

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT

Direktor: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen
Ludwig-Maximilians-Universität München

Habilitationsschrift

Die Rolle des EGR/NAB2/p130Cas Signaltransduktions-Netzwerks in der Progression und Therapieresistenzentwicklung von Tumoren – Identifikation von Biomarkern und therapeutischen Zielen

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Jörg Kumbrink

2022

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Biomarker und zielgerichtete Therapieansätze bei soliden Tumoren.....	3
1.2 Charakteristika von Tumorzellen und Krebs-assoziierte Signaltransduktionswege.....	4
1.3 Die Rolle des Signalmoleküls p130Cas in der Tumorprogression und Metastasierung.....	6
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2 Zusammenfassung und Diskussion themenbezogener eigener Arbeiten.....	10
2.1 Die Rolle des EGR/NAB2/p130Cas Signaltransduktions-Netzwerks in der Progression und Therapieresistenzentwicklung von Tumoren.....	10
2.2 Ansätze zur p130Cas-Inhibition in Mammakarzinomen.....	16
2.3 Die Bedeutung von p130Cas in kolorektalen Karzinomen.....	21
2.4 Identifikation von molekularen Prognosefaktoren und therapeutischen Zielen für Fernmetastasen bei prämenopausalen Patientinnen mit frühem HR+/HER2-Brustkrebs.....	24
3 Ausblick.....	27
4 Literaturverzeichnis.....	28
5 Danksagung.....	36
6 Originalarbeiten.....	37

Zusammenfassung

Das *breast cancer antiestrogen resistance 1 (BCAR1)* -Gen kodiert für das Adapterprotein *p130 Crk-associated substrate (Cas)*, welches als Knotenpunkt für Signalprotein-Komplexe dient, die Signaltransduktionswege kontrollieren, welche in Tumorzellen häufig dereguliert sind. Unter anderem interagiert p130Cas mit den Kinasen der Src-Familie, der *focal adhesion kinase (FAK)* und *phosphoinositide 3-kinase (PI3K)* und ist dadurch an der Kontrolle der Aktivität der *rat sarcoma (RAS) /extracellular signal regulated kinase (ERK)*, PI3K und *c-Jun N-terminal kinases (JNK)* Signalwege beteiligt. Eine starke Überexpression oder Überaktivierung von p130Cas, die mit Tumorprogression und Therapieresistenz einherging, wurde zunächst in Mammakarzinomen und in den letzten Jahren auch in anderen Tumorentitäten beschrieben.

Im Rahmen des Habilitationsprojektes wurden die Mechanismen der Überexpression von p130Cas und der damit assoziierten Therapie-Resistenz-Entstehung in verschiedenen Krebsentitäten untersucht. Außerdem wurden Ansätze zur zielgerichteten p130Cas-Inhibition auf ihre Wirksamkeit geprüft.

Es konnte ein Regulations-Netzwerk aus den Transkriptionsfaktoren der *early growth response (EGR)* -Familie, des EGR-Ko-Regulators *NGFI-A binding protein 2 (NAB2)* und p130Cas identifiziert werden. Vor allem die starke NAB2-Expression konnte als eine der Ursachen der konstitutiven p130Cas-Expression in Anti-Östrogen-resistenten Zellen/Patientenproben ausgemacht werden. Des Weiteren konnte die Bedeutung des EGR/NAB2/p130Cas-Systems bei der Antwort auf Differenzierungstherapie in Kombination mit NF- κ B-Inhibition in einem Modell der Akuten Promyelozyten Leukämie (APL) gezeigt werden. Hier scheint p130Cas als Überlebensfaktor zu wirken. In kolorektalen Karzinomen (KRK) wurde ein signifikant erhöhtes Sterberisiko bei *BCAR1*-exprimierenden rechtsseitigen, Stadium I/II, MSS oder *BRAF*-mutierten KRK gefunden. Außerdem konnte durch Herunterregulierung der *BCAR1/p130Cas*-Expression ein verbessertes Ansprechen auf FOLFIRI (Folinsäure/5-FU/Irinotecan) erreicht werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Rolle von p130Cas und NAB2 als therapeutische Ziele bei Hormonrezeptor-positiven (HR+) Mammakarzinomen und APL, sowie von p130Cas als Prognosefaktor und Behandlungsziel bei bestimmten Subtypen von KRK.

Ein weiterer Aspekt der Habilitationsarbeit war die Identifikation von neuen Biomarkern und therapeutischen Zielen für Fernmetastasen bei prämenopausalen Patientinnen mit frühem Hormon-Rezeptor-positivem (HR+) /HER2-negativem Brustkrebs. Durch RNA-Expressionsprofile und Korrelationen mit klinischen Parametern konnten vier Signaturen (*risk of recurrence (ROR)*, *progesteron receptor*, *claudin-low* und *mammary stemness*) mit dem Metastasen-freien Überleben assoziiert und *LDL receptor related protein 2 (LRP2)*, *integrin*

binding Sialoprotein (IBSP) und *signal peptide, CUB domain, and EGF-like domain-containing 2 (SCUBE2)* als unabhängige prognostische Faktoren identifiziert werden.

Zusammenfassend konnte die Rolle von p130Cas als therapeutisches Ziel, als Resistenzvermittelnder Faktor und als prognostischer Biomarker in verschiedenen Malignitäten bekräftigt werden. Des Weiteren konnten prognostische Gensignaturen und Einzelgenmarker für Fernmetastasen bei prämenopausalem frühen HR+/HER2- Brustkrebs identifiziert werden, die in der zukünftigen klinischen Praxis Anwendung finden könnten.

1 Einleitung

Im Jahr 2020 wurden weltweit schätzungsweise 19,3 Millionen neue Krebsfälle diagnostiziert und fast 10,0 Millionen Krebstodesfälle registriert (Sung et al. 2021). Die am häufigsten diagnostizierte Krebsart ist inzwischen Brustkrebs mit geschätzten 2,3 Millionen neuen Fällen (11,7%), gefolgt von Lungenkrebs (11,4%), dem kolorektalen Karzinom (10,0%), Prostatakrebs (7,3%) und Magenkrebs (5,6%). Die häufigste Krebstodesursache ist immer noch Lungenkrebs mit schätzungsweise 1,8 Millionen Todesfällen (18%), gefolgt von Darmkrebs (9,4%), Leberkrebs (8,3%), Magenkrebs (7,7%) und Brustkrebs (6,9%) (Sung et al. 2021). Die hohe Mortalitätsrate kann zum großen Teil auf die Metastasierung und die Entwicklung von Therapieresistenz zurückgeführt werden. Beispielsweise wird bei 20% der Patienten mit kolorektalem Karzinom (KRK) bei der Erstdiagnose bereits ein metastasiertes KRK (mKRK) diagnostiziert und 25-30% der Patienten mit Stadium II/III KRK erfahren innerhalb von 5 Jahren nach kurativer Tumoresektion ein Rezidiv (Shah et al. 2016).

1.1 Biomarker und zielgerichtete Therapieansätze bei soliden Tumoren

Durch die Weiterentwicklung der Chemotherapie-Regime und die Etablierung neuer zielgerichteter/personalisierter Therapien im letzten Jahrzehnt konnte das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) in verschiedenen Tumorentitäten deutlich verlängert werden. Beim mKRK konnten durch die Kombination von moderner Chemotherapie mit monoklonalen Antikörpern wie Bevacizumab (gegen *vascular endothelial growth factor* (VEGF) gerichtet) oder Cetuximab und Panitumumab (gegen *epithelial growth factor receptor* (EGFR) gerichtet) mediane OS von über 30 Monaten erreicht werden (Douillard et al. 2013, Loupakis et al. 2014, Stintzing et al. 2016). Außerdem wurden im letzten Jahrzehnt große Erfolge durch die Anwendung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI, z. B. Pembrolizumab, Atezolizumab) bei unterschiedlichen Tumorarten in klinischen Studien erzielt (Garon et al. 2019, Cortes et al. 2020, Alva et al. 2021). Entsprechend wurde der Inhibitor des *programmed cell death 1* (PD1) -Rezeptors Pembrolizumab von der European Medicines Agency (EMA) u. a. für die Therapie von fortgeschrittenen Mikrosatelliten-instabilen KRK, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) und Urothelkarzinomen zugelassen (EMA 2021a). Bei Mammakarzinomen ist bereits seit zwei Jahrzehnten die zielgerichtete Therapie mit anti-human *epidermal growth factor receptor 2* (HER2) -Antikörpern (Trastuzumab) zugelassen (Baselga et al. 1996). Dennoch werden weiterhin neue gegen HER2-gerichtete Wirkstoffe entwickelt, um im Falle der Therapieresistenz weitere Optionen für die Folgelinien gewährleisten zu können. Zuletzt wurde Trastuzumab Deruxtecan, ein Konjugat aus dem

HER2-gerichteten Antikörper und einem zytotoxischen Topoisomerase I-Inhibitor, von der EMA im beschleunigten Verfahren für metastasierte HER2-positive (HER2+) Mammakarzinome zugelassen (EMA 2021d).

Wie am Beispiel der HER2-Positivität (starke Expression/Genamplifikation) als Biomarker beim Mammakarzinom deutlich wird, spielen Biomarker bei der Therapieentscheidung und auch der Zulassung von zielgerichteten Medikamenten eine immer größer werdende Rolle. Mutationen in den *rat sarcoma* (RAS) -Genen, *Kirsten RAS* (KRAS) und *neuroblastoma RAS* (NRAS) *viral oncogene homologs*, schließen derzeit eine anti-EGFR-gerichtete Behandlung mit Panitumumab (EMA 2021b) oder Cetuximab (EMA 2021c) beim mKRK aus. Außerdem werden häufig der Mikrosatellitenstatus (Ruschoff et al. 2021), die Tumormutationslast (TMB) (Alva et al. 2021) und der *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) Expressions-Score (Cortes et al. 2020) als Biomarker für eine potentielle Checkpoint-Inhibition herangezogen.

Obwohl in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte im Verständnis der Mechanismen der Tumorentstehung, Progression und Metastasierung erzielt und weitere zielgerichtete Therapien entwickelt wurden (Hanahan and Weinberg 2011, Fouad and Aanei 2017, Dongre and Weinberg 2019), zeugt das weitere Auftreten von Metastasen und Therapie-resistenten Tumoren von der Notwendigkeit der weiteren Aufschlüsselung der tumortreibenden Veränderungen sowie der Identifizierung von weiteren Biomarkern und Therapiezielen.

1.2 Charakteristika von Tumorzellen und Krebs-assoziierte Signaltransduktionswege

Die Hauptmerkmale von Krebszellen („*hallmarks of cancer*“) sind u. a. Aufrechterhaltung der Proliferation, Zelltod-Resistenz, Angiogenese-Induktion, Immun- und Mikroumgebungs- (*microenvironment*) Modulation und Aktivierung von Migration/Invasion/Metastasierung (Hanahan and Weinberg 2011, Fouad and Aanei 2017, Dongre and Weinberg 2019). Die veränderte Regulation von Signaltransduktionsnetzwerken trägt maßgeblich zur Entwicklung dieser *hallmarks* und damit der Progression und Therapieresistenzentstehung von Tumoren bei (Hanahan and Weinberg 2011, Fouad and Aanei 2017, Dongre and Weinberg 2019).

Die Zell-Proliferation wird hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren, deren Bindung an den entsprechenden Rezeptor (häufig Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK)) und die anschließende Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden initiiert (Rho et al. 2011). Beispielsweise, binden Mitglieder der *epidermal growth factor* (EGF) Familie, wie EGF, Epregrulin (EREG) und Amphiregrulin (AREG), den EGFR, wodurch zwei zentrale Signalkaskaden aktiviert werden. Zum einen wird der RAS/RAF/*extracellular signal regulated kinase* (ERK) Signalweg angeregt, der letztlich die DNA-Synthese und Zellteilung fördert, zum anderen wird der *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/AKT Signalweg aktiviert, welcher anti-apoptotische Signale

in der Zelle generiert und dadurch die Zelltod-Resistenz erhöht (Rho et al. 2011, Fouad and Aanei 2017).

Wachstumsfaktoren wie EGF und *platelet-derived growth factor* (PDGF) sind ebenfalls an der Kontrolle der Angiogenese beteiligt, indem sie die Expression der Mitglieder der VEGF-Familie regulieren (Apte et al. 2019). Die kanonische VEGF-induzierte Signalgebung reguliert über ihre Rezeptoren VEGFR1/2 die Aktivität vieler Signalwege/Kinasen, die letztlich Zell-Proliferation (RAS/RAF/ERK), Migration (*focal adhesion kinase* (FAK)/Paxillin; *cell division cycle 42* (Cdc42)/*p38 mitogen-activated protein kinase* (p38)), Überleben (PI3K/AKT) sowie Vaskulogenese, Angiogenese und Neoangiogenese kontrollieren (Apte et al. 2019).

Die Sekretion von VEGF und anderen Faktoren von Tumorzellen kann außerdem die Mikroumgebung und die Differenzierung/Aktivierung von Zellen des Immunsystems zum Vorteil des Tumors beeinflussen. Unter anderem kann VEGF die *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM1) -Expression herunterregulieren, welches die T-Zell-Adhäsion und damit die T-Zell Infiltration des Tumors reduziert (Apte et al. 2019), und die *FAS ligand* (FASL) -Expression in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) induzieren und dadurch Apoptose bei TILs auslösen (Motz et al. 2014).

Neben diesen Mechanismen und zellulären Programmen spielt die phänotypische Plastizität eine große Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung indem sie eine dynamische Anpassung der Tumorzelle an sich ändernde extrazelluläre Bedingungen ermöglicht (Dongre and Weinberg 2019, Brabletz et al. 2021). Die zelluläre Plastizität wird durch das embryonale Programm der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) reguliert, welches von Tumorzellen reaktiviert werden kann. Die transiente und partielle EMT führt zu einer erhöhten Motilität sowie Stammzell-Eigenschaften (Krebsstammzellen (*cancer stem cells* (CSC)), die häufig mit einer verstärkten Therapieresistenz assoziiert sind. Diese Eigenschaften begünstigen eine effiziente Disseminierung widerstandsfähiger Krebszellen und damit die Invasion umliegender Gewebe und die Fernmetastasierung. Nach erfolgter Ansiedlung von Mikrometastasen erfolgt häufig die Rückdifferenzierung zum epithelialen Phänotyp durch die mesenchymale-epitheliale Transition (MET), welches wiederum die Ausbildung von Makrometastasen unterstützt. Das EMT-Programm kann über verschiedene Faktoren und anschließende Signalwege aktiviert/reguliert werden: a) *transforming growth factor beta* (TGF β)/SMAD Signalweg; b) Wachstumsfaktoren (u. a. EGF/RAS/RAF/ERK); c) Zytokine/Janus Kinasen (JAK)/*signal transducer and activator of transcription* (STAT); d) Wnt/b-Catenin; e) HIPPO und auch f) den extrazelluläre Matrix (ECM)/Integrin-Signalweg (Cooper and Giancotti 2019, Dongre and Weinberg 2019, Brabletz et al. 2021).

Aus dieser kurzen Übersicht verschiedener Faktoren und Signalwege, die an der Ausprägung mehrerer *hallmarks of cancer* beteiligt sind, wird deutlich, dass viele

verschiedene Signalwege an der Regulation multipler zellulärer Programme beteiligt sind und sich gegenseitig beeinflussen („*signaling crosstalk/cross signaling*“) (Rho et al. 2011, Cooper and Giancotti 2019, Dongre and Weinberg 2019, Brabletz et al. 2021).

1.3 Die Rolle des Signalmoleküls p130Cas in der Tumorprogression und Metastasierung

Ein Signalmolekül, welches an der Integration und Kontrolle verschiedener Signalwege nach Aktivierung durch unterschiedliche (extrazelluläre) Faktoren beteiligt ist, ist p130 *Crk-associated substrate* (CAS) (Kumbrink and Kirsch 2011, Nikonova et al. 2014, Centonze et al. 2021). p130Cas ist ein Adapterprotein ohne enzymatische Aktivität, welches als Knotenpunkt für Signalprotein-Komplexe dient, die häufig in Tumorzellen deregulierte Signaltransduktionswege kontrollieren (Kumbrink and Kirsch 2011, Nikonova et al. 2014, Camacho Leal Mdel et al. 2015, Centonze et al. 2021).

p130Cas wurde erstmals als ein stark tyrosinphosphoryliertes 130 kDa-Protein in Zellen identifiziert, die durch die Proto-Onkogene *viral-Crk* (vCrk) und *viral-Src* (v-Src) transformiert wurden (Sakai et al. 1994). Das p130Cas-Gen wurde unabhängig von den funktionellen Interaktionsstudien als ein Gen identifiziert, welches Resistenz gegen anti-Östrogene vermittelt und entsprechend *breast cancer antiestrogen resistance 1* (BCAR1) benannt (Brinkman et al. 2000, van der Flier et al. 2000).

p130Cas ist ein Multi-Domänen-Protein bestehend aus einer amino-terminalen Src-Homologie 3 (SH3) Domäne, einer Prolin-reichen Domäne, der zentralen Substrat-Domäne (SD), der Serin-reichen Domäne (SER) sowie einer carboxy (C)-terminalen Domäne, die ein zweigeteiltes Bindemotiv für Src und eine *focal adhesion targeting* (FAT) Domäne beinhaltet (**Abb. 1**) (Kumbrink and Kirsch 2011, Centonze et al. 2021).

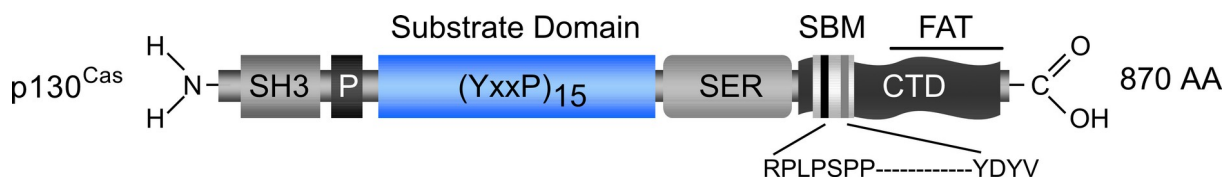


Abb. 1. p130Cas-Domänenstruktur. SH3, Src-Homologie 3 Domäne. P, Prolin-reiche Domäne. SD, Substrat-Domäne. SER, Serin-reiche Domäne, CTD, carboxy-terminale Domäne. SBM, zweigeteiltes Src-Bindemotiv. FAT, *focal adhesion targeting* (FAT) Domäne.

p130Cas dient als Adapterprotein in Multiproteinkomplexen und integriert Signale aus der extrazellulären Matrix (Integrin-vermittelte Signaltransduktion), von löslichen Liganden (Wachstumsfaktoren, Hormone) und nach mechanischem Stress (Camacho Leal Mdel et al. 2015, Centonze et al. 2021). Dabei spielt die SD, die 15 YxxP Motive trägt und damit potentielle Tyrosin-Phosphorylierungs-Stellen beinhaltet, eine essentielle Rolle. Phosphorylierung der SD durch Kinasen der Src-Familie ermöglicht die Interaktion mit den Adapterproteinen Crk, Crk-like (Crk-L), CRKII und Nck (Burnham et al. 1996, Harte et al. 1996, Kumbrink and Kirsch 2011). Dadurch können weitere Effektorproteine rekrutiert werden, sodass Signalkomplexe entstehen, die nachgeschaltete Signalwege aktivieren,

welche Zellzyklusprogression, Proliferation, Überleben und Migration/Invasion fördern (**Abb. 2**) (Kumbrink and Kirsch 2011, Centonze et al. 2021). Die SH3-Domäne vermittelt u. a. die Interaktion von p130Cas mit den Prolin-reichen Domänen der Kinasen FAK, *FAK-related non-kinase* (FRNK) und *protein tyrosine kinase 2* (PYK2), den Phosphatasen *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1* (PTPN1) und PTPN12 sowie anderen Proteinen (C3G, CMS, CIZ und Vinculin) (Polte and Hanks 1995, Harte et al. 1996, Liu et al. 1996, Garton et al. 1997, Kirsch et al. 1998, Kirsch et al. 1999, Nakamoto et al. 2000, Janostiak et al. 2014). Die SER enthält multiple Serine und Threonine und ist wichtig für die Bindung des Chaperons 14-3-3 (Briknarova et al. 2005). Außerdem ist die Adhäsions-abhängige Serin-Phosphorylierung von p130Cas mit einem invasiven Phänotyp assoziiert (Makkinje et al. 2009). Die C-terminale Domäne von p130Cas ist entscheidend für die Bindung von Kinasen der Src-Familie (Nakamoto et al. 1997) und der PI3K (Li et al. 2000). Außerdem zeigten frühere Studien, dass die C-terminale Domäne zur Homo-Dimerisierung und zur Hetero-Dimerbildung mit einem weiteren Mitglied der p130Cas Familie, *Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9* (NEDD9), benötigt wird (Law et al. 1999).

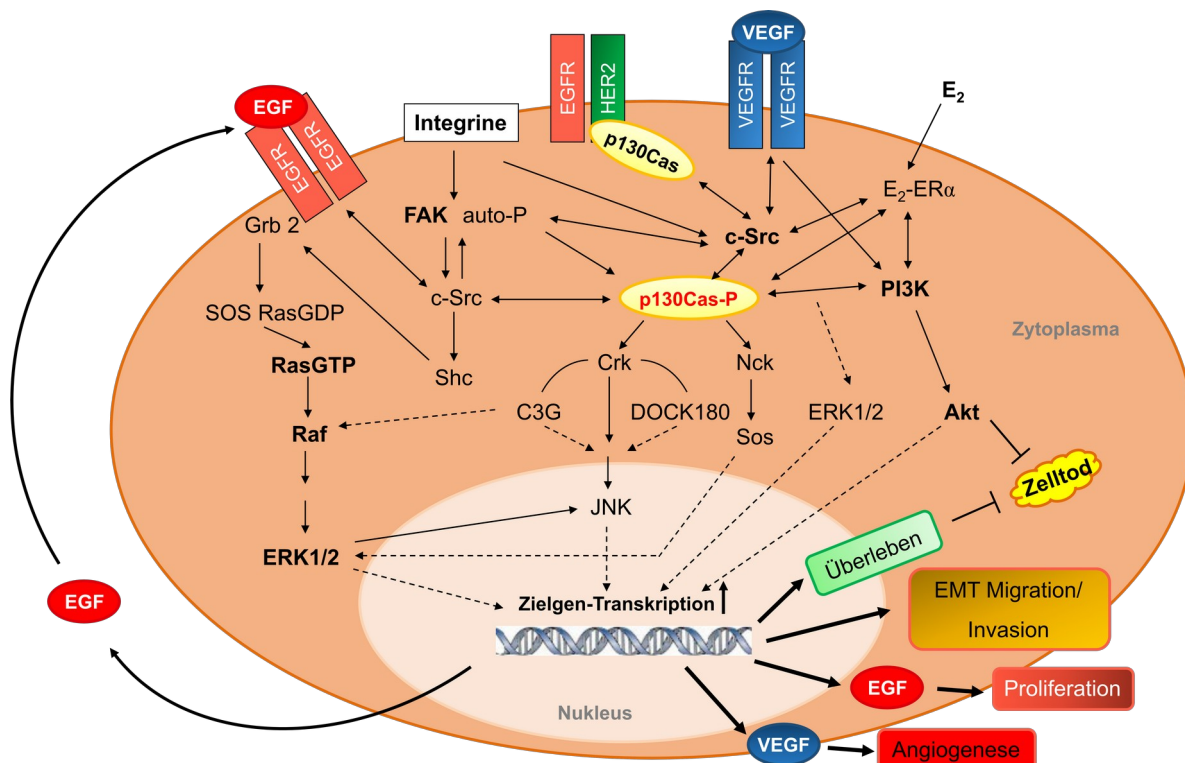


Abb. 2. Tumorprogressions-assoziierte Signalwege, die durch p130Cas beeinflusst/reguliert werden. Integrin-vermittelte Signaltransduktion, durch Wachstumsfaktoren vermittelte Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und die durch Östrogen (E₂) induzierte Östrogenrezeptor (ER)-alpha Aktivität führen zur Tyrosinphosphorylierung von p130Cas. Phosphoryliertes/aktiviertes p130Cas rekrutiert verschiedene Effektorproteine, wodurch ein Signalkomplex entsteht, der nachgeschaltete Signalwege aktiviert, die zur Induktion von Transkriptionsprogrammen führen, welche Proliferation, Überleben, EMT und Migration/Invasion sowie Angiogenese fördern. Durchgezogene Linien stellen direkte Interaktionen dar; gestrichelte Linien zeigen Signalwege, die zusätzliche Zwischenschritte enthalten. P, Phosphorylierung.

Die nach Phosphorylierung/Aktivierung von p130Cas, mit p130Cas als Knotenpunkt, entstandenen Signalkomplexe, sind an der Kontrolle der Aktivität der RAS/RAF/ERK, PI3K/AKT, Wnt/ β -Catenin und *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) Signalwege beteiligt (**Abb. 2**) (Kumbrink and Kirsch 2011, Camacho Leal et al. 2018, Centonze et al. 2021). Dadurch ist p130Cas in die Regulation einer Vielzahl von zellulären Programmen involviert, die nach De-Regulation an der Ausprägung von mehreren Hauptmerkmalen von Krebszellen beteiligt sind. Die Überexpression und/oder starke Phosphorylierung von p130Cas wurde beispielsweise mit verstärkter Proliferation, Migration und Invasion (Centonze et al. 2021), Therapie-Resistenz (u. a. Tamoxifen, Doxorubicin) (van der Flier et al. 2000, Ta et al. 2008), EMT (Tikhmyanova and Golemis 2011, Yaginuma et al. 2020) und VEGF-induzierter Angiogenese (Evans et al. 2011, Evans et al. 2017) assoziiert. Entsprechend konnte eine starke p130Cas-Expression oder -Überaktivierung zunächst in Mammakarzinomen (van der Flier et al. 2000) und in den folgenden Jahren auch in anderen Tumorentitäten wie dem Adenokarzinom der Lunge (Deng et al. 2013), dem Prostatakarzinom (Heumann et al. 2018) und dem Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (Huang et al. 2013) mit einer schlechten Prognose, Therapie-Resistenz oder reduziertem Überleben in Patientenkohorten korreliert werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die tragende Rolle von p130Cas in der Progression von multiplen Tumoren und die Vielfältigkeit der durch p130Cas regulierten Signalwege verdeutlichen die Wichtigkeit unser Verständnis der Kontrolle und insbesondere des Kontrollverlusts der p130Cas-regulierten und assoziierten Netzwerken zu erweitern.

Im Speziellen sollte untersucht werden:

1. Welcher Mechanismus führt zur p130Cas-Überexpression und der damit assoziierten erworbenen anti-Östrogen Resistenz bei Mammakarzinomen?
2. Kann die p130Cas-vermittelte Progression und Metastasierung von Mammakarzinomen durch zielgerichtete Ansätze inhibiert werden?
3. Welche Rolle spielen p130Cas und ggf. unter 1. identifizierte Mechanismen und assoziierte Faktoren in anderen Tumorentitäten?

Um diese Fragestellungen zu bearbeiten, wurden im Rahmen der Habilitationsarbeit durch die Integration von experimentellen (Zellkultur/Mausmodelle) und bioinformatischen/statistischen Ansätzen (Transkriptom-Analysen/klinische Datensätze) ein p130Cas-Netzwerk etabliert, welches dazu beiträgt die p130Cas-abhängigen Mechanismen der Tumorprogression, Metastasierung und Resistenz zu verstehen. Außerdem wurde das Potential von p130Cas als prognostischer Marker und therapeutisches Ziel sowie entsprechende Ansätze zur p130Cas-Inhibition untersucht.

Ein weiterer Aspekt war die Identifikation von neuen Biomarkern und therapeutischen Zielen für Fernmetastasen bei prämenopausalen Patientinnen mit frühem Hormon-Rezeptor-positivem (HR+) /HER2-negativem Brustkrebs. Dazu wurden die RNA-Expressionsprofile in Tumoren von prämenopausalen Patientinnen, die Metastasen entwickelten und Patientinnen, die keine entwickelten, vergleichend analysiert und mit klinischen Parametern korreliert.

2 Zusammenfassung und Diskussion themenbezogener eigener Arbeiten

2.1 Die Rolle des EGR/NAB2/p130Cas Signaltransduktions- Netzwerks in der Progression und Therapieresistenzentwicklung von Tumoren

Regulation of p130Cas/BCAR1 expression in tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant breast cancer cells by EGR1 and NAB2.

Kumbrink, J and Kirsch, KH (2012).
Neoplasia 14: 108-120. PMID: 22431919

EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin.

Kumbrink, J, Kirsch, KH, and Johnson, JP (2010).
J Cell Biochem. Sep 1; 111(1): 207-17. PMID: 20506119.

p130Cas acts as survival factor during PMA-induced apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells.

Kumbrink, J and Kirsch, KH (2013).
Int J Biochem Cell Biol. Mar;45(3):531-5. doi: 10.1016/j.biocel.2012.12.017. Epub 2012 Dec 31. PMID: 23287717.

Die Assoziation von *BCAR1*/p130Cas mit anti-Östrogen Resistenz bei Mammakarzinomen ist bereits seit dem Jahr 2000 bekannt (Brinkman et al. 2000, van der Flier et al. 2000). Hohe *BCAR1*/p130Cas-Expression wurde mit einer erhöhten Rezidiv-Rate und schlechtem Ansprechen auf Erstlinien-Therapie mit Tamoxifen assoziiert (Dorssers et al. 2001). Dennoch war auch mehr als ein Jahrzehnt später der Mechanismus, der zur verstärkten *BCAR1*/p130Cas-Expression führt, nicht bekannt. Deswegen wurde in eigenen Studien zunächst der Mechanismus der Überexpression und der erworbenen anti-Östrogen Resistenz in Mammakarzinomen untersucht (Kumbrink and Kirsch 2012). *In silico* Analysen identifizierten im 5'-Bereich des *BCAR1*-Gens mehrere Gruppen von überlappenden putativen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren *specificity protein 1* (SP1) und Mitglieder der *early growth response* (EGR) -Familie. Vergleichbare *cis*-regulatorische Elemente wurden zuvor in anderen Promotoren, wie dem des *VEGF*- (Liu et al. 2008), *platelet derived growth factor subunit A* (*PDGF-A*)- (Khachigian et al. 1995) und *NGFI-A binding protein 2* (*NAB2*)- Promotors (Kumbrink et al. 2005) als essentiell für die EGR-induzierte Expression beschrieben. Daher wurde die Möglichkeit der Regulation der *BCAR1*-Expression durch Mitglieder der EGR-Familie, insbesondere EGR1, im Mammakarzinom analysiert.

Das *immediate early gene* *EGR1* (auch *nerve growth factor induced protein A* (NGFI-A) genannt) kodiert für einen Zink-Finger Transkriptionsfaktor, der eine ambivalente Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren spielt (Wang et al. 2021). *EGR1* kann u. a. in Abhängigkeit von der Tumorentität sowohl tumortreibend als auch als Tumorsuppressor agieren, indem *EGR1* die Expression von z. B. pro- oder anti-apoptischen oder EMT/MET Genen induziert/inhibiert (Wang et al. 2021). Dabei spielt das Genprodukt des *delayed early response genes* *NAB2* (Kirsch et al. 1996) als Ko-Regulator eine tragende Rolle. *NAB2* kann sowohl als Ko-Aktivator (Sevetson et al. 2000, Collins et al. 2006, Kumbrink and Kirsch 2012) als auch als Ko-Repressor der *EGR*-vermittelten Genexpression wirken (Svaren et al. 1996, Kumbrink et al. 2005, Kumbrink et al. 2010). Interessanterweise zeigten eigene Untersuchungen mittels Transfektions- und Promotor-Reporter-Experimenten sowie Stimulations-/Expressionsanalysen, dass *EGR1* in Tumorzellen neuroektodermalen und epithelialen Ursprungs die *NAB2*-Expression induziert (Kumbrink et al. 2010). Außerdem konnte festgestellt werden, dass *NAB2* die eigene Induktion durch die *EGR* Transkriptionsfaktoren inhibiert, also ein negativer Rückkopplungsmechanismus vorliegt. In den folgenden Untersuchungen hinsichtlich der anti-Östrogen Resistenz im Mammakarzinom zeigten RNA-Interferenz (RNAi) und ChIP (Chromatin Immunpräzipitation) Experimente, dass *EGR1* und *NAB2* gemeinsam die Expression von p130Cas in Brustkrebs-Zelllinien positiv regulieren (Kumbrink and Kirsch 2012). Andererseits konnte nach Depletion von p130Cas die Reduktion der Expression von *EGR1* und *NAB2* in Tamoxifen-sensitiven Zellen beobachtet werden, während in Tamoxifen-resistenten Zellen nur die *NAB2*-Expression vermindert wurde. Die p130Cas/*BCAR1*-Expression folgte nach Stimulation mit Phorbolestern, wodurch extrazelluläre Signale wie z. B. von Wachstumsfaktoren mimikriert werden, einer *late response gene* Kinetik. Wie zuvor in anderen Geweben beschrieben, folgte die *EGR1*-Expression auch in den Brustkarzinomzellen einer *immediate early response gene* (Thiel and Cibelli 2002, Khachigian 2016) und die *NAB2*-Expression einer *delayed early response gene* (Kirsch et al. 1996) Kinetik. Daraus lässt sich folgern, dass ein positiver Rückkopplungsmechanismus besteht in dem p130Cas nach Zellstimulation die *EGR1*-Expression induziert, welches die Transkription von *NAB2* aktiviert (**Abb. 3**). Zusammen induzieren *EGR1* und *NAB2* anschließend die *BCAR1*/p130Cas-Expression. In anti-Östrogen-resistenten Zellen konnte dieser Mechanismus nur bedingt beobachtet werden, da diese eine bereits stark erhöhte basale p130Cas/*BCAR1*- und *NAB2*-Expression sowie erhöhte *EGR1*-Bindung im *BCAR1*-Promotor-Bereich aufwiesen. Das identifizierte *EGR1*/*NAB2*/p130Cas-Netzwerk und die beobachteten Unterschiede in anti-Östrogen-resistenten Zellen deuten darauf hin, dass eine Deregulation bzw. Über-Aktivierung des *EGR1*/*NAB2*/p130Cas Mechanismus zur erworbenen anti-Östrogen-Resistenz beiträgt.

Da eine erhöhte NAB2-Expression auch in Patientenproben aus höhergradigen Tumoren und Metastasen gefunden wurde (Radvanyi et al. 2005, Ginestier et al. 2006, Kumbrink and Kirsch 2012), könnte dieser Mechanismus nicht nur zu der erhöhten *BCAR1*/p130Cas-Expression in Tamoxifen-resistenten (van der Flier et al. 2000), sondern auch in aggressiven und fortgeschrittenen Mammakarzinomen beitragen (Konstantinovskiy et al. 2010).

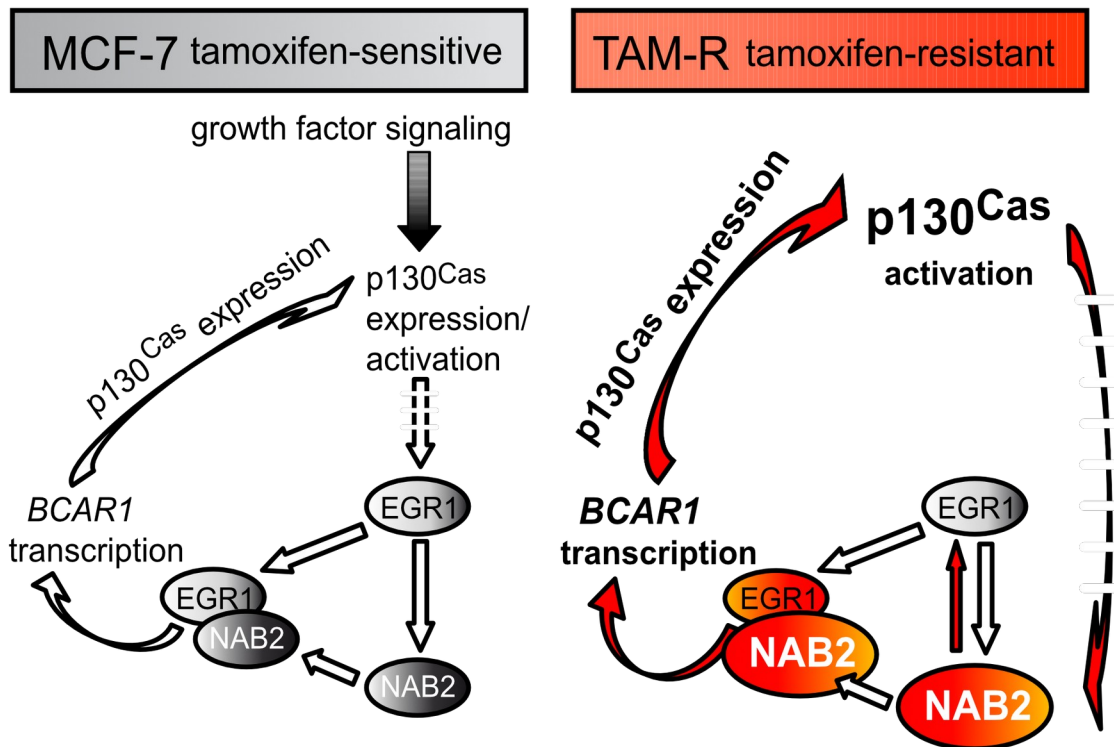


Abb 3. Modell des positiven Rückkopplungsmechanismus, der die Expression von p130Cas in tamoxifen-sensitiven MCF-7 und tamoxifen-resistenten TAM-R Brustkrebszellen reguliert. Durchgehende Pfeile zeigen direkte Interaktionen oder Hochregulierung/Aktivierung; gestrichelte Pfeile zeigen zusätzliche, nicht definierte Zwischenschritte an, die zu einer Hochregulierung der Expression führen. Rechts: Die rote Farbe zeigt eine verstärkte Aktivität oder Expression (durch größere Symbole dargestellt) des abgebildeten Moleküls oder Prozesses in TAM-R-Zellen im Vergleich zu MCF-7-Zellen an. Abbildung aus Kumbrink and Kirsch 2012, Neoplasia, open access.

In den Folgejahren wurde die Bedeutung von p130Cas, den Mitgliedern der EGR-Familie und NAB2 in Mammakarzinomen zwar von vielen Forschungsgruppen untersucht, aber nicht im gemeinsamen Kontext. Im Rahmen von mehreren Multiomics-Studien wurde in den Gesamt-Datensätzen eine im Vergleich zum Normalgewebe niedrigere EGR1-Expression gefunden, die häufig mit verringertem Überleben assoziiert war (Hao et al. 2021, Saha et al. 2021). Allerdings zeigte sich nach weiterer Auftrennung der Patientendaten in der *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)-Kohorte nach Hormonrezeptor (HR)- und HER2-Status, dass in HR-positiven (HR+) und HER2-negativen (HER2-) eine höhere EGR1-Expression als in

HR-/HER2+ Mammakarzinomen vorlag (Hao et al. 2021, Saha et al. 2021). Diese Resultate unterstützen die Rolle des identifizierten EGR/NAB2/p130Cas-Netzwerks insbesondere in HR+ Brustkrebs. Die NAB2- und p130Cas-Expression sowie mögliche Unterschiede im Ansprechen auf Anti-Östrogene wurden in diesen Studien leider nicht analysiert. Allerdings wurden ebenfalls die anderen Mitglieder der EGR-Familie (EGR2, EGR3, EGR4) untersucht (Hao et al. 2021). Für EGR3 konnte ebenfalls eine signifikant höhere Expression in HR+/HER2- Geweben beobachtet werden, deren Unterschied im Vergleich zu HR-/HER2+ Tumoren deutlich ausgeprägter war als bei EGR1. Der Transkriptionsfaktor EGR3 wurde bereits zuvor mit dem Östrogen-Signalweg in Brustkrebszellen in Verbindung gebracht (Inoue et al. 2004) und als unabhängiger prognostischer Faktor bei Mammakarzinomen beschrieben (Suzuki et al. 2007). Des Weiteren konnte in einer Proteom-Studie zur Expressionskinetik nach Östrogen-Stimulation eine Induktion von EGR3 und auch NAB2 gezeigt werden (Drabovich et al. 2016). Nach Herunterregulierung der NAB2-Expression mittels RNAi konnte eine erhöhte Expression und verstärkte Induktion des durch EGR3 regulierten Integrin alpha-2 (ITGA2) beobachtet werden. Drabovich et al. erklärten diese Beobachtung durch einen EGR3/NAB2 negativen Rückkopplungsmechanismus, der bereits zuvor in meinen eigenen Studien identifiziert wurde (Kumbrink et al. 2010).

Diese Untersuchungen zielten darauf ab mögliche Unterschiede des EGR/NAB2-Systems in Melanom- und Karzinom-Zellen im Vergleich zu hämatopoetischen Zellen aufzudecken (Kumbrink et al. 2010). T-Zell-Rezeptor (TCR)-induziertes NAB2 und EGR1 aktivieren zusammen den Interleukin-2-Promotor, welches zur T-Zell-Aktivierung führt (Collins et al. 2006). Andererseits hemmen EGR2 und EGR3 die T-Zell-Aktivierung, indem sie die Expression von NAB2 und EGR1 unterdrücken (Collins et al. 2008). Im Gegensatz dazu zeigten eigene Experimente, dass sich EGR1, EGR2 und EGR3 in Zellen neuroektodermalen und epithelialen Ursprungs gegenseitig autoregulieren und die Expression von NAB2 induzieren (Kumbrink et al. 2010). NAB2 hingegen inhibierte die durch die EGR-Faktoren induzierte Aktivität des NAB2-Promotors, sodass ein negativer Rückkopplungsmechanismus vorliegt. Dieser Mechanismus könnte dazu dienen, eine überschießende Aktivität der durch EGR/NAB2 regulierten Gen-Promotoren zu verhindern. Allerdings kann NAB2 in epithelialen Tumoren auch als Ko-Aktivator der EGR-vermittelten Transkription fungieren (Sevetson et al. 2000, Kumbrink and Kirsch 2012). Da durch die Transkriptionsfaktoren der EGR-Familie eine Vielzahl von Genen kontrolliert werden, die an multiplen zellulären Programmen beteiligt sind, ist es nicht verwunderlich, dass die Dysregulation des EGR/NAB2/p130Cas-Netzwerk in verschiedenen Malignomen beobachtet wurde (Camacho Leal Mdel et al. 2015, Khachigian 2016, Centonze et al. 2021, Wang et al. 2021).

Nicht nur die EGR-Faktoren und NAB2, sondern auch p130Cas spielen ebenfalls bei hämatopoetischen Tumorerkrankungen eine Rolle (Kumbrink and Kirsch 2011, Kumbrink and Kirsch 2013, Nikonova et al. 2014, Camacho Leal Mdel et al. 2015). Bei bestimmten Leukämien, wie z. B. der Akuten Promyelozyten Leukämie (APL), werden auch heute noch Differenzierungstherapien mit dem Ziel der Ausdifferenzierung der Leukämiezellen und damit letztendlich der Apoptose-Induktion in Kombination mit Chemotherapie angewendet (onkopedia-Leitlinien-APL 2020). Dieser Prozess wird nach heutigen Richtlinien mittels all-trans-Retinsäure (ATRA) (onkopedia-Leitlinien-APL 2020) und wurde in früheren klinischen Studien auch durch Phorbolster induziert (Leszczyniecka et al. 2001). Promyelozytische Leukämiezellen differenzieren durch Phorbolster zu Monozyten/Makrophagen, welches die stufenweise Adhäsion, Zellaggregation und Apoptose der Zellen beinhaltet (Zheng et al. 2002, Tsiftoglou et al. 2003). Da p130Cas genau diese Signalwege integriert (Nikonova et al. 2014, Centonze et al. 2021), wurde in eigenen Studien die Rolle des EGR/NAB2/p130Cas-Systems in einem promyelozytischen Leukämie Modellsystem untersucht (Kumbrink and Kirsch 2013). Diese Experimente zeigten, dass p130Cas als Überlebensfaktor während Phorbolster-induzierter Differenzierung und Apoptose fungiert. In diesem Kontext konnte nach Phorbolster-Stimulation eine positive Regulation der p130Cas-Expression durch EGR1 und NAB2 beobachtet werden, die zu einer beschleunigten Adhäsion und Aggregation der Suspensions-Zellen führte. Diese ging mit einer erhöhten Zellviabilität einher. Da die Inhibition der *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) - Aktivität die Phorbolster-vermittelte Apoptose und das therapeutische Ansprechen auf Phorbolster in Leukämiepatienten verstärkte (Hansson et al. 2005), wurde der Effekt der NF- κ B-Inhibition auf das EGR1/NAB2/p130Cas-Netzwerk untersucht. Nach Phorbolster-induzierter Differenzierung in Kombination mit NF- κ B-Inhibition konnte eine Verringerung der Zellaggregation, eine erhöhte Apoptose-Induktion und die Reduktion der EGR1/NAB2/p130Cas-Expression beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten an, dass NF- κ B ebenfalls in die Regulation des EGR1/NAB2/p130Cas-Systems involviert ist. Da die Ko-Regulation durch EGR1 und NF- κ B auch an anderen Genen beschrieben wurde (Ma et al. 2009, Damm et al. 2010, Hoesel et al. 2018), scheint dieses auch in Bezug auf p130Cas plausibel. Außerdem zeigen beide Ansätze nach Phorbolster-induzierter Differenzierung, **1.)** Überexpression von p130Cas führt zu erhöhter Viabilität und **2.)** NF- κ B-Inhibition reduziert die EGR1/NAB2/p130Cas-Expression und aktiviert Apoptose, die Rolle von p130Cas als Überlebensfaktor auf. Deswegen könnte die therapeutische Inhibition von p130Cas dazu dienen, den protektiven Effekt durch p130Cas während Phorbolster/Differenzierungs-Therapie und NF- κ B Inhibition zu blockieren. Inwiefern die aktuell in der Klinik verwendete ATRA-Differenzierungstherapie (onkopedia-Leitlinien-APL 2020) den für Phorbolster

postulierten Mechanismus widerspiegelt ist unklar, da ATRA die Differenzierung zu Neutrophilen ohne Zelladhäsion und Aggregation induziert (Breitman et al. 1980).

Zusammenfassend konnte in den Studien ein Regulations-Netzwerk aus den Transkriptionsfaktoren der EGR-Familie, des Ko-Regulators NAB2 und des Signal-Integrations-Moleküls p130Cas identifiziert werden. Die Mitglieder dieses Netzwerks sind in einer Vielzahl von Tumoren dereguliert und an der Progression und Aggressivität dieser Malignome beteiligt (Kumbrink and Kirsch 2011, Centonze et al. 2021, Wang et al. 2021). Bei Mammakarzinomen ist insbesondere eine hohe p130Cas-Expression mit einer schlechten Prognose und Anti-Östrogen-Resistenz assoziiert (van der Flier et al. 2000). In eigenen Studien konnte vor allem eine starke NAB2-Expression als eine der Ursachen der konstitutiven p130Cas-Expression in Anti-Östrogen-resistenten Zellen/Patientenproben identifiziert werden (Kumbrink and Kirsch 2012). Des Weiteren konnte die Bedeutung des EGR/NAB2/p130Cas-Systems bei der Antwort auf Differenzierungstherapie in Kombination mit NF- κ B-Inhibition von APL mit p130Cas als Überlebensfaktor gezeigt werden (Kumbrink and Kirsch 2013). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Rolle von p130Cas und NAB2 als therapeutische Ziele bei HR+ Mammakarzinomen und APL.

2.2 Ansätze zur p130Cas-Inhibition in Mammakarzinomen

A truncated phosphorylated p130Cas substrate domain is sufficient to drive breast cancer growth and metastasis formation in vivo.

Kumbrink J, de la Cueva A, Soni S, Sailer N, Kirsch KH (2016).

Tumour Biol. Aug;37(8):10665-73. doi: 10.1007/s13277-016-4902-8. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26867768.

Expression of a Phosphorylated Substrate Domain of p130Cas Promotes PyMT-induced c-Src-dependent Murine Breast Cancer Progression.

Zhao, Y*, Kumbrink, J*, Lin, BT, Bouton, AH, Yang, S, Toselli, PA, and Kirsch, KH (2013).

Carcinogenesis Dec;34(12):2880-90. doi: 10.1093/carcin/bgt238. Epub 2013 Jul 3. PMID: 23825155. *equal contribution.

In einer Vielzahl von Untersuchungen und eigenen Studien wurde eine tragende Rolle von p130Cas insbesondere bei der Progression und Therapie-Resistenz von Mammakarzinomen und damit das Potential als therapeutisches Ziel gezeigt (van der Flier et al. 2000, Kumbrink and Kirsch 2012, Centonze et al. 2021). Deswegen sollte der Einfluss der p130Cas-Inhibition auf die Entwicklung, Progression und Metastasierung von Brustkrebs in Mausmodellen untersucht werden.

Ein möglicher Ansatz der „zielgerichteten“ p130Cas Inhibition ist die Verwendung des Src*/p130CasSD (*decoy*) -Ansatzes (Kirsch et al. 2002, Soni et al. 2009, Kumbrink and Kirsch 2011). Hierbei wurde aus einer abgeschwächten Src-Kinasedomäne (Src*) und der p130Cas Substratdomäne (SD) das Fusionsprotein Src*/p130CasSD generiert (**Abb. 4**). Durch Src* wird die SD des Fusionsproteins konstitutiv phosphoryliert, wodurch Faktoren an die phosphorylierten Tyrosinmotive der SD rekrutiert werden, die ansonsten an das endogene Vollängen-p130Cas binden und entsprechend weitere nachgeschaltete Signalwege aktivieren könnten. Dieser *decoy*-Ansatz führt *in vitro* in v-crk-transformierten Fibroblasten (Kirsch et al. 2002) und in Anti-Östrogen-resistenten Brustkrebszellen (Soni et al. 2009) zu einer Abschwächung der endogenen durch p130Cas regulierten Signalwege und des transformierten Phänotyps. Das Src*/CasSD-Molekül und die gebundenen Faktoren selbst induzieren keine Signalweiterleitung, da die hierfür benötigten restlichen Domänen des p130Cas-Proteins fehlen. Als Kontrollen wurden korrespondierende Src^{KM}/p130CasSD-Fusionskonstrukte mit einer inaktiven Src^{KM} Kinase-Domäne (Aminosäure-Austausch K295M; (Jove et al. 1987)) generiert, in denen keine Phosphorylierung des p130CasSD-Anteils vorliegt (**Abb. 4**).

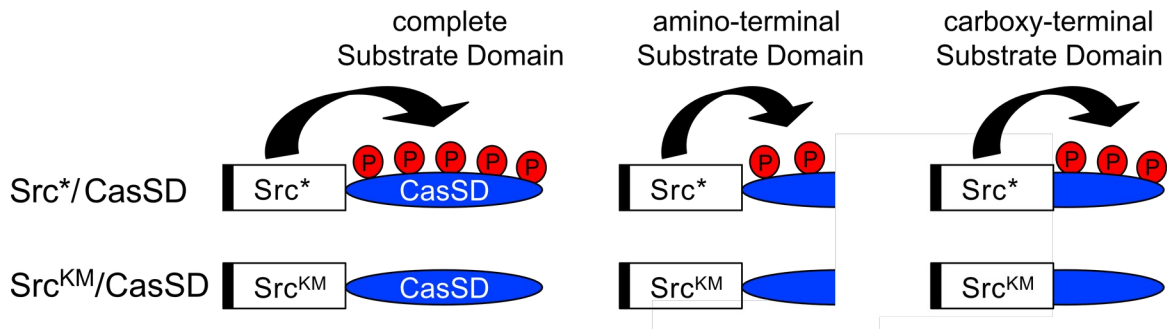


Abb. 4. Darstellung der dominant-negativen p130Cas- (Src*/CasSD) und Kontroll- (Src^{KM}/CasSD) Fusionskonstrukte von Kirsch et al., 2002. Src*, abgeschwächte Src-Kinasedomäne. Src^{KM}, inaktive Src-Kinasedomäne. CasSD (blaue Farbe), p130Cas-Substratdomäne. P, Phosphorylierung. Abbildung aus Kumbrink and Kirsch 2011, Intech, open access.

Um die Funktion des Fusionsmoleküls *in vivo* zu untersuchen, wurden *mouse mammary tumor virus* (MMTV) -Src*/CasSD transgene Mäuse etabliert (Zhao, Kumbrink et al. 2013). Die transgene Src*/CasSD-Expression unter Kontrolle des MMTV-Promotors hatte weder Einfluss auf die normale Brustdrüsen-Entwicklung noch wurden in den Mäusen Tumoren induziert. Zur Charakterisierung der Effekte des Src*/CasSD-Moleküls auf Tumorentwicklung wurde das MMTV-*polyoma middle T-antigen* (PyMT) murine Brustkrebsmodell verwendet (Guy et al. 1992). PyMT-transgene Mäuse entwickeln Brustdrüsentumoren mit kurzer Latenzzeit und die Tumorprogression ähnelt der menschlichen Erkrankung (Lin et al. 2003). Die Tumorigenität in diesem Modell hängt von der Aktivität der c-Src-Kinase ab (Guy et al. 1994). Da die c-Src-Aktivität ebenfalls mit der Phosphorylierung der p130Cas SD korreliert (Cunningham-Edmondson and Hanks 2009), wurde dieses Modell gewählt.

Unerwarteterweise entwickelten MMTV-PyMT (im folgenden PyMT genannt) × Src*/CasSD-Mäuse im Vergleich zu PyMT-transgenen Mäusen schneller Brusttumoren (Zhao, Kumbrink et al. 2013). Hohe Src*/CasSD-Konzentrationen führten bereits im Alter von 4 Wochen zu tastbaren Tumoren, während bei PyMT-transgenen Mäusen tastbare Tumoren erst im Alter von 7 Wochen gefunden wurden. Alle frühen Tumoren aus PyMT × Src*/CasSD-Mäusen, die im Alter von 4 Wochen reseziert wurden, wiesen Merkmale eines *ductal carcinoma in situ* (DCIS) vom Komedo-Typ auf, während PyMT-Mäuse in diesem Alter hauptsächlich Hyperplasien oder *Carcinoma in situ* entwickelt hatten. Es ist bekannt, dass DCIS vom Komedo-Typ das höchste Risiko für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms und/oder eines Rezidivs haben (Bane 2013). Um herauszufinden, aus welchen Gründen der Src*/CasSD-Ansatz im PyMT-Mausmodell im Gegensatz zu *in vitro* Experimenten die Entwicklung von aggressiveren Tumoren förderte, wurden weitere Experimente durchgeführt. Aus früheren Publikationen war bekannt, dass PyMT ein membranständiges Molekül ist, das mit zahlreichen zellulären Proteinen, u. a. mit c-Src, an Membranen interagiert und eine starke transformierende Wirkung hat, welche die Tumorentstehung fördert (Dunant et al.

1996, Gottlieb and Villarreal 2001). Die direkte Bindung von c-Src an PyMT wird durch die c-Src-Kinasedomäne vermittelt (Dunant et al. 1996), die auch in Src*/CasSD vorhanden ist. Phosphoryliertes endogenes p130Cas ist hauptsächlich an Zellmembranen aktiv, insbesondere an fokalen Adhäsionen, wo es mit Effektoren wie c-Crk interagieren und nachgeschaltete Signalwege aktivieren kann (Cunningham-Edmondson and Hanks 2009). Basierend auf diesen Zusammenhängen wurde untersucht, ob PyMT mit Src*/CasSD an Membranen interagieren und dadurch die Zelltransformation fördern könnte.

Durch Interaktionsstudien (Immunpräzipitation) und konfokale Mikroskopie konnte die Bindung und Ko-Lokalisation von PyMT und Src*/CasSD bestätigt werden. Außerdem konnte durch Zellfraktionierung eine deutlich größere Menge des Src*/CasSD-Fusionsproteins in der Membran-Fraktion in PyMT-Zellen detektiert werden als in Anti-Östrogen-resistenten Zellen. Um nachzuweisen, dass die Membran-Lokalisation von Src*/CasSD transformierend wirkt, wurde an das Fusionskonstrukt der HRAS-Lipid-Anker angehängt, der essentiell für die Membran-Lokalisation von HRAS ist (Hart and Donoghue 1997). Dieses führte zur erwarteten Membran-Assoziation des Src*/CasSD-Proteins und dadurch zur Transformation der Zellen. Außerdem wurde, wie in PyMT-Src*/CasSD-Zellen, der RAS/RAF/ERK-Signalweg aktiviert. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Src*/CasSD in PyMT-Mäusen die Aktivierung von Signalkomplexen an Membranen erhöht und dadurch das PyMT-induzierte Tumorentstehung fördert. Die Ergebnisse helfen auch zu verstehen, warum das Src*/CasSD-Molekül die Zelltransformation in PyMT-Zellen fördert und in Anti-Östrogen-resistenten Zellen inhibiert. Im PyMT-Modell wird ein Großteil der Src*/CasSD-Proteine an Membranen gefunden, während sie im Anti-Östrogen-Resistenz-Zellsystem hauptsächlich im Zytoplasma vorliegen, wo sie als *decoy*-Molekül inhibitorisch wirken.

In anschließenden Studien wurde untersucht welche der Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in der p130Cas SD für die beschleunigte Tumorentwicklung und ggf. Metastasierung verantwortlich sind (Kumbrink et al. 2016). Dazu wurden fünf trunkierte Varianten der SD mit Src* oder Src^{KM} (Kontrolle) fusioniert und zunächst *in vitro* in einer Brustkrebszelllinie exprimiert und auf Funktionalität untersucht. Da diese Zelllinie in Folgeexperimenten zur Bestimmung des Einflusses der Src*/CasSD-Konstrukte auf die Metastasierung in einem orthotopischen Mausmodell verwendet werden sollte, wurde die aggressive Metastasen bildende LM2-Zelllinie ausgewählt, die zur *in vivo* Verfolgung das Luziferase-Gen exprimiert (Minn et al. 2005). Diese Zelllinie ist von triple-negativen MDA-MB-231 Brustkrebszellen abgeleitet. In der SD des humanen p130Cas sind 15 Tyrosinmotive (YxxP) vorhanden (Kumbrink and Kirsch 2011). Die Testung der verschiedenen trunkierten Src*/CasSD-Konstrukte zeigte, dass der kleinste *in vitro* funktionelle Teil der SD die Motive 6-10 enthielt (Src*/3-Konstrukt). Da in den PyMT-Src*/CasSD-Studien eine schnellere Tumorentstehung

mit der Membranlokalisierung des Fusionsproteins assoziiert wurde (Zhao, Kumbrink et al. 2013), wurde die Lokalisation des Volllängen- (Src^{*}/1) und des kleinsten funktionellen (Src^{*}/3) Proteins auch in LM2-Zellen untersucht. In den LM2-Transduktanten wurde ein signifikant höherer Anteil der Fusionsproteine (69-75%) an Membranen als in den Anti-Östrogen-resistenten Zellen (20%) bestimmt. Anschließend wurden die LM2-Transduktanten (Src^{*}/1, Src^{*}/3 oder Src^{KM}-Kontrollen) in das *mammary fat pad* von *Non-Obese Diabetic severe combined immunodeficiency* (NOD-scid)-Mäusen injiziert und der Einfluss der Fusionsmoleküle auf die Tumorentwicklung und Metastasierung der Zellen durch Biolumineszenz-Bildgebung und Größenmessungen untersucht. Das Volllängenkonstrukt resultierte in signifikant schnellerem Primärtumor-Wachstum und beide Fusionsproteine führten zum vermehrten und früheren Auftreten von Metastasen. Beide Src^{*}/CasSD-Proteine induzierten einen wesentlich schwerwiegenderen Phänotyp, welches durch den gleichzeitigen Nachweis von zum Teil multiplen Metastasen in mehreren Organen (Lunge, Leber, Milz und Niere) in einigen Tieren belegt wurde. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der im verkürzten Src^{*}/3-Konstrukt enthaltene Bereich des endogenen p130Cas für die Progression vom Mammakarzinomen wichtig sein könnte. Diese Region enthält die Tyrosinmotive 6-10 der humanen SD (Y236, Y249, Y267, Y287 und Y306), welche in Proteomstudien (PhosphoSitePlus) als sehr häufig phosphorylierte Motive in Brustkrebs-Patientenproben identifiziert wurden (Hornbeck et al. 2015). Außerdem sind diese Motive für die Bindung von Crk, c-Src und Nck und die Migration von zentraler Bedeutung (Huang et al. 2002, Shin et al. 2004).

Zusammenfassend, betonen die Studien im PyMT- und orthotopischen Mausmodell die Bedeutung der phosphorylierten p130Cas SD, speziell an den Zellmembranen, für die Progression und Metastasierung von Mammakarzinomen und damit die Bedeutung als therapeutisches Ziel in verschiedenen Subtypen von Brustkarzinomen. Unterstützend wurde eine erhöhte p130Cas-Expression u. a. **1.)** in HR+ Brustkrebs gezeigt und mit einer erhöhten Rezidivrate und Anti-Östrogen-Resistenz assoziiert (van der Flier et al. 2000, Kumbrink and Kirsch 2012), **2.)** in triple-negativem Brustkrebs in 77 % der Patientinnen bestimmt (Tornillo et al. 2013), und **3.)** in HER2+ Mammakarzinomen als essentielles Element der HER2-vermittelten Transformation beschrieben und mit einer schlechten Prognose korreliert (Cabodi et al. 2010, Tornillo et al. 2011, Costamagna et al. 2019).

Trotz der starken Evidenz sind bisher keine klinischen Inhibitoren gegen p130Cas verfügbar, allerdings wurden zuletzt vielversprechende Ansätze zur Limitierung der p130Cas-Signalgebung beschrieben. In anderen Studien konnte eine indirekte Inhibition der p130Cas-Phosphorylierung durch die klinisch zugelassenen Inhibitoren Dasatinib (Multikinase-Inhibitor - inklusive c-Src) oder Tirbanibulin (Dual-Inhibitor c-Src/Tubulin; bisher nur *Food and Drug*

Administration (FDA) -Zulassung) erreicht werden. Diese führte zur Sensitivierung von Pankreaskarzinomzellen gegenüber ERK-Inhibition (Waters et al. 2021). Costamagna et al. (2019) konnten durch molekulare Modellierung zwei Verbindungen identifizieren, welche die p130Cas/HER2-Interaktion inhibierten und in HER2+ Brustkrebs-Zelllinien ein erhöhtes Ansprechen auf den HER2-gerichteten Antikörper Trastuzumab vermittelten. Auch wenn der Src*/CasSD-Ansatz als Inhibitor auf Grund der schlecht vorhersagbaren Membranassoziation nicht geeignet ist, konnten dennoch die SD Tyrosinmotive 6-10 als mögliche Ziele für eine gezielte Inhibition durch z. B. *small molecule inhibitors* identifiziert werden (Kumbrink et al. 2016).

2.3 Die Bedeutung von p130Cas in kolorektalen Karzinomen

p130Cas Is Correlated with EREG Expression and a Prognostic Factor Depending on Colorectal Cancer Stage and Localization Reducing FOLFIRI Efficacy.

Kumbrink J, Li P, Pók-Udvari A, Klauschen F, Kirchner T, Jung A (2021).

Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(22), 12364. PMID: 34830244

In eigenen Untersuchungen wurde die Expression verschiedener *BCAR1*/p130Cas-Isoformen in mehreren Organen (u. a. Brust, Kolon, Leber, Niere) sowie im Mammakarzinom und Kolonkarzinom analysiert (Kumbrink et al. 2015). Dabei konnte in Kolonkarzinomen eine deutlich höhere *BCAR1*-Expression als in normalem Kolonepithel nachgewiesen werden. Eine darauf basierende Literaturrecherche zeigte, dass nur wenige Studien die Rolle von *BCAR1*/p130Cas, insbesondere im klinischen Kontext, in kolorektalen Karzinomen (KRK) untersucht haben. Diese Studien beschrieben die Beteiligung von p130Cas an der α 1-integrin/c-Src-vermittelten Invasion von KRK-Zellen (Van Slambrouck et al. 2007), an der durch c-Src regulierten PI3K/AKT-gesteuerten Tumorigenese des Kolons (Zhang et al. 2013, Zhao et al. 2017) und an der durch das *cysteine-rich protein 2* (CSRP2) kontrollierten Suppression der KRK-Progression (Chen et al. 2020). Diese Studien lieferten meist nur indirekte Hinweise für eine Beteiligung von p130Cas bei der kolorektalen Kazinogenese, sodass in eigenen Analysen die funktionelle und eine mögliche klinische Rolle als Biomarker und als Ziel für KRK-spezifische Chemotherapie untersucht wurde (Kumbrink et al. 2021). Dazu wurden Zellkulturexperimente und bioinformatische/statistische Analysen klinischer Datensätze durchgeführt.

Die *BCAR1*-Expression war in TCGA-Datensätzen in Kolon-Adenokarzinomen (KoAd) signifikant höher als in invasiven Mammakarzinomen. Dies ist von besonderem Interesse, da *BCAR1* ursprünglich in Mammakarzinomen als überexprimiert identifiziert und mit Therapieresistenz in Verbindung gebracht wurde (van der Flier et al. 2000, Kumbrink and Kirsch 2011). Die noch höhere Expression in KoAd ließ auf eine ähnliche klinische Bedeutung schließen. Tatsächlich war eine hohe *BCAR1*-Expression signifikant mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit korreliert ($p=0.02$). Vergleichbare p130Cas-Expression und -Phosphorylierung wurden in einem Panel von zehn Darmkrebs- und zwei Brustkrebszelllinien beobachtet, die weder mit Mikrosatelliten-Instabilität noch mit dem Mutationsstatus korreliert waren. RNAi-vermittelter *Knockdown* und Rekonstitutionsexperimente zeigten, dass p130Cas auch in KRK-Zellen die Migration fördert, aber überraschenderweise die Proliferation von KRK-Zellen hemmt. Dieses deutete darauf hin, dass p130Cas die Aktivität oder Expression von z. B. Wachstumsfaktoren limitiert. Daher wurde in der TCGA-Datenbank nach Wachstumsfaktoren gesucht, die an der EGFR-Signalgebung beteiligt sind und deren Expression mit der *BCAR1*-Expression korrelieren.

Der EGFR-Signalweg wurde gewählt, da dieser die Proliferation antreibt und bei vielen Karzinomen (insbesondere bei KRK) ein Ziel für eine EGFR-gerichtete Antikörpertherapie ist (Arnold et al. 2017). Diese Suche ergab eine inverse Spearman Korrelation zwischen der Expression von *BCAR1* und dem EGF-Familienmitglied Epiregulin (EGEG). RNAi-Experimente zeigten, dass *BCAR1* und *EGEG* gegenseitig ihre Expression in KRK-Zellen inhibieren. Darüber hinaus verringerte rekombinantes EGEG die p130Cas-Phosphorylierung und *BCAR1*-Expression. Da p130Cas seine eigene Expression durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus kontrolliert (Kumbrink and Kirsch 2012), könnte eine verringerte Phosphorylierung zu einer niedrigeren *BCAR1*/p130Cas-Expression führen, welches wiederum die Hemmung der EGEG-Expression durch die p130Cas-Signalweiterleitung verhindert. Wie die *BCAR1*- und *EGEG*-Expression bei KRK ausgeglichen/aufrechterhalten werden, ist derzeit nicht bekannt. Andere Faktoren/Mechanismen, wie z. B. eine verstärkte Integrin-Signalübertragung (Nikonova et al. 2014), eine zunehmende c-Src-Aktivität bei der kolorektalen Tumorentstehung (Yeatman 2004) oder Veränderungen im EGR1/NAB2/p130Cas-Netzwerk (Kumbrink and Kirsch 2012, Kumbrink and Kirsch 2013) könnten dazu führen, dass konstitutiv aktives p130Cas die EGEG-Expression inhibiert.

Eine umfassende Analyse der Korrelation der *BCAR1*/*EGEG*-Expression nach Tumor-Stadium und -Lokalisation ergab, dass diese inverse Korrelation in frühen Stadien und bei rechtsseitigen KRK stärker ausgeprägt war. Interessanterweise wurde bei Rektum- und Sigmoidalkarzinomen im Stadium IV sowie in Metastasen (GSE121418) ein Wechsel zu einer positiven *BCAR1*/*EGEG*-Korrelation beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung anderer Faktoren/Mechanismen in linksseitigen Primärtumoren im Spätstadium und Metastasen hin, die ihre Expression beeinflussen, wie z. B. Methylierungsveränderungen innerhalb des EGEG-Promotors (Lee et al. 2016). Darüber hinaus wird die Expression durch extrazelluläre Stimuli und sogar durch therapeutische Medikamente beeinflusst, z. B. p130Cas durch Phorbolster (Kumbrink and Kirsch 2013) oder die Thymidylat-Synthase (TYMS) durch 5-Fluoruracil (5-FU) (Varghese et al. 2019). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass *BCAR1* sowohl durch 5-FU als auch durch FOLFIRI (Folinsäure/5-FU/Irinotecan), ein Therapieschema zur adjuvanten Chemotherapie des metastasierten KRK (mKRK) (onkopedia-Leitlinien-KRK 2018), in Zelllinien induziert wurde und p130Cas und EGEG in Fernmetastasen hochreguliert waren (GSE121418). Außerdem wurden positive p130Cas/EGEG-Korrelationen in Metastasen beobachtet, insbesondere in Proben nach Therapie (speziell in Lungenmetastasen).

BCAR1/p130Cas ist maßgeblich an der Therapieresistenz bei Mammakarzinomen und anderen malignen Erkrankungen beteiligt (Nikonova et al. 2014), während EGEG-Expression

mit einer guten Prognose, insbesondere bei linksseitigen mKRK, assoziiert wurde (Stahler et al. 2016, Stintzing et al. 2018). Um den Einfluss von p130Cas und EREG auf das Chemotherapie-Ansprechen zu untersuchen, wurde die p130Cas-Expression mittels RNAi in KRK-Zellen herunterreguliert und/oder die Zellen parallel mit rekombinantem EREG-Protein behandelt. Der *Knockdown* von p130Cas sensibilisierte die KRK-Zellen für FOLFIRI, während EREG selbst und auf die von p130Cas-vermittelte Wirkung keinen Einfluss hatte. Dies deutet darauf hin, dass p130Cas eine funktionelle/biologische Rolle beim Ansprechen auf FOLFIRI spielt und daher ein therapeutisches Ziel bei KRK-Patienten sein könnte.

Um die Mechanismen aufzuklären, durch die p130Cas zur Malignität von Darmkrebs beiträgt und die Wirksamkeit der Chemotherapie einschränken könnte, wurden vergleichende Transkriptomanalysen durchgeführt. p130Cas wurde durch Gen-Ontologie-Analysen mit EMT, Wnt- und *mammalian target of rapamycin complex 1* (MTORC1)-Signaltransduktion sowie dem Cytochrom P450-vermittelten Metabolismus assoziiert. Mitglieder der Cytochrom P450-Familie sind für die Umwandlung von verschiedenen *Prodrugs* in ihre aktiven Metaboliten erforderlich, wie z. B. Irinotecan, Tegafur (5-FU-Prodrug), Tamoxifen und Cyclophosphamid (Ulrich et al. 2003, van Schaik 2005). Außerdem wurde der Krebsstammzellmarker Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH2), der mit Therapeutika-Efflux/-Resistenz assoziiert ist (Clark and Palle 2016), nach dem *Knockdown* von p130Cas herunterreguliert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass p130Cas die beobachtete verminderte Wirksamkeit von FOLFIRI zum Teil dadurch vermittelt, dass es an Signalwegen beteiligt ist, die Mitglieder der Cytochrom P450-Familie und die ALDH2-Expression kontrollieren. Die Beteiligung an Arzneimittel-Resistenz, EMT und Migration unterstreicht das Potenzial von p130Cas als therapeutisches Ziel beim KRK. Darüber hinaus deuteten die unterschiedlichen Korrelationen der *BCAR1/EREG*-Expressionen in verschiedenen KRK-Stadien und -Lokalisationen auf eine unterschiedliche prognostische Rolle in KRK-Untergruppen/-Stadien hin. Tatsächlich wurden ein signifikant erhöhtes Sterberisiko bei *BCAR1*-exprimierenden rechtsseitigen, Stadium I/II, MSS oder *BRAF*-mutierten KRK gefunden, was darauf hindeutet, dass diese Untergruppen von einer p130Cas-Hemmung profitieren könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *BCAR1/p130Cas* ein prognostischer Marker für verschiedene Subtypen/Stadien des kolorektalen Karzinoms und ein therapeutisches Ziel darstellen könnte. Die identifizierten *BCAR1/EREG*-Expressionskorrelationen könnten bei der künftigen klinischen Behandlung von Patienten von Nutzen sein.

2.4 Identifikation von molekularen Prognosefaktoren und therapeutischen Zielen für Fernmetastasen bei prämenopausalen Patientinnen mit frühem HR+/HER2-Brustkrebs

Molecular Prognostic Factors for Distant Metastases in Premenopausal Patients with HR+/HER2- Early Breast Cancer.

Ni H*, Kumbrink J*, Mayr D, Seiler A, Hagemann F, Degenhardt T, Sagebiel S, Würstlein R, Kates R, Harbeck N, Eggersmann TK (2021).

J Pers Med. 2021 Aug 25;11(9):835. PMID: 34575612. *equal contribution.

Prämenopausale Patientinnen mit Brustkrebs haben im Allgemeinen eine schlechtere Prognose als postmenopausale Patientinnen, insbesondere bei HR+ Tumoren (Kim et al. 2011, Azim et al. 2016). Typische Behandlungsschemata bestehen aus einer endokrinen Therapie mit oder ohne Strahlentherapie und/oder Chemotherapie (Harbeck et al. 2019). Früher HR+/HER2- Brustkrebs ist eine potenziell heilbare Erkrankung. Dennoch sind fast 50% der Tumoren resistent gegenüber einer endokrinen Therapie (Clarke et al. 2015), und etwa 30% der Patientinnen entwickeln Fernmetastasen (Kennecke et al. 2010, Tancredi et al. 2018).

Molekulare Faktoren, welche die Metastasierung bei prämenopausalen Patientinnen mit HR+, HER2- Brustkrebs im Frühstadium fördern, sind weitgehend unbekannt (Harbeck et al. 2019).

Um die Entwicklung einer personalisierten Diagnose und Behandlung bei prämenopausalen Patientinnen voranzutreiben, sollten in eigenen Arbeiten molekulare Prognosefaktoren und therapeutische Ziele für Fernmetastasen bei prämenopausalen Patientinnen mit frühem HR+/HER2- Brustkrebs identifiziert werden (Ni, Kumbrink et al. 2021). Dazu wurden die RNA-Expressionsprofile in Tumoren von prämenopausalen Patientinnen, die Metastasen entwickelten (M1, n=48) und Patientinnen, die keine entwickelten (M0, n=49) mittels Nanostring Analyse mit dem Breast Cancer 360™ Panel analysiert (**Abb. 5**). Dieses Panel umfasst 776 Gene aus deren gemessener Expression ebenfalls 46 Brustkrebs-relevante Expressions-Signaturen inklusive der PAM50-Signatur (molekulare Subtypen) (Wallden et al. 2015) bestimmt werden können.

In der Metastasen-Gruppe (M1) wurden signifikant erhöhte ROR-Scores (*risk of recurrence*, $p=0.006$) und reduzierte Signatur-Scores für PGR (Progesteronrezeptor, $p=0.02$), *claudin-low* ($p=0.02$) und *mammary stemness* ($p=0.04$) festgestellt. Diese Unterschiede waren in univariaten Überlebensanalysen signifikant mit einem kürzeren *distant metastasis free survival* (DMFS) assoziiert.

Der ROR-Score wird in der klinischen Praxis häufig zur Risikobewertung für ein Fern-Rezidiv bei postmenopausalen Patientinnen nach einer endokrinen Therapie angewendet (Gnant et

al. 2014, Duffy et al. 2017). Der ROR-Score wurde basierend auf Daten aus Tumoren von postmenopausalen Patientinnen etabliert und validiert. Bisher gab es keine klaren Ergebnisse hinsichtlich der Anwendbarkeit des ROR-Scores bei prämenopausalen Patientinnen. Unsere Analyse deutet darauf hin, dass der ROR-Score auch bei der Bewertung des Risikos von Fernmetastasen bei prämenopausalen Patientinnen anwendbar sein könnte.

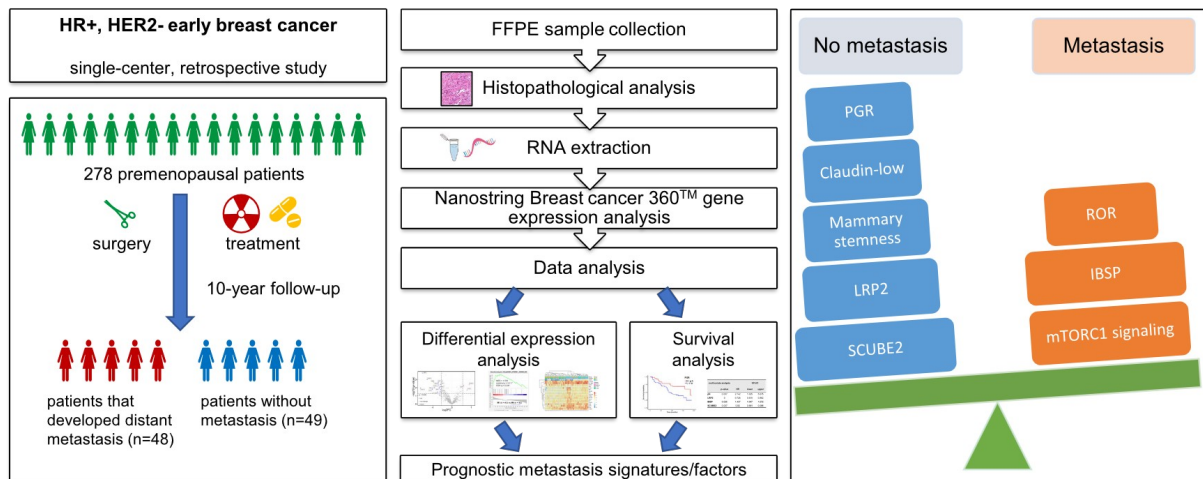


Abb. 5. Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse aus Ni, Kumbrink et al. 2021, J Pers Med., open access.

Die PGR-Signatur besteht aus einem einzigen Gen, dem PGR-Gen, welches für den Progesteron Rezeptor (PR) kodiert. Übereinstimmend mit früheren Studien, die ebenfalls postmenopausale Patientendaten enthielten (Harbeck et al. 2019), waren niedrige PR-Werte mit einem geringeren Überleben bei M1-Patienten verbunden.

Die *claudin-low*-Signatur ist durch eine geringe Expression von Zell-Zell-Adhäsionsgenen, eine hohe Expression von EMT-Genen und einem Stammzell-ähnlichen Expressionsmuster charakterisiert (Prat et al. 2010). Es gibt unterschiedliche Meinungen über den prognostischen Wert des *claudin-low*-Subtyps (Prat et al. 2010, Fougner et al. 2020). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass bei HR+/HER2-prämenopausalen EBC der *claudin-low*-Subtyp mit einer guten Prognose assoziiert ist.

Die *mammary stemness*-Signatur wird durch eine Gruppe von EMT- und Stammzell-ähnlichen Genen definiert (Kotiyal and Bhattacharya 2014). Frühere Studien zeigten, dass Brustkrebsstammzellen bei der Aggressivität und Resistenz von Brusttumoren sowie deren Metastasierung eine wichtige Rolle spielen (Kotiyal and Bhattacharya 2014, Taurin and Alkhalifa 2020). In unserer Patientenkohorte wurde allerdings eine reduzierte *mammary stemness*-Signatur mit Fernmetastasen und kürzerem Überleben assoziiert.

Außerdem wurde in Gen-Ontologie-Analysen eine Anreicherung des mTORC1-Gensets in der M1-Gruppe nachgewiesen. Der mTORC1-Signalweg ist an vielen zellulären Prozessen,

wie dem Zellzyklus, der Proliferation und dem Stoffwechsel, beteiligt und häufig bei Mammakarzinomen dereguliert (Laplante and Sabatini 2012, Steelman et al. 2016). In der klinischen Praxis wird der mTOR-Inhibitor Everolimus bei prä- und postmenopausalen Patientinnen zur Behandlung von HR+/HER2- Brustkrebs eingesetzt, der resistent gegen endokrine Therapie ist (Steelman et al. 2016, NCCN-guidelines 2021). Außerdem werden mTOR-Inhibitoren der zweiten Generation, zu denen Dualinhibitoren spezifisch für mTOR- und PI3K sowie selektive mTORC1/2-Inhibitoren gehören, derzeit in mehreren klinischen Studien getestet (Lee et al. 2015, Mishra et al. 2021).

Darüber hinaus wurde eine Metastasen-Gensignatur aus 19 differentiell exprimierten Genen (DEG) definiert, die sowohl mit Metastasierung als auch mit Überleben signifikant assoziiert waren. Der prognostische Wert von 15 der 19 DEG konnten auch in weiteren unabhängigen ER+/HER2-Datensätzen validiert werden. Die anschließende multivariate Analyse, welche die vier Signaturen (ROR, PGR, *claudin-low*, *mammary stemness*), 19 DEG, pN- und pT-Status einschloss, identifizierte *LDL receptor related protein 2 (LRP2)*, *integrin binding Sialoprotein (IBSP)* und *signal peptide, CUB domain, and EGF-like domain-containing 2 (SCUBE2)* als unabhängige prognostische Faktoren.

Zusammenfassend konnten prognostische Gensignaturen und Einzelgenmarker für Fernmetastasen bei prämenopausalem frühen HR+/HER2- Brustkrebs identifiziert werden, die in der zukünftigen klinischen Praxis Anwendung finden könnten.

3 Ausblick

Im Rahmen des Habilitationsprojektes konnte gezeigt werden, dass **1.)** das identifizierte EGR-NAB2-BCAR1/p130Cas-Netzwerk eine Rolle bei unterschiedlichen Tumoren, insbesondere Mammakarzinomen, spielt. Für die Progression/Metastasierung relevante Phosphorylierungsmotive konnten identifiziert werden, die als Angriffspunkte für zu entwickelnde Inhibitoren dienen könnten. **2.)** BCAR1/p130Cas in KRK ein prognostischer Faktor und therapeutisches Ziel sein könnte, und **3.)** in prämenopausalen HR+/HER2-Mammakarzinomen vier Gensignaturen und die Einzelgenmarker *LRP2*, *IBSP* und *SCUBE2* prognostische Faktoren für Fernmetastasen sein könnten.

In Folgeprojekten sollen daher der Wert von p130Cas als prognostischer Faktor und therapeutisches Ziel in verschiedenen Subtypen des KRK in einer retrospektiven Studie mittels immunhistochemischer Färbungen und Korrelationen mit Überlebensdaten bestimmt werden.

Da die funktionellen Rollen von EGR2, EGR3 und NAB2 im EGR-NAB2-p130Cas System im KRK noch nicht untersucht wurden, sollen dahingehend Analysen in Zellkultursystemen und ggf. Mausmodellen sowie an verfügbaren klinischen Datensätzen durchgeführt werden.

Außerdem soll die mechanistische Bedeutung der in prämenopausalen HR+/HER2-Brusttumoren mit Metastasen und verringertem Überleben assoziierten Marker *LRP2*, *IBSP* und *SCUBE2* in funktionellen Experimenten erforscht werden.

4 Literaturverzeichnis

- Alva, A. S., et al. (2021). "Pembrolizumab in Patients With Metastatic Breast Cancer With High Tumor Mutational Burden: Results From the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study." *J Clin Oncol* **39**(22): 2443-2451.
- Apte, R. S., D. S. Chen and N. Ferrara (2019). "VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development." *Cell* **176**(6): 1248-1264.
- Arnold, D., et al. (2017). "Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials." *Ann Oncol* **28**(8): 1713-1729.
- Azim, H. A., Jr., N. E. Davidson and K. J. Ruddy (2016). "Challenges in Treating Premenopausal Women with Endocrine-Sensitive Breast Cancer." *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **35**: 23-32.
- Bane, A. (2013). "Ductal carcinoma in situ: what the pathologist needs to know and why." *Int J Breast Cancer* **2013**: 914053.
- Baselga, J., et al. (1996). "Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **14**(3): 737-744.
- Brabletz, S., H. Schuhwerk, T. Brabletz and M. P. Stemmler (2021). "Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression." *Embo J* **40**(18): e108647.
- Breitman, T. R., S. E. Selonick and S. J. Collins (1980). "Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(5): 2936-2940.
- Briknarova, K., F. Nasertorabi, M. L. Havert, E. Eggleston, D. W. Hoyt, C. Li, A. J. Olson, K. Vuori and K. R. Ely (2005). "The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130cas) is a four-helix bundle." *J Biol Chem* **280**(23): 21908-21914.
- Brinkman, A., S. van der Flier, E. M. Kok and L. C. Dorssers (2000). "BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells." *J Natl Cancer Inst* **92**(2): 112-120.
- Burnham, M. R., M. T. Harte, A. Richardson, J. T. Parsons and A. H. Bouton (1996). "The identification of p130cas-binding proteins and their role in cellular transformation." *Oncogene* **12**(11): 2467-2472.
- Cabodi, S., et al. (2010). "p130Cas is an essential transducer element in ErbB2 transformation." *Faseb J* **24**(10): 3796-3808.
- Camacho Leal Mdel, P., M. Sciortino, G. Tornillo, S. Colombo, P. Defilippi and S. Cabodi (2015). "p130Cas/BCAR1 scaffold protein in tissue homeostasis and pathogenesis." *Gene* **562**(1): 1-7.
- Camacho Leal, M. D. P., et al. (2018). "Conditional ablation of p130Cas/BCAR1 adaptor protein impairs epidermal homeostasis by altering cell adhesion and differentiation." *Cell Commun Signal* **16**(1): 73.
- Centonze, G., D. Natalini, V. Salemme, A. Costamagna, S. Cabodi and P. Defilippi (2021). "p130Cas/BCAR1 and p140Cap/SRCIN1 Adaptors: The Yin Yang in Breast Cancer?" *Front Cell Dev Biol* **9**: 729093.
- Chen, L., et al. (2020). "CSRP2 suppresses colorectal cancer progression via p130Cas/Rac1 axis-mediated ERK, PAK, and HIPPO signaling pathways." *Theranostics* **10**(24): 11063-11079.
- Clark, D. W. and K. Palle (2016). "Aldehyde dehydrogenases in cancer stem cells: potential as therapeutic targets." *Ann Transl Med* **4**(24): 518.
- Clarke, R., J. J. Tyson and J. M. Dixon (2015). "Endocrine resistance in breast cancer--An overview and update." *Mol Cell Endocrinol* **418 Pt 3**: 220-234.
- Collins, S., M. A. Lutz, P. E. Zarek, R. A. Anders, G. J. Kersh and J. D. Powell (2008). "Opposing regulation of T cell function by Egr-1/NAB2 and Egr-2/Egr-3." *Eur J Immunol* **38**(2): 528-536.

- Collins, S., L. A. Wolfrain, C. G. Drake, M. R. Horton and J. D. Powell (2006). "Cutting Edge: TCR-induced NAB2 enhances T cell function by coactivating IL-2 transcription." *J Immunol* **177**(12): 8301-8305.
- Cooper, J. and F. G. Giancotti (2019). "Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance." *Cancer Cell* **35**(3): 347-367.
- Cortes, J., et al. (2020). "Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial." *Lancet* **396**(10265): 1817-1828.
- Costamagna, A., et al. (2019). "Modeling ErbB2-p130Cas interaction to design new potential anticancer agents." *Sci Rep* **9**(1): 3089.
- Cunningham-Edmondson, A. C. and S. K. Hanks (2009). "p130Cas substrate domain signaling promotes migration, invasion, and survival of estrogen receptor-negative breast cancer cells." *Breast Cancer (Dove Med Press)* **1**: 39-52.
- Damm, S., P. Koefinger, M. Stefan, C. Wels, G. Mehes, E. Richtig, H. Kerl, M. Otte and H. Schaidler (2010). "HGF-promoted motility in primary human melanocytes depends on CD44v6 regulated via NF-kappa B, Egr-1, and C/EBP-beta." *J Invest Dermatol* **130**(7): 1893-1903.
- Deng, B., Z. Sun, W. Jason and P. Yang (2013). "Increased BCAR1 predicts poor outcomes of non-small cell lung cancer in multiple-center patients." *Ann Surg Oncol* **20** Suppl 3: S701-708.
- Dongre, A. and R. A. Weinberg (2019). "New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**(2): 69-84.
- Dorschers, L. C., S. Van der Flier, A. Brinkman, T. van Agthoven, J. Veldscholte, E. M. Berns, J. G. Klijn, L. V. Beex and J. A. Foekens (2001). "Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms." *Drugs* **61**(12): 1721-1733.
- Douillard, J. Y., et al. (2013). "Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer." *N Engl J Med* **369**(11): 1023-1034.
- Drabovich, A. P., M. P. Pavlou, C. Schiza and E. P. Diamandis (2016). "Dynamics of Protein Expression Reveals Primary Targets and Secondary Messengers of Estrogen Receptor Alpha Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells." *Mol Cell Proteomics* **15**(6): 2093-2107.
- Duffy, M. J., N. Harbeck, M. Nap, R. Molina, A. Nicolini, E. Senkus and F. Cardoso (2017). "Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM)." *Eur J Cancer* **75**: 284-298.
- Dunant, N. M., M. Senften and K. Ballmer-Hofer (1996). "Polyomavirus middle-T antigen associates with the kinase domain of Src-related tyrosine kinases." *J Virol* **70**(3): 1323-1330.
- EMA (2021a). "European Medicines Agency: Keytruda, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda>." (October 2021).
- EMA (2021b). "European Medicines Agency: Vectibix, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vectibix>." (October 2021).
- EMA (2021c). "European Medicines Agency: Erbitux, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/erbitux>." (October 2021).
- EMA (2021d). "European Medicines Agency: Enhertu, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/enhertu>." (October 2021).
- Evans, I. M., et al. (2017). "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Promotes Assembly of the p130Cas Interactome to Drive Endothelial Chemotactic Signaling and Angiogenesis." *Mol Cell Proteomics* **16**(2): 168-180.
- Evans, I. M., M. Yamaji, G. Britton, C. Pellet-Many, C. Lockie, I. C. Zachary and P. Frankel (2011). "Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells." *Mol Cell Biol* **31**(6): 1174-1185.
- Fouad, Y. A. and C. Aanei (2017). "Revisiting the hallmarks of cancer." *Am J Cancer Res* **7**(5): 1016-1036.

- Fougner, C., H. Bergholtz, J. H. Norum and T. Sorlie (2020). "Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype." *Nat Commun* **11**(1): 1787.
- Garon, E. B., et al. (2019). "Five-Year Overall Survival for Patients With Advanced NonSmall-Cell Lung Cancer Treated With Pembrolizumab: Results From the Phase I KEYNOTE-001 Study." *J Clin Oncol* **37**(28): 2518-2527.
- Garton, A. J., M. R. Burnham, A. H. Bouton and N. K. Tonks (1997). "Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130cas; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition." *Oncogene* **15**(8): 877-885.
- Ginestier, C., et al. (2006). "Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers." *Clin Cancer Res* **12**(15): 4533-4544.
- Gnant, M., et al. (2014). "Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone." *Ann Oncol* **25**(2): 339-345.
- Gottlieb, K. A. and L. P. Villarreal (2001). "Natural biology of polyomavirus middle T antigen." *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(2): 288-318 ; second and third pages, table of contents.
- Guy, C. T., R. D. Cardiff and W. J. Muller (1992). "Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease." *Mol Cell Biol* **12**(3): 954-961.
- Guy, C. T., S. K. Muthuswamy, R. D. Cardiff, P. Soriano and W. J. Muller (1994). "Activation of the c-