im Zytoplasma in der Mehrzahl der Fälle zu finden war.

Die Verteilung der YB-1 Lokalisationen im Tumor-benachbarten benignen Brustepithelgewebe wurde unter den gleichen Gesichtspunkten ausgewertet (Tabelle 5).

In 60 % der Gewebeproben konnten jedoch keinerlei YB-1 Expression im benignen peritumoralen Gewebe nachgewiesen werden. Ein Grund dafür war auch, dass einige Proben nicht zur Auswertung herangezogen werden konnten, da sie kein ausreichend großes Areal an Tumor-umgebenden Gewebe aufwiesen. 38 % der Gewebeproben wiesen eine positive Zytoplasmalokalisation des YB-1 Proteins auf. Bei nur 4 % der Proben konnte YB-1 im Kern der Epithelzellen gefunden werden und bei 18 % in der Membran.

Tabelle 5: Verteilung der YB-1 Lokalisation im benignen Epithel; am häufigsten war YB-1 auch hier im Zytoplasma lokalisiert, d.h. 38 % der Proben zeigten sich positiv für YB-1 im Zytoplasma, während nur 4 % der Proben positiv für YB-1 im Nukleus waren

	insg. positiv
Zytopl.	38 %
Nukleus	4 %
Membran	18 %

Bei 95 % bzw. 75 % der YB-1 Expression in Membran bzw. Nukleus stellte sich YB-1 ebenfalls im Zytoplasma dar. Somit stellt auch im peritumoralen Epithelgewebe das Zytoplasma den Hauptort der YB-1 Lokalisation dar.

Auch im Tumor-assoziierten benignen Brustepithelgewebe lässt sich kein bestimmtes Muster hinsichtlich der Lokalisation des YB-1 Proteins erkennen. Auffallend ist jedoch auch hier der große Anteil der Zytoplasma-Lokalisationen, während ein nur sehr geringer Anteil des YB-1 im Nukleus zu finden war.

Bei den Vergleichen der YB-1 Lokalisationen mit den Überlebenszeiten der Patientinnen konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen einer bestimmten Lokalisation des Proteins und dem Ansprechen der postoperativen Chemotherapie und somit der krankheitsfreien Überlebenszeit gefunden werden. Auch konnte in der Gruppe der Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer bestimmten YB-1 Lokalisation und der Ausprägung eines aggressiveren Phänotyps des Brustkrebses nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass eine nukleäre YB-1 Expression in der Mehrzahl der Fälle mit einer hohen zytoplasmatischen YB-1 Expression einhergeht, deutet darauf hin, dass eine hohe

zytoplasmatische YB-1 Expression einem nukleären Transport von YB-1 vorausgeht.

4.5 YB-1 korreliert mit Hormonrezeptorstatus und Tumorfaktoren

Ebenfalls von großem Interesse bei der Auswertung der YB-1 Expressionen in den Gewebeproben der Brustkrebspatientinnen war eine mögliche Korrelation zwischen der Stärke der YB-1 Expression im Tumor bzw. im peritumoralen benignen Brustepithelgewebe und etablierten prognostischen Faktoren. Die entsprechenden histomorphologischen Parameter (Tabelle 1) wie Lymphknotenstatus, Tumorgröße, Histologisches Grading, Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron wurden am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München zusammengetragen. Weiterhin wurde die Expression der biologischen Tumorfaktoren uPA und PAI-1, sowie deren Quotient uPA / PAI-1 ermittelt.

Bei dem Vergleich der YB-1 Expressionen in den Gewebeproben mit den oben erwähnten histomorphologischen Tumoreigenschaften, die etablierte prognostische Marker darstellen, wurde festgestellt, dass es keine Korrelationen gibt zwischen der Expression des YB-1 Proteins im peritumoralen benignen Brustgewebe und allen genannten Faktoren. Auch die Expression von YB-1 im Tumor konnte in keinen Zusammenhang gebracht werden mit den etablierten prognostischen Faktoren Lymphknotenstatus, Tumorgröße und histologisches Grading. Es konnte jedoch eine signifikante negative Korrelation ($p = 0,007$) festgestellt werden zwischen der YB-1 Expression im Tumor und dem Hormonrezeptorstatus. 16 der Patientinnen wiesen einen negativen Hormonrezeptorstatus auf, während bei 67 der Patientinnen Rezeptoren für Östrogen oder Progesteron gefunden werden konnten (Tabelle 6).

Tabelle 6: YB-1 / Tumor und Hormonrezeptorstatus; bei 16 Patientinnen war der Hormonrezeptorstatus negativ, während er bei 67 Patientinnen positiv war; im Mittel lag die immunoreaktive Wertung bei einem negativen Rezeptorstatus mit einer Signifikanz von $p = 0,007$ höher als bei einem positiven

		Hormonrezeptor negativ	Hormonrezeptor positiv	insgesamt
YB-1 / Tumor	negativ	1	16	17
	positiv	15	51	66
insgesamt		16	67	83

Es stellte sich heraus, dass die immunoreaktive Wertung für YB-1 im Tumor bei einem negativen Hormonrezeptorstatus im Mittel höher lag als bei einem positiven Hormonrezeptorstatus. Während bei einem negativen Rezeptorstatus ($N = 16$) die Wertung eine Spanne von 5 bis 11 mit einem Mittelwert von 8 einnahm, betrug der Mittelwert der immunoreaktiven Wertung für die YB-1 Expression im Tumorgewebe Hormonrezeptor-positiver Patientinnen ($N = 67$) 4, mit einer Spanne von 1 bis 8. Dieser Unterschied weist eine Signifikanz von $p = 0,007$ auf. Betrachtet man jedoch die Rezeptoren der beiden verschiedenen Hormone einzeln in ihren Zusammenhängen zur YB-1 Expression, so lässt sich keine signifikante Korrelation finden zwischen der YB-1 Expression im Tumor und dem Status für Östrogenrezeptoren. Es zeigt sich aber eine grenzwertig signifikante Assoziation zwischen der YB-1 Expression in den Tumorzellen und dem Status für Progesteronrezeptoren ($p = 0,074$).

Die Expression der biologischen Tumorfaktoren uPA und PAI-1, sowie deren Quotient (Tabelle 7) wurde mit der YB-1 Expression im Brustkrebs und im Tumor-benachbarten benignen Brustepithel verglichen. Dabei konnte keine Korrelation gefunden werden zwischen der YB-1 Expression im normalen Brustepithel und den biologischen Faktoren uPA oder PAI-1. Auch der Vergleich zwischen dem Quotienten uPA / PAI-1 und der YB-1 Expression im benignen Epithel zeigte keinerlei Zusammenhänge. Ebenfalls war ein signifikanter Zusammenhang zwischen der YB-1 Expression im Tumor und der Expression des Faktors PAI-1 nicht erkennbar. Dagegen jedoch konnten grenzwertig signifikante Korrelationen zwischen der Expression von YB-1 im Tumor und uPA ($p = 0,066$) und zwischen YB-1 und uPA / PAI-1 ($p = 0,058$) festgestellt werden. Ein stark signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) besteht zwischen der Expression von uPA und PAI-1.

Tabelle 7: Expression von uPA und PAI-1 gesamt sowie getrennt für Fälle ohne und mit postoperativer Chemotherapie

		Insges.	**Pat. ohne postop. Chemotherapie**	**Pat. mit postop. Chemotherapie**
UPA	**niedrig**	50 %	56 %	43 %
	hoch	50 %	44 %	57 %
PAI-1	**niedrig**	68 %	74 %	60 %
	hoch	32 %	26 %	40 %
uPA/PAI-1	**niedrig**	42 %	49 %	34 %
	hoch	58 %	51 %	66 %

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die YB-1 Expression im Brustkrebs eine klinische Relevanz besitzt. Dafür wurden 83 Patientinnen, von denen 41 mit einer postoperativen Chemotherapie, welche größtenteils Anthracyclin enthielt, und 42 ohne postoperative Chemotherapie behandelt wurden, hinsichtlich ihrer YB-1 Expression und ihres weiteren Verlaufes untersucht. Es stellte sich heraus, dass in beiden Gruppen eine hohe YB-1 Expression im Brustkrebsgewebe mit einem schlechteren Krankheitsverlauf korreliert. Dies deutet darauf hin, dass YB-1 sowohl eine Rolle in der klinischen Medikamentenresistenz als auch bei der Ausbildung aggressiverer Phänotype spielt.

5.1 Medikamenten-Resistenz durch YB-1 Überexpression

Eine große Rolle bei der Entwicklung der Multidrug Resistenz spielt das MDR1-Gen. Dieses MDR1-Gen kodiert für P-Glykoprotein, ein membrangebundenes Transporterprotein der Superfamilie der ABC-Transporter, welches toxische Substanzen aus der Zelle transportieren kann (Zamora et al., 1988). Zu diesen Medikamenten gehören in der Tumorbehandlung eingesetzte Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Anthrazykline, Vincaalkaloide, Epipodophyllotoxine und Taxane (Gottesmann + Pastan, 1993). P-Glykoprotein könnte dadurch zu einem schlechten Ansprechen der Chemotherapie beitragen. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass das humane Y-Box-Protein YB-1 an der Expression des MDR1-Gens beteiligt ist. Es konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass YB-1 im Brustkrebs überexprimiert ist und dadurch einen Chemotherapeutika-resistenten Phänotyp verursacht (Bargou et al., 1997).

Bargou et al. hatten 1997 in ihrer Arbeit mit experimentellen Beobachtungen den Beweis für eine Rolle von YB-1 bei der Regulation der P-gp Expression in Brustkrebszellen erbracht. Die Vermutung, dass YB-1 somit an der Entstehung der Multiplen Medikamentenresistenz beteiligt ist, wurde aufgestellt. Inwiefern aber YB-1 auch eine klinische Bedeutung aufweist, blieb unklar. Zielstellung dieser Arbeit war es herauszufinden, ob eine mögliche Überexpression von YB-1 in histologisch gesicherten Mammakarzinomen eine Auswirkung auf das Ansprechen einer postoperativen Chemotherapie und eine prognostische Aussagekraft hinsichtlich des krankheitsfreien postoperativen Überlebens hat. Zu diesem Zweck wurden die Tumorgewebeproben von 83 Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom mittels der immunhistochemischen APAAP-Methode auf eine YB-1 Expression untersucht. Gewebeproben, die während einer reduktiven Mammoplastie entnommen wurden, dienten als Negativ-Kontrollen.

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die Intensität der Expression von YB-1 in den Tumorzellen einen Einfluß hat auf die krankheitsfreie Überlebensrate der Patientinnen, die eine postoperative Chemotherapie erhalten hatten. So stehen sich die 5-Jahres-Rezidivraten von 39 % für die Patientinnen mit einer niedrigen YB-1 Expression und 68 % für die Patientinnen mit einer hohen YB-1 Expression in den Tumorzellen gegenüber. Dies entspricht einer grenzwertigen Signifikanz von $P = 0{,}071$. Bei der Gegenüberstellung der Rezidivraten mit Berücksichtigung der YB-1 Expression in den Tumorzellen und im peritumoralen Epithel konnte bei einer Rezidivrate von 0 % bei Patientinnen mit einer niedrigen YB-1 Expression sowohl im Tumor als auch im peritumoralen Gewebe und einer Rezidivrate von 66 % bei Patientinnen mit einer hohen YB-1 Expression sowohl im Tumor als auch im peritumoralen Gewebe eine Signifikanz von $P = 0{,}037$ ermittelt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass eine YB-1 Überexpression sowohl in den Tumorzellen als auch im den Tumor umgebenden Brustepithel verbunden ist mit einer klinischen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Dies führt zu einer schlechten Prognose hinsichtlich der krankheitsfreien Überlebenszeit nach der Operation. Im Gegensatz dazu geht eine niedrige YB-1 Expression im Tumor und im angrenzenden normalen Epithel mit einer guten Prognose einher. Nachdem nachgewiesen wurde, dass im Ovarialkarzinom eine Korrelation besteht zwischen der nukleären YB-1 Expression und der Länge des krankheitsfreien Intervalls bzw. der Sensitivität gegenüber der Chemotherapie (Kamura et al., 1999), konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass das humane Y-Box-Protein YB-1 auch im Mammakarzinom einen negativen Marker für den klinischen Verlauf darstellt, der mit dem Ansprechen der postoperativen Chemotherapie und der Länge des krankheitsfreien Intervalls korreliert.

Die Rolle, die YB-1 bei der klinischen Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika spielt, könnte - wenigstens teilweise - durch die oben erwähnte Rolle von YB-1 bei der Steuerung der Expression des MDR1-Gens erklärt werden. Eine durch YB-1 aktivierte Expression des MDR1-Gens führt zu einer Überexpression von P-Glykoprotein und somit zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen, auch in der Behandlung von Mammakarzinomen eingesetzten, Chemotherapeutika. Es ist bekannt, dass das P-Glykoprotein durch verschiedene endogene und exogene Stimuli beeinflusst und im Rahmen einer zellulären Stressantwort hochreguliert wird (Sukhai + Piquette-Miller, 2000). Somit ist es durchaus denkbar, dass der Transkriptionsfaktor YB-1 durch eine Aktivierung des MDR1-Gens ebenfalls zu einer solchen Stressantwort führen kann. Da YB-1 selbst ein Protein ist, das auf endogene und exogene Stressstimuli mit einer erhöhten Expression reagiert, ist es auch vorstellbar, dass dieses Protein die Fähigkeit besitzt, Zellen auch auf anderem Wege vor genotoxischem Stress zu schützen. Es ist bekannt, dass YB-1 neben dem MDR1-Gen auch eine Reihe anderer Gene in ihrer Expression reguliert, so zum Beispiel MHC-II-Gene (Didier et al., 1988; Ting et al., 1994; Mac Donald et al., 1995) und das MMP2-Gen (Mertens et al., 1998 und 1999). Um vollständig verstehen zu können, auf welche Weise YB-1 zu einer klinischen Medikamenten-Resistenz führt, ist es notwendig, weitere, tiefere Einblicke in die Regulation des MDR1-Gens zu erhalten und vor allen Dingen andere Gene, die durch YB-1 reguliert werden, zu identifizieren, um mögliche Funktionsweisen von YB-1 und Zusammenhänge zwischen den Genen feststellen zu können.

Es ist notwendig, weitere, größere Studien durchzuführen, um die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen zu validieren. Das Wissen um den prädiktiven Wert des YB-1-Proteins im Hinblick auf den Therapieerfolg einer postoperativen Chemotherapie und um die Auswirkungen der YB-1 Expression auf die Entwicklung einer klinischen Medikamenten-Resistenz könnte einen Angriffspunkt für Maßnahmen, die gegen eine Multidrug Resistenz gerichtet sind, bieten. Wenn Wege und Mittel gefunden werden könnten, das YB-1-Protein zu inhibieren, bzw. seinen aktivierenden Einfluß auf das MDR1-Gen und somit dessen Genprodukt, das P-Glykoprotein zu blockieren, wäre somit ein Schritt in Richtung Verhinderung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika getan. Da jedoch die Multidrug Resistenz als ein multifaktorielles Geschehen verstanden werden muss, müssen weitere Faktoren, die Einfluß nehmen auf die Entstehung der Resistenz, identifiziert und eliminiert werden, ehe eine zufriedenstellende Verhinderung der Ausbildung der klinischen Medikamenten-Resistenz erreicht werden kann und somit den Patientinnen die Chance auf einen Therapieerfolg ihrer postoperativen Chemotherapie und auf eine längere krankheitsfreie Überlebenszeit gegeben werden kann.

5.2 YB-1 assoziiert mit Phänotyp größerer Malignität

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass YB-1 in der Tat auch in der Gruppe der Lymphknoten-negativen Brustkrebspatientinnen einen prognostischen Faktor hinsichtlich der postoperativen Überlebenszeit darstellt. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebensraten der Patientinnen mit niedriger und hoher YB-1 Expression. Bei Patientinnen, die nur eine geringe YB-1 Expression aufwiesen, trat kein Rezidiv auf, während bei Patientinnen mit hoher YB-1 Expression die 5-Jahres-Rezidivrate 30 % betrug. YB-1 kennzeichnet somit eine Gruppe mit hohem Risiko bei Brustkrebs-Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie. Die Tatsache, dass nicht nur eine hohe YB-1 Expression in den Tumorzellen, sondern auch eine hohe YB-1 Expression in den peritumoralen Epithelzellen mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, deutet darauf hin, dass die YB-1 Expression im benignen, den Tumor umgebenden Gewebe auf einen anderen, aggressiveren Phänotyp des Tumors hinweist. Wie diese peritumorale YB-1 Expression zustande kommt, ist derzeit nicht bekannt. Es ist jedoch denkbar, dass parakrine Effekte zwischen den Brustkrebszellen und den umgebenden benignen Zellen für dieses Phänomen verantwortlich sind.

Im Patientenkollektiv ohne postoperative Chemotherapie kann die Korrelation zwischen starker YB-1 Expression und schlechter Prognose nicht mit der Ausprägung einer Multiplen Medikamentenresistenz erklärt werden. Vor diesem Hintergrund ist bemerkenswert, dass die Expression des P-Glykoproteins, des Genprodukts des MDR1-Gens, welches in seiner Transkription von YB-1 gesteuert wird, über seine Bedeutung in der Zytostatikaresistenz hinaus mit einem Phänotyp, der mit einer höheren Malignität einhergeht, korreliert (Linn et al.; 1996).

Der prognostische Wert einer YB-1 Überexpression bei Patientinnen, die keine Chemotherapie erhalten haben, deutet darauf hin, dass YB-1 über seine Rolle bei der MDR1-Expression hinaus andere biologische Funktionen ausübt, welche die Entwicklung eines maligneren Phänotyps fördern. Die Ausprägung eines Phänotyps höherer Malignität kann auf verschiedenen Wegen begünstigt werden. Zum Einen ist bekannt, dass YB-1 proliferationsfördernd wirkt. Eine Rolle der Y-Box-Proteine allgemein in der Regulation der Zellproliferation wird vermutet (Ladomery + Sommerville, 1995). In Geweben, in denen eine hohe Zellproliferation zu finden ist, konnten gesteigerte Expressionen von Y-Box-Proteinen beobachtet werden. Dazu zählen unter anderem bestimmte embryonale Gewebe (Spitkovskii et al., 1992), das fetale Lebergewebe oder das Lebergewebe während der Regeneration nach einer Leberverletzung (Tafuri + Wolffe, 1990; Grant + Deeley, 1993; Ito et al., 1994). Außerdem konnte in der stark proliferierenden kolorektalen Schleimhaut eine hohe YB-1 Expression gefunden werden. Im kolorektalen Karzinom wird eine Rolle von YB-1 bei der DNA-Topoisomerase II-alpha Genexpression diskutiert und es zeigte sich eine Korrelation mit der PCNA-Expression (Shibao et al., 1999). Das PCNA, das Proliferierende Zellkern Antigen (proliferating cell nuclear antigen) gehört zu jenen Wachstums-assoziierten Genen, die Y-Box-Sequenzen in ihren Promotor- oder Enhancer-Regionen enthalten und somit vermutlich von Y-Box-Proteinen reguliert werden (Travali et al., 1989). Neben PCNA gehören zu diesen Genen auch die Gene, die für die Thymidinkinase kodieren (Lipson et al., 1989), die DNA-Polymerase alpha (Pearson et al., 1991) und der EGF-Rezeptor (Didier et al., 1988). Über seinen Einfluß auf die Wachstums-assoziierten Gene kann YB-1 durchaus zu einem stärkeren Tumorwachstum und somit zur Ausprägung einer höheren Malignität führen.

Weiterhin ist bekannt, dass YB-1 die Zusammensetzung und die Ausbildung extrazellulärer Matrix beeinflusst. Die Transkription der alpha I- und alpha II- Prokollagen-Gene von Huhn und Ratte wird durch YB-1 aktiviert (Bayarsaihan et al., 1996; Dhalla et al., 1998). Die alpha I- und alpha II-Prokollagene sind Bestandteil des Typ I-Kollagens, das den Hauptbestandteil extrazellulärer Matrix darstellt. Eine Transkriptionsaktivierung der Prokollagen-Gene aufgrund einer YB-1 Überexpression kann folglich zu einer verstärkten Bildung extrazellulärer Matrix und somit im Falle des Brustkrebses zu verstärktem Tumorwachstum führen. Unterstrichen wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass die alpha I- und alpha II-Prokollagene unter verschiedenen pathologischen Bedingungen vermehrt exprimiert werden.

Eine weitere Rolle bei der YB-1 gesteuerten Ausbildung eines Phänotyps höherer Malignität spielt die Assoziation von YB-1 mit der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2). Dabei nimmt YB-1 eine zentrale Rolle in der Aktivierung der MMP2 (=Gelatinase A) - Gene (Mertens et al., 1998; Mertens et al., 1999) ein. YB-1 ist neben AP2 einer jener Faktoren, die für eine Überexpression der Matrix-Metalloproteinase 2 verantwortlich sind. Die MMP2 spielt eine wichtige Rolle in physiologisch kritischen Prozessen, zu denen neben der Angiogenese und der chronischen Entzündung auch die Tumorinvasion und die Metastasierung gehören. Aufgrund des Einflusses von YB-1 bei der Überexpression der MMP2 ist auf diesem Wege der Tumorinvasion und Metastasierung die Ausbildung einer größeren Malignität bei ursprünglich nicht metastasiertem Brustkrebs denkbar, zumal schon festgestellt wurde, dass eine hohe MMP2- Expression im Brustkrebs mit einer gesteigerten Aggressivität des Tumorgewebes korreliert und somit einen prognostischen Faktor für eine kürzere Überlebenszeit darstellt (Talvensaari-Mattila et al., 1998).

Wie oben schon erwähnt, zeigte sich das P-Glykoprotein als ein prognostischer Marker für Tumor-Aggressivität (Pinedo + Giaccone, 1995; Linn et al., 1996). Die Tatsache, dass P-Glykoprotein ein prognostischer Marker abgesehen von der Zytostatikaresistenz auch für die Tumor – Aggressivität ist, kann als ein Hinweis darauf verstanden werden, dass es einen Marker für andere genetische und biologische Veränderungen darstellt. Ebenfalls könnte diese Korrelation dadurch zustande kommen, dass YB-1 über das MDR1-Gen die Expression des P-Glykoproteins reguliert. Es ist durchaus auch denkbar, dass das P-Glykoprotein auf direktem Wege eine Steigerung der Tumoraggressivität hervorrufen kann. Da die Mechanismen einer solchen Erhöhung der Malignität noch nicht verstanden und erforscht sind, sollten auf diesem Gebiet weiterführende Studien eine Antwort auf diese Frage bringen.

Zusammenfassend deuten unsere Beobachtungen bei Patientinnen ohne postoperative Chemotherapie darauf hin, dass YB-1 an der Entstehung eines maligneren Phänotyps beim Mammakarzinom beteiligt ist. Eine Überexpression von YB-1 könnte zu einer verstärkten Tumorproliferation, -invasion und -metastasierung führen. YB-1 stellt also auch bei den Patientinnen, die keine postoperative Chemotherapie erhalten haben, einen negativen

prognostischen Marker hinsichtlich der postoperativen Überlebenszeit dar.

5.3 Korrelation von YB-1 Expression mit etablierten Parametern

Eine Invasion von Tumorzellen wird von mehreren proteolytischen Enzymsystemen induziert, die mit der Zerstörung der Zellmembran und extrazellulärer Matrix assoziiert sind. Zu diesen Systemen gehört auch das Plasminogen-Aktivierungssystem (Gong et al., 2000). Es besteht aus 5 Komponenten, unter denen sich neben dem tPA (tissue-type plasminogen activator), dem PAI-2 (plasminogen activator inhibitor 2) und dem uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) auch der Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ, uPA, und sein Gegenspieler, der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1, PAI-1, befinden. Die Aufgabe dieses Systems besteht in der Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, welches - wie viele andere Enzyme - den Abbau extrazellulärer Matrixproteine in Tumoren katalysiert (Brünner et al., 1994). Außerdem aktiviert Plasmin auch latente Formen einiger Metalloproteasen (Murphy et al., 1992) und beeinflusst verschiedene Wachstumssysteme.

Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Plasminogen-Aktivierungssystem neben der bekannten wichtigen und kausalen Rolle bei der Tumorinvasion ebenfalls im durch Tumorzellen gesteuerten Gewebe-Neuaufbau involviert ist und außerdem die Zellinvasion und -migration durch Plasmin-unabhängige Mechanismen unterstützt (Andreasen et al. , 2000).

Die Plasminogen-Aktivierung durch das uPA-System ist mit der Auflösung extrazellulärer Matrix verbunden. Dies zeigt sich in vielen physiologischen Prozessen, die eine Gewebezerstörung beinhalten, wie zum Beispiel die Trophoblast-Invasion (Sappino et al., 1989; Strickland + Richards, 1992), die postlaktionale Involution der Brustdrüse (Ossowski et al., 1979), die Ruptur der Follikelwand während der Ovulation (Sappino et al., 1989) und in der Wundheilung (Grondahl-Hansen et al., 1988; Romer et al., 1991). Eine ähnliche Rolle des uPA-Systems ist aber auch für den Prozess der Tumorinvasion und -metastasierung nachgewiesen worden. Studien konnten zeigen, dass durch eine spezifische Inhibierung des uPA-Systems eine Tumorinvasion und -metastasierung verhindert werden kann (Ossowski + Reich, 1983; Mignatti et al., 1986; Ossowski 1988). Eine Korrelation der Expression der Komponenten des uPA-Systems mit der Prognose von Brustkrebs-Patientinnen im Hinblick auf die krankheitsfreie und generelle Überlebenszeit ist daher zu vermuten, und der unabhängige prognostische Wert der beiden am besten untersuchten Komponenten uPA und PAI-1 konnte in vielen Studien nachgewiesen werden. Eine hohe Expression von uPA sowie PAI-1 korreliert mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patientinnen (Grondahl-Hansen et al., 1997; Knoop et al., 1998; Harbeck et al., 2000; Foekens et al., 2000; Jänicke et al., 2001). Es gibt in der Literatur Beweise dafür, dass sich uPA und PAI-1 bei Lymphknoten-negativem Mammakarzinom für eine Risikostratifizierung, die eine klinische Relevanz besitzt, eignen (Prechtl et al., 2000; Jänicke et al., 2001). Patientinnen mit einer hohen Expression von uPA und PAI-1 haben ein hohes Rezidiv-Risko und profitieren von einer postoperativen Zytostatikatherapie. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die YB-1 Expression ähnliche prognostische Informationen hinsichtlich des Rezidiv-Risikos bei Patientinnen mit Lymphknoten-negativem Mammakarzinom liefert wie uPA / PAI-1. Beim Patientenkollektiv mit postoperativer Chemotherapie jedoch, bei denen uPA / PAI-1 keine Aussage hinsichtlich eines hohen bzw. niedrigen Rezidiv-Risikos treffen kann, erlaubt YB-1 eine Identifikation jener Patientinnen, die nicht auf eine postoperative, zum größten Teil Anthracyclin-enthaltende, Chemotherapie ansprechen. Es ist demnach vorstellbar, YB-1 als prädiktiven Marker für Hoch-Risiko-Patientinnen mit postoperativer Zytostatikabehandlung einzusetzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es zwar keine signifikante Korrelation gibt zwischen der YB-1 Expression im Tumor und dem PAI-1, dass jedoch die YB-1 Expression in den Tumorzellen grenzwertig signifikant korreliert mit der Expression von uPA und dem Quotienten uPA / PAI-1. Eine hochgradig signifikante Korrelation besteht zwischen den beiden Faktoren uPA und PAI-1. Es stellt sich die Frage, auf welcher Ebene die Faktoren YB-1 und uPA miteinander verbunden sein können. Wie die vorliegende Arbeit schon zeigte, führt eine Überexpression von YB-1 zu einer Ausbildung aggressiverer Tumoren. Da die Expression von uPA durch viele Faktoren, wie Zytokine und Hormone gesteuert wird (Laiho + Keski-Oja, 1989) ist es durchaus denkbar, dass YB-1 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor oder RNA-bindendes Protein an der Steuerung der Expression dieses Faktors beteiligt sein kann. Ein größeres Wissen über die Regulation des

Plasminogen-Aktivierungssystems könnte eine mögliche Verbindung mit YB-1 klären und eine Verwendung der Komponenten des Systems als Ziele für neuartige Therapieansätze erlauben.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Assoziationen zwischen der YB-1 Expression und den etablierten klinischen und histomorphologischen Parametern Tumorgröße, Lymphknotenstatus und histologisches Grading gefunden werden. Es zeigte sich jedoch eine signifikante negative Korrelation zwischen der YB-1 Expression im Tumor und dem Steroidhormonrezeptorstatus. Das bedeutet, dass in den Hormonrezeptor - negativen Tumoren im Mittel eine höhere YB-1 Expression festgestellt werden konnte, als in den Hormonrezeptor - positiven Tumoren. Einzeln betrachtet wies die Korrelation zwischen der YB-1 Expression in den Tumorzellen und dem Progesteronrezeptorstatus eine grenzwertige Signifikanz auf, wohingegen keine signifikante Korrelation zum Östrogenrezeptorstatus besteht. Die Verbindung zwischen dem YB-1 Protein und dem Progesteronrezeptorstatus stellt eine interessante Frage dar, die bisher nicht geklärt ist und vielleicht in weiteren Studien zu beantworten gilt. Möglich ist jedoch, dass Tumoren der Brust durch Steroidhormoneinwirkung bestimmte histologische und biologische Charakteristiken aufweisen, die zu einer geringeren Aggressivität führen können (Delgado + Lubian Lopez, 2001), während YB-1, wie oben diskutiert, zu einer größeren Aggressivität in den Tumoren führen kann. Auf diese Weise ist eine negative Korrelation vorstellbar, wobei sich jedoch die Frage stellt, ob nicht ein direkter Zusammenhang zwischen YB-1 und dem Progesteronrezeptor z.B. durch eine mögliche Transkriptionsregulierung für diese Korrelation verantwortlich ist, sondern ob beide Faktoren indirekt als Zeichen einer erhöhten Malignität hoch- (YB-1), bzw. herunterreguliert (Progesteronrezeptor) werden. Die Reduzierung der Anzahl von Steroidrezeptoren könnte in diesem Sinne ebenfalls als Zeichen der Enddifferenzierung der Tumorzellen und somit als Zeichen höherer Malignität angesehen werden.

5.4 Einfluss der YB-1 Lokalisation auf dessen prognostische Bedeutung

Y-Box-Proteine wurden ursprünglich als nukleäre Proteine beschrieben. Ihre DNA-Bindungsaktivität unterstützte diese Vermutung. Erst später zeigten verschiedene Untersuchungen, wie zum Beispiel an FRGY2, dass Y-Box-Proteine auch im Zytoplasma zu finden sind. Bei der schon oft erwähnten Assoziation des YB-1 mit dem P-Glykoprotein wurde festgestellt, dass eine Korrelation zwischen der Expression von YB-1 und P-gp nur besteht, wenn YB-1 im Nukleus lokalisiert ist (Bargou et al., 1997). Es stellte sich also die Frage, ob YB-1 seine Funktionen hinsichtlich der Ausbildung einer multiplen Medikamenten-Resistenz und der Entwicklung eines Phänotypes größerer Malignität nur in seiner nukleären Lokalisation ausüben kann. Die Bedeutung der Lokalisation von YB-1 für seinen prognostischen Aussagewert ist um so interessanter, da festgestellt wurde, dass im Ovarialkarzinom die nukleäre Expression von YB-1 als ein prognostischer Marker angesehen werden kann (Kamura et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Korrelationen zwischen der Lokalisation und der prognostischen Bedeutung des YB-1 gefunden werden. Jedoch war die untersuchte Kohorte zu klein, als dass statistisch aussagekräftige Erkenntnisse hinsichtlich der Kernlokalisation des YB-1 und ihrer klinischen Bedeutung gefunden werden konnten.

YB-1 stellt ein Nukleinsäure-bindendes Protein dar. Das bedeutet, dass es sowohl DNA als auch RNA binden kann. Somit stehen für das Protein zwei verschiedene Angriffspunkte im Hinblick auf die Regulation der Expression von Genen zur Verfügung. Zum Einen handelt es sich um die Transkription von DNA zu RNA, welche im Kern stattfindet. Zum Anderen ist die Reifung, der Transport der gebildeten RNA sowie die Speicherung und Freisetzung der RNA für die Translation ein Ansatzpunkt für posttranskriptionelle Regulationsmechanismen.

Y-Box-Proteine gehören zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren. Sie können die Transkription sowohl stimulieren als auch hemmen. So wurde festgestellt, dass im Promotor des hsp70-Gens in Oozyten von X. laevis eine Y-Box für die Genexpression essentiell ist (Bienz et al., 1986). Weiterhin konnte eine negative Regulation des YB-1 bei der Transkription von MHC-II-Genen gefunden werden. Es unterdrückt die durch γ-Interferon induzierte Transkription dieser Gene (Didier et al., 1988; Ting et al., 1994; Mac Donald et al., 1995). Eine transkriptionelle Kontrolle durch Y-Box-Proteine konnte auch in Viren nachgewiesen werden. Zum Beispiel erhöht YB-1 die basale Transkription von HTLV-I in T-Lymphozyten (Kashanchi et al., 1994). Auch beim humanen neurotropen JC-Polyoma-Virus ist YB-1 in der Lage, die Transkription zu steigern (Raj et al., 1996).

Da die der nukleären Transkription der DNA folgende Translation der mRNA im Zytoplasma stattfindet, muss ihr ein Transport der gebildeten mRNAs aus dem Nukleus ins Zytoplasma vorausgehen. Dabei ist die mRNA in mRNPs (Ribonukleoprotein-Partikel) verpackt. Die am meisten vorkommenden Proteine in den mRNPs sind Y-Box-Proteine. Bei in vitro-Experimenten konnte festgestellt werden, dass Y-Box-Proteine die Translation unterdrücken, wenn sie in großen Mengen an mRNA gebunden werden (Richter + Smith, 1984; Minich + Ovchinikov, 1992; Minich et al., 1993). Auch in X. laevis wurden Y-Box-Proteine als ein Hauptbestandteil der Verpackung der mRNA gefunden. Die Expression des FRGY2 (ein Y-Box-Protein des X. laevis) fördert die selektive Unterdrückung der Translation der mRNA (Ranjan et al., 1993; Bouvet + Wolffe, 1994).

Y-Box-Proteine sind also in der Lage, sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene in die Expression von Genen einzugreifen und somit deren Expression zu regulieren. Aus diesem Grunde ist es denkbar, dass YB-1 sowohl im Zytoplasma als auch im Kern von Tumorzellen Funktionen ausübt, die zu einem aggressiveren Phänotyp oder zur Zytostatikaresistenz beitragen. Die Tatsache, dass die aufgrund vorausgehender Veröffentlichungen erwartete Bedeutung der Kernlokalisation des YB-1 für seine biologischen Funktionen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte, kann somit plausibel erklärt werden.

5.5 Klinischer Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte zum ersten Mal zeigen, dass das humane Y-Box-Protein YB-1 Aussagen über den klinischen Verlauf von Patientinnen mit Mammakarzinom mit und ohne postoperative Chemotherapie erlaubt. Es konnte festgestellt werden, dass Tumoren, die eine hohe Expression an YB-1 aufweisen, ein schlechtes Ansprechen auf eine postoperative Chemotherapie zeigen, was auf eine Rolle von YB-1 bei der Entstehung der Zytostatikaresistenz deutet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bringt die Forschung im Bereich der Zytostatikaresistenz einen Schritt weiter im Hinblick auf die Entdeckung der Mechanismen der Multidrug Resistenz. Es konnten neue Einblicke in Bereiche der Regulierung der Medikamentenresistenz, die ja multifaktoriell gesteuert wird, der Regulierung der Metastasierung und der Entwicklung aggressiverer Phänotype gewonnen werden. Man kann einen klinischen Ansatzpunkt darin sehen, durch die Entwicklung von Mechanismen, die zu einer Inhibierung der Funktionen und Wirkung des YB-1 führen, die Ausbildung einer klinischen Medikamentenresistenz zu verhindern bzw. zu reduzieren. Die Bedeutung dieser Mechanismen muss im Zusammenhang mit den anderen, die Zytostatikaresistenz beeinflussenden und regulierenden, Faktoren gesehen werden. Es ist wichtig, einen Gesamtblick auf das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren werfen zu können, um Zusammenhänge zu verstehen und mit der Voraussetzung des Begreifens der Regulationsmechanismen Möglichkeiten und Ansatzpunkte zur Intervention und Inhibierung der Multiplen Medikamentenresistenz, die eventuell medikamentös vorstellbar wäre, finden zu können. Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des YB-1 Proteins helfen weiter, diese Zusammenhänge zu verstehen und liefern Ansatzpunkte für weitere Forschungsarbeiten.

Im klinischen Alltag werden zur Erstellung individuell angepasster Therapieschemata adäquate Risikoklassifizierungen vorgenommen, die das mögliche Ansprechen auf eine Therapie vorauszusagen vermögen. Es gibt eine Reihe von etablierten und neuen biologischen Tumorfaktoren wie z.B. Lymphknotenstatus, Tumorgröße, histologisches Grading und uPA / PAI-1, die derzeit zur Einteilung in Risikogruppen verwendet werden. Solche prädiktiven Marker sind jedoch noch von geringer Anzahl. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf die Prognose und Prädiktion beim Mammakarzinom. YB-1 zeigte sowohl prognostischen als auch prädiktiven Wert bei der Beurteilung von Hoch-Risiko-Patientinnen mit und ohne postoperative Zytostatikatherapie und war dabei unabhängig von biologischen Tumorfaktoren, die zur Zeit für die Risikoklassifizierung eingesetzt werden. Um die Ergebnisse zu prüfen und zu sichern, sind jedoch noch weitere Studien erforderlich, die zum Einen prospektiver Natur sein und deren Patientenanzahlen um ein Vielfaches höher liegen sollten. Eine retrospektive Studie, die mit einer relativ geringen Anzahl an Patientinnen durchgeführt wurde, muss durch weitere Studien abgesichert werden.

Der prognostische und prädiktive Wert des YB-1 Proteins im Mammakarzinom könnte bei der klinischen Entscheidung der Behandlungsform des Tumors unterstützend eingreifen. Aufgrund der

im Resektat festgestellten YB-1 Expression könnten somit individuelle Therapiekonzepte erstellt werden, bei denen zum Beispiel bei Feststellung einer hohen YB-1 Expression Alternativen zu einer postoperativen Chemotherapie oder zu den gängigen Medikamentenschemata gefunden werden müssen. Im umgekehrten Fall könnte zum Beispiel Patientinnen, die eine geringe YB-1 Expression sowohl im Tumor, als auch im peritumoralen benignen Brustepithel aufweisen und nicht zur Gruppe der Niedrig-Risiko-Patientinnen gehören, zu einer adjuvanten Chemotherapie geraten werden, da diese Patientinnen eine äußerst gute Prognose hinsichtlich des Ansprechens ihrer Therapie haben.

YB-1 könnte helfen, eine individuelle Patienenprognose zu treffen. Es könnte aufgrund seines prognostischen und prädiktiven Wertes Aussagen über eine wahrscheinliche oder mögliche Metastasierung, das Auftreten eines Rezidivs, das Ansprechen einer postoperativen Chemotherapie und die krankheitsfreie bzw. generelle postoperative Überlebenszeit treffen. Zum Beispiel könnte es Patientinnen die Entscheidung für oder gegen eine geplante postoperative Chemotherapie erleichtern, wenn diese über eventuelle Tendenzen hinsichtlich des Ansprechens oder des Scheiterns dieser Therapie informiert werden könnten. Patientinnen, bei denen schon im Voraus eine wahrscheinliche Metastasierung oder ein Rezidiv angenommen wird, könnten schon frühzeitig auf eine solche Situation mit Hilfe eines psychologischen Beistandes vorbereitet werden. Gleichfalls könnten durch verschärfte Kontrollen von Risikopatientinnen eventuelle Rezidive schon im Frühstadium erkannt und über eine Rezidiv-spezifische Therapie nachgedacht werden.

Die Bedeutung des YB-1 für die Klinik liegt hauptsächlich in seinem prognostischen und prädiktiven Wert. YB-1 liefert zusätzlich Informationen über die Regulation der Multiplen Klinischen Medikamentenresistenz, deren differenzierte Zusammenhänge weiterhin erforscht werden müssen, damit eine klinische Relevanz gesichert werden kann.

6 Literaturverzeichnis

ABRAHAM, I.; CHIN, K.V.; GOTTESMAN, M.M.; MAYO, J.K.; SAMPSON, K.E. 1990 Transfection of a mutant regulatory subunit gene of cAMP-dependent protein kinase causes increased drug sensitivity and decreased expression of P-glycoprotein. Experimental cell research *189* 133-141

AMADA, S.; NAKANO, H.; TSUNEYOSHI, M. 1995 Leiomyosarcoma versus bizarre and cellular leiomyomas of the uterus: a comparative study based on the MIB-1 and proliferating cell nuclear antigen indices, p53 expression, DNA flow cytometry, and muscle specific actins. International journal of gynecological pathology *14* 134-142

AMBUDKAR, S.V.; LELONG, I.H.; ZHANG, J.; CARDARELLI, C.O.; GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. 1992 Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *89* 8472-8476

ANDREASEN, P.A.; GEORG, B.; LUND, L.R.; RICCIO, A.; STACEY, S.N. 1990 Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. Molecular Cell Endocrinology *68* 1-19

ANDREASEN, P.A.; EGELUND, R.; PETERSEN, H.H. 2000 The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. Cellular and Molecular Life Sciences *57* 25-40

ASAKUNO, K.; KOHNO, K.; UCHIUMI, T.; KUBO, T.; SATO, S.; ISONO, M.; KUWANO, M. 1994 Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1 YB-1, in human MDR 1 gene in expression by Actinomycin D. Biochemical and biophysical research communications *199* 1428-1435

AZZARIA, M.; SCHURR, E.; GROS, P. 1989 Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the mdr1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance. Molecular cell biology *9* 5289-5297

BARGOU, R.C.; JÜRCHOTT, K.; WAGENER, C.; BERGMANN, S.; METZNER, S.; BOMMERT, K.; MAPARA, M.Y.; WINZER, K.-J.; DIETEL, M.; DÖRKEN, B.; ROYER, H.-D. 1997 Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 inprimary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. Nature Medicine *4* 447-450

BAYARSAIHAN, D.; ENKHMANDAKH, B.; LUKENS, L.N. 1996 Y-box proteins interact with the S1 nuclease-sensitive site in the chicken alpha 2 (I) collagen gene promoter. Biochemistry Journal *319* 203-207

BECK, T.; WEIKEL, W.; BRUMM, C.; WILKENS, C.; POLLOW, K.; KNAPSTEIN, P.G. 1994 Immunohistochemical detection of hormone receptors in breast carcinomas (ER-ICA, PgR-ICA): prognostic usefulness and comparison with the biochemical radioactive-ligand-binding assay (DCC). Gynecological Oncology *53* 220-227

BIENZ, M. 1986: A CCAAT box confers cell-type-specific regulation on the Xenopus hsp70 gene in oocytes. Cell *46* 1037-1042

BOUVET, P.; WOLFFE, A.P. 1994 A role for trnascription and FRGY2 in masking maternal mRNA within Xenopus oocytes. Cell *77* 931-941

BOUVET, P.; MATSUMOTO, K.; WOLFFE, A.P. 1995 Sequnece-specific RNA recognition by Xenopus Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. Journal of biological chemistry *270* 28297-28303

BRADLEY, G.; LING, V. 1994 P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression. Cancer Metastasis Rev *13* 223-233

BRÜNNER, N.; PYKE, C.; HANSEN, C.H.; ROMER, J.; GRONDAHL-HANSEN, J.; DANO, K. 1994 Urokinase plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1): Regulators of proteolysis during cancer invasion and prognostic parameters in breast cancer. Cancer Treatment and Research *71* 299-309

CHIN, K.V.; CHAUHAN, S.S.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M.M. 1990 Regulation of mdr RNA levels in response to cytotoxic drugs in rodent cells. Cell growth and differentiation *1* 361-365

CHIN, K.V.; TANAKA, S.; DARLINGTON, G.; PASTAN, I.; GOTTESMAN; M.M. 1990 Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. Journal of biological chemistry *265* 221-226

CHIN, K.-V.; UEDA, K.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M.M. 1992 Modulation of activity of the promoter of the human MDR 1 gene by Ras and p53. Science *255* 459-462

CLEAVINGER, P.J.; SHIN, B.A.; KANDALA, J.C.; NAMBIAR, A.; SWAMYNATHAN, S.K.; GUNTAKA, R.V. 1996 Cloning of Rous sarcoma virus enhancer factor genes. II. RSV-EF-II, abundantly expressed in fibroblasts and muscle tissue, binds to an octamer sequence, 5'-GTACCACC-3', in the noncoding strand of RSV enhancer. Virology *222* 133-143

DELGADO, R.C.; LUBIAN LOPEZ, D.M. 2001 Prognosis of breast cancer detected in women receiving hormone replacement therapy. Maturitas *38* 147-156

DE OLIVIERA, D.E.; SEURINCK, J.; INZE, O.; MONTAGU, M.; BOTTERMAN, J. 1990 Differential expression of five Arabidopsis genes encoding glycine-rich proteins. Plant. Cell. *2* 427-436

DHALLA, A.K.; RIRIE, S.S.; SWAMYNATHAN, S.K.; WEBER, K.T.; GUNTAKA, R.V. 1998 Chk-Yb-1b, a Y-box binding protein activates transcription from rat alpha 1 (I) procollagen gene promoter. Biochemistry Journal *336* 373-379

DIDIER, D.K.; SCHIFFENBAUER, J.; WOULFE, S.L.; ZACEIS, M.; SCHWARTZ, B.D. 1988 Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *85* 7322-7326

DORN, A.; DURAND, B.; MARFLING, C.; LE MEUR, M.; BENOIST, C.; MATHIS, D. 1987 The conserved MHC class II boxes –X and Y are transcriptional control elements and specifically bind nuclear proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *84* 6249-6253

FIRULLI, A.B.; MAIBENCO, D.C.; KINNIBURGH, A.J. 1992 The identification of a tandem H-DNA structure in the c-myc nuclease sensitive promoter element. Biochemical and biophysical research communications *185* 264-270

FOEKENS, J.A.; PETERS, H.A.; LOOK, M.P.; PORTENGEN, H.; SCHMITT, M.; KRAMER, M.D.; BRUNNER, N.; JANICKE, F.; MEIJER-van-GELDER, M.E.; HENZEN-LOGMANS, S.C.; van-PUTTEN, W.L.; KLIJN, J.G. 2000 The urokinase system os plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. Cancer Research *60* 636-643

GOLDSMITH, M.E.; MADDEN, M.J.; MORROW, C.S.; COWAN, K.H. 1993 A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (MDR1) gene. Journal of biological chemistry *268* 5856-5860

GOLDSTEIN, L.J.; GALSKI, H.; FOJO, A.; WILLINGHAM, M.; LAI, S.L.; GAZDAR, A.; PIRKER, R.; GREEN, A.; CRIST, W.; BRODEUR, G.M. 1989 Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. Journal of the National Cancer Institute *81* 116-124

GONG, S.J.; RHA, S.Y.; CHUNG, H.C.; YOO, N.C.; ROH, J.K.; YANG, W.I. LEE, K.S.; MIN, J.S.; KIM, B.S.; CHUNG, H.C. 2000 Tissue urokinase-type plasminogen activator receptor levels in breast cancer. International Journal of Molecular Medicine *6* 301-305

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. 1988 Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. Trends in pharmacological sciences *9* 54-58

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. 1988 The multidrug transporter, a double-edged sword. Journal of biological chemistry *263* 12163-12166

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. 1993 Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Annual review of biochemistry *62* 385-427

GRANT, C.E.; DEELAY, R.G. 1993 Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. Molecular cell biology *13* 4186-4196

GRONDAHL-HANSEN, J.; LUND, L.R.; RALFKIAER, E.; OTTEVANGER, V.; DANO, K. 1988 Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratocytes during wound reepithelialization in vivo. Journal of Investigative Dermatology *90* 790-795

GRONDAHL-HANSEN, J.; HILSENBECK, S.G.; CHRISTENSEN, I.J.; CLARK, G.M.; OSBORNE, C.K.; BRÜNNER, N. 1997 Prognostic significance of PAI-1 and uPA in cytosolic extracts obtained from node-positive breast cancer patients. Breast Cancer Research and Treatment *43* 153-163

HAMADA, S.; KAMADA, M.; FURUMOTO, H.; HIRAO, T.; AONO, T. 1994 Expression of glutathione S-transferase-pi in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy. Gynecological oncology *52* 313-319

HARBECK, N.; DETTMAR, P.; THOMSSEN, C.; BERGER, U.; ULM, K.; KATES, R.; JÄNICKE, F.; HÖFLER, H.; GRAEFF, H.; SCHMITT, M. 1999a Riskgroup discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: six-year median follow-up. British Journal of Camcer *80* 419-426

HARBECK, N.; THOMSSEN, C.; BERGER, U.; ULM, K.; KATES, R.; HÖFLER, H.; JÄNICKE, F.; GRAEFF, H.; SCHMITT, M. 1999b Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for for primary breast cancer and following first relapse. Breast Cancer Research Treatment *54* 147-157

HARBECK, N.; ALT, U.; BERGER, U.; KATES, R.; KRUGER, A.; THOMSSEN, C.; JANICKE, F.; GRAEFF, H.; SCHMITT, M. 2000 Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. International Journal of Biological Markers *15* 79-83

HARRIS, A.L.; HOCHHAUSER, D. 1992 Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. Acta Oncologica *31* 205-213

HONKOOP, A.H.; VAN DIEST, P.J.; DE JONG, J.S.; LINN, S.C.; GIACCONE, G.; HOEKMAN, K.; WAGSTAFF, J.; PINEDO, H.M. 1998 Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. British Journal of Cancer *77* 621-626

ISE, T.; NAGATANI, G.; IMAMURA, T.; KATO, K.; TAKANO, H.; NOMOTO, M.; IZUMI, H.; OHMORI, H.; OKAMOTO, T.; OHGA, T.; UCHIUMI, T.; KUWANO, M.; KOHNO, K. 1999 Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. Cancer research *59* 342-346

ITO, K.; TSUTSUMI, K.; KUZUMAKI, T.; GOMEZ, P.F.; OTSU, K.; ISHIKAWA, K. 1994 A novel growth-inducible gene that encodes a protein with a conserved cold-shock domain. Nucleic Acids Research *22* 2036-2041

ITO, K.; FUJIMORI, M.; NAKATA, S.; HAMA, Y.; SHINGU, K.; KOBAYASHI, S.; TSUCHIYA, S.; KOHNO, K.; KUWANO, M.; AMANO, J. 1998 Clinical significance of the increased multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression in patients with primary breast cancer. Oncol-Res. *10* 99-109

JANZ, M.; HARBECK, N.; DETTMAR, P.; BERGER, U.; SCHMIDT, A.; JÜRCHOTT, K.; SCHMITT, M.; ROYER, H.-D. 2002 Y-Box factor YB-1 predicts Drug Resistence and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biological factors HER2, uPA and PAI-1. International Journal of Cancer *97* 278-282

JÄNICKE, F.; PRECHTL, A.; THOMSSEN, C.; HARBECK, N.; MEISNER, C.; UNTCH, M.; SWEEP, C.G.J.F.; SELBMANN, H.-K.; GRAEFF, H.; SCHMITT, M. 2001 Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. Journal of the National Cancer Institute *93* 913-920

JÜRCHOTT, K.: Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und zu den Funktionen von YB-1, einem Y-Box-Protein in Säugerzellen. Dissertationsarbeit zur Erlangung des Dr.rer.nat.

KAMURA, T.; YAHATA, H.; AMADA, S.; OGAWA, S.; SONODA, T.; KOBAYASHI, H.; MITSUMOTO, M.; KOHNO, K.; KUWANO, M.; NAKANO, H. 1999 Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in Ovarian Serous Adenocarcinoma? Cancer *85* 2450-2454

KASAHARA, K.; FUJIWARA, Y.; NISHIO, K.; OHMORI, T.; SUGIMOTO, Y.; KOMIYA, K. 1991 Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer lines to cisplatin. Cancer research *51* 3237-3242

KASHANCHI, F.; DUVALL, J.F.; DITTMER, J.; MIRESKANDARI, A.; REID, R.L.; GITLIN, S.D.; BRADY, J.N. 1994 Involvement of transcription factor YB-1 in human T-cell lymphotropic virus type I basal gene expression. Journal of virology *68* 561-565

KAYE, S.B. 1997 Multidrug Resistence in Breast Cancer – Is The Jury In Yet? Journal of the National Cancer Institute *89* 902-903

KNOOP, A.; ANDREASEN, P.A.; ANDERSEN, J.A.; HANSEN, S.; LAENKHOLM, A.V.; SIMONSEN, A.C.; ANDERSEN, J.; OVERGAARD, J.; ROSE, C. 1998 Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. British Journal of Cancer *77* 932-940

KOHNO, K.; TANIMURA, H.; SATO, S.; NAKAYAMA, Y.; MAKINO, Y.; WADA, M.; FOJO, A.T.; KUWANO, M. 1994 Cellular control of human multidrug resistance 1 (mdr1) gene expression in absence and presence of gene amplification in human cancer cells. Journal of biological chemistry *269* 20503-20508

KOIKE, K.; UCHIUMI, T.; OHGA, T.; TOH, S.; WADA, M.; KOHNO, K.; KUWANO, M. 1997 Nuclear localization of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. FEBS-Letters *417* 390-394

KOLLURI, R.; TORREY, T.A.; KINNIBURGH, A.J. 1992 A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. Nucleic acids research *20* 111-116

KONDO, K.; INOUYE, M. 1991 TIP1, a cold shock inducible gene of Saccharomyces cerevisiae. Journal of biological chemistry *266* 17537-17544

KONDO, K.; INOUYE, M. 1992 Yeast NSR1 protein that has structural similarity to mammalian nucleolus is involved in pre-rRNA processing. Journal of biological chemistry *267* 16252-16258

KONDO, K.; KOWALSKI, L.R.Z.; INOUYE, M. 1992 Cold induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing. Journal of biological chemistry *267* 16259-16265

LADOMERY, M.; SOMMERVILLE, J. 1994 Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains. Nucleic acids research *22* 5582-5589

LADOMERY, M.; SOMMERVILLE, J. 1995 A role for Y-box proteins in cell proliferation. Bio Essays *17* 9-11

LAIHO, M.; KESKI-OJA, J. 1989 Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. Cancer Research *49* 2533-2553

LANDSMAN, D. 1992 RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. Nucleic acids research *20* 2861-2864

LEHNERT, M. 1998 Chemotherapy resistance in breast cancer. Anticancer Research *18* 2225-2226

LINN, S.C.; HONKOOP, A.H.; HOEKMAN, K.; VAN-DER-VALK, P.; PINEDO, H.M.; GIACCONE, G. 1996 p53 and P-glycoprotein are often co-expressed and are associated with poor prognosis in breast cancer. British journal of cancer *74* 63-68

LINN, S.C.; PINEDO, H.M.; VAN ARK-OTTE, J.; VAN-DER-VALK, P.; HOEKMAN, K.; HONKOOP, A.H.; VERMORKEN, J.B.; GIACCONE, G. 1997 Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. International Journal of Cancer *71* 787-795

LIPSON, K.E.; CHEN, S.T.; KONIECKI, J.; KU, D.-H.; BASERGA, R. 1989 S-phase specific regulation by deletion mutants of the human thymidine promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *86* 6848-6852

MAC DONALD, G.H.; ITOH-LINDSTROM, Y.; TING, J.P. 1995 The transcriptional regulatory protein , YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. Journal of biological chemistry *270* 3527-3533

MAQUAT, M.E. 1991 Nuclear mRNA export. Current opinions in cell biology *3* 1004-1012

MERTENS, P.R.; ALFONSO-JAUME, M.A.; STEINMANN, K.; LOVETT, D.H. 1998 A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. Journal of Biological Chemistry *273* 32957-32965

MERTENS, P.R.; ALFONSO-JAUME, M.A.; STEINMANN, K.; LOVETT, D.H. 1999 YB-1 regulation of the human and rat gelatinase A genes via similar enhancer elements. Journal of the American Society of Nephrology *10* 2480-2487

MIGNATTI, P.; ROBBINS, E.; RIFKIN, D.B. 1986 Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. Cell *47* 487-498

MINICH, W.B.; OVCHINIKOV, L.P. 1992 Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. Biochemie (Paris) *74* 477-483

MINICH, W.B.; MAIDEBURA, I.P.; OVCHINIKOV, L.P. 1993 Purification and characterization of the major 50 kDa repressor protein from cytoplasmic mRNP of rabbit reticulocytes. European journal of biochemistry *212* 633-638

MURRAY, M.T.; SCHILLER, D.L.; FRANKE, W.W. 1992 Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of Xenopus oocytes identifies a family of RNA-binding proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *89* 11-15

NEWKIRK, K.; FENG, W.; JIANG, W.; TEJERO, R.; EMERSON, S.D.; INOUYE, M.; MONTELIONE, G.T. 1994 Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from Escherichia coli: identification of a binding epitope for DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91* 5114-5118

NOGAE, I.; KOHNO, K.; KIKUCHI, J.; KUWANO, M.; AKIYAMA, S.-I.; KIUE, A.; SUZUKI, K.; YOSHIDA, Y.; CORNWELL, M.M.; PASTAN, I. et al. 1989 Analysis of structural features of dihydropyridine analogs needed to reverse multidrug resistance and to inhibit photoaffininty labeling of P-glycoprotein. Biochemical pharmacology *38* 519-527

NOOTER, K.; STOTER, G. 1996 Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. Pathology, research and practice *192* 768-780

OBOKATA, J.; OHME, M.; HAYASHIDA, N. 1991 Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a putative glycine-rich protein of 19.7 kDa in Nicotiana sylvestris. Plant. Mol. Biol. *17* 953-955

OHGA, T.; KOIKE, K.; ONO, M.; MAKINO, Y.; ITAGAKI, Y.; TANIMOTO, M.; KUWANO, M.; KOHNO, K. (1996): Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. Cancer research *56*, S. 4224-4228

OSSOWSKI, L.; BIEGEL, D.; REICH, E. 1979 Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. Cell *16* 929-940

OSSOWSKI, L.; REICH, E. 1983 Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. Cell *35* 611-619

OSSOWSKI, L. 1988 In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bond urokinase. Journal of Biology *107* 2437-2445

PEARSON, B.E.; NASHEUER, H.-P.; WANG, T.S.F. 1991 Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. Molecular Cell Biology *11* 2081-2095

PINEDO, H.M.; GIACCONE, G. 1995 P-glycoprotein-a marker of cancer-cell behaviour. New England Journal of Medicine *333* 1417-1419

PINOL-ROMA, S.; DREYFUSS, G. 1992 Shutting of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. Nature *355* 730-732

PRECHTL, A.; HARBECK, N.; THOMSSEN, C.; MEISNER, C.; BRAUN, M.; UNTCH, M. et al. 2000 Tumor-biological factors uPA and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node-negative breast cancer. International Journal of Biological Markers *15* 73-78

RAJ, G.V.; SAFAK, M.; MAC DONALD, G.H.; KHALILI, K. 1996 Transcriptional regulation of human polyomavirus JC: evidence for a functional interaction between RelA (p65) and the Y-box-binding protein, YB-1. Journal of virology *70* 5944-5953

RANJAN, M.; TAFURI, S.R.; WOLFFE, A.P. 1993 Masking mRNA from translation in somatic cells. Genes & Development *7* 1725-1736

RICHTER, J.D.; SMITH, L.D. 1984 Reversible inhibition of translation by Xenopus oocyte specific proteins. Nature *309* 378-380

ROMER, J.; LUND, L.R.; ERIKSEN, J.; RALFKIAER, E.; ZEHEB, R.; GELEHRTER, T.D.; DANO, K.; KRISTENSEN, P. 1991 Differential expression of urokinase-type plasminogen activator and its type-1 inhibitor during healing of mouse skin wounds. Journal of Investigative Dermatology *97* 803-811

ROSS, D.D.; YANG, W.; ABRUZZO, L.V.; DALTON, W.S.; SCHNEIDER, E.; LAGE, H.; DIETEL, M.; GREENBERGER, L.; COLE, S.P.; DOYLE, L.A. 1999 Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. Journal of the National Cancer Institute *91* 429-433

SANFILIPPO, O.; RONCHI, E.; DE-MARCO, C.; DI-FRONZO, G.; SILVESTRINI, R. 1991 Expression of P-glycoprotein in breast cancer tissue and in vitro resistance to doxorubicine and vincristine. European Journal of Cancer *27* 155-158

SAPPINO, A.P.; HUARTE, J.; BELIN, D.; VASSALLI, J.D. 1989 Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. Journal of Cellular Biology *109* 2471-2479

SARKADI, B.; PRICE, E.M.; BOUCHER, R.C.; GERMANN, U.A.; SCARBOROUGH, G.A. 1992 Expression of the multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. Journal of biological chemistry *267* 4854-4858

SCHMITT, M.; THOMSSEN, C.; ULM, K.; SEIDERER, A.; HARBECK, N.; HÖFLER, H.; JÄNICKE, F.; GRAEFF, H. 1997 Time varying prognostic impact of tumor biological factors urokinase (uPA), PAI-1, and steroid hormone receproor status in primary breast cancer. British Journal of Cancer *76* 306-311

SCHNEIDER, J.; RUBIO, M.P.; BARBAZAN, M.J.; RODRIGUEZ-ESCUDERO, F.J.; SEIZINGER, B.R.; CASTRESANA, J.S. 1994 P-glycoprotein, HER-2 / neu and mutant p53 expression in human gynecologic tumors. Journal of National Cancer Institute *86* 850-855

SCHNUCHEL, A.; WILTSCHECK, R.; CZISCH, M.; HERRLER, M.; WILLIMSKY, G.; GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M.A.; HOLAK, T.A. 1993 Structure in solution of the major cold-shock protein from Bacillus subtilis. Nature *364* 169-171

SCHINDELIN, H.; MARAHIEL, M.A.; HEINEMANN, U. 1993 Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the B.subtilis major cold-shock protein. Nature *364* 164-168

SCHINDELIN, H.; JIANG, W:; INOUYE, M.; HEINEMANN, U. 1994 Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91* 5119-5123

SERAFINO, A.; SINIBALDI-VALLEBONA, P.; GAUDIANO, G.; KOCH, T.H.; RASI, G.; GARACI, E.; RAVAGNAN, G. 1998 Cytoplasmatic localization of anthracycline antitumor drugs conjugated with reduced glutathione: a possible correlation with multidrug resistance mechanisms. Anticancer-Research *18* 1159-1166

SHIBAO, K.; TAKANO, H.; NAKAYAMA, Y.; OKAZAKI, K.; NAGATA, N.; IZUMI, H.; UCHIUMI, T.; KUWANO, M.; KOHNO, K.; ITO, H. 1999 Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II genes in human colorectal carcinomas. International Journal of Cancer *83* 732-737

SPITKOVSKII, D.D.; ROYER-POKORA, B.; DELIUS, H.; KISSELJOV, F.; JENKINS, N.A.; GILBERT, D.J.; COPELAND, N.G.; ROYER, H.-D. 1992 Tissue restricted expression and chromosomal localization of the YB-1 gene encoding a 42 kD nuclear CCAAT binding protein. Nucleic Acids Research *20* 797-780

SPITKOVSKII, D.D.; ROYER, H.D.; MAZURENKO, N.N.; MIKHALEVA, I.I.; PRUDCHENKO, I.A:; KORBUKH, I.A. 1993 In vivo identification of YB-1 protein, interacting with the enhancer of human papillomavirus (HPV) type 18, using antibodies to a synthetic peptide. Molecular biology of Moskow *27* 81-91

STRICKLAND, S.; RICHARDS, W.G. 1992 Invasion of the trophoblasts. Cell *71* 355-357

SUKHAI, M.; PIQUETTE-MILLER, M. 2000 Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals. Journal of Pharmacology and Pharmacological Sciences *3* 268-280

TAFURI, S.R.; WOLFFE, A.P. 1990 Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *87* 9028-9032

TAFURI, S.R.; WOLFFE, A.P. 1992 DNA binding, multimerization and transcription stimulation by the Xenopus Y box proteins in vitro. New Biologist *4* 349-359

TAFURI, S.R.; WOLFFE, A.P. 1993 Selectice recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). Journal of biological chemistry *268* 24255-24261

TALVENSAARI-MATTILA, A.; PAAKKO, P.; HOYHTYA, M.; BLANCO-SEQUEIROS, G.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. 1998 Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. Cancer *83* 1153-1162

TING, J.P.; PAINTER, A.; ZELEZNIK-LE, N.J.; MAC DONALD, G.; MOORE, T.M.; BROWN, A.; SCHWARTZ, B.D. 1994 YB-1 DNA-binding protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes. Journal of experimental medicine *179* 1605-1611

TRAVALI, S.; KU, D.H.; RIZZO, M.G.; OTTAVIO, L.; BASERGA, R. 1989 Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. Journal of Biological Chemistry *264* 7466-7472

VAN NOCKER, S.; VIERSTRA, R.D. 1993 Two cDNAs from Arabidopsis thaliana encode putative RNA binding proteins containing glycine-rich domains. Plant. Mol. Biol. *21* 695-699

VERELLE P.; MEISSONNIER, F.; FONCK, Y.; FEILLEL, V.; DIONET, C.; KWIATKOWSKI, F.; PLAGNE, R.; CHASSAGNE, J. 1991 Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma. Journal of National Cancer Institute *83* 111-116

WOLFFE, A.P.; TAFURI, S.; RANJAN, M.; FAMILARI, M. 1992 The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from Escherichia coli to man. New Biologist *4* 290-298

WOLFFE, A.P. 1994 Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. Bio Essays *16* 245-251

WOLFFE, A.P.; MERIC, F. 1996 Coupling transcription to translation: a novel site for the regulation of eukaryotic gene expression. International journal of biochemical cell biology *28* 247-257

ZAMORA, J.M.; PEARCE, H.L.; BECK, W.T. 1988 Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells. Molecular pharmacology *33* 454-462

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe “Zellzyklusregulation” am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin angefertigt. Bedanken möchte ich mich bei dem Leiter dieser Gruppe, PD Dr. habil. Hans-Dieter Royer, für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, die auch noch nach Entstehung einer örtlichen Distanz ihre Fortsetzung fand.

Ein großer Dank gilt auch Dr. med. Martin Janz für die konstruktive Zusammenarbeit und seine wertvollen Hinweise, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch Sylvia Metzner, die mir in einer sehr angenehmen Art und Weise die Methode der APAAP-Färbung beigebracht hat und immer ein offenes Ohr für Fragen besaß.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Manfred Schmitt und anderen Mitarbeitern der Frauenklinik der Technischen Universität München, die im Rahmen einer guten wissenschaftlichen Zusammenarbeit Untersuchungsmaterialen von guter Qualität zur Verfügung stellten.

Frau PD Dr. med. Nadia Harbeck von der Frauenklinik der Technischen Universität München und Frau Ursula Berger vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München gilt ein großer Dank für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Für die Bereitstellung der erfassten Tumoreigenschaften möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München bedanken.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern, die meinem Bruder und mir eine umfassende schulische Ausbildung und mir das Medizinstudium ermöglichten.

Ein großer Dank gilt meinem Mann, Detlef, für die Ermöglichung meines Medizinstudiums, seine allseitige Unterstützung und Liebe und für seine stete Ermunterung zur Vollendung dieser Arbeit.

Danke auch meinen Kindern, Lukas und Sophie, dass es sie gibt und dass sie schon mit ihrer bloßen Anwesenheit das Leben erhellen.

Lebenslauf

03. August 1974	geboren in Frankfurt / Oder
September 1981 - Juni 1994	Besuch von Grundschule und Gymnasium in Frankfurt / Oder, Potsdam und Berlin
Juni 1994	Abitur in Berlin
Seit Oktober 1994	Studium der Medizin an der Humboldt – Universität zu Berlin
15. August 1997	Heirat mit Detlef Schmidt in Berlin
August 1997	1. Staatsexamen in Berlin
Mai 1998	Beginn meiner wissenschaftlichen Arbeit in der Arbeitsgruppe „Zellzyklusregulation“ des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin
August 1999	2. Staatsexamen in Berlin
Oktober 1999 – September 2002	Beurlaubungssemester zur Geburt und Betreuung meiner Kinder
21. Februar 2000	Geburt meines Sohnes Lukas in Berlin
21. September 2001	Geburt meiner Tochter Sophie in Berlin
Januar 2002	Publikation im International Journal of Cancer 97, S.278-282
Oktober 2002	Beginn des Praktischen Jahres im UKBF

Eidestattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anja Schmidt, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe und nur die von mir aufgeführten Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden. Außerdem erkläre ich, dass die Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt.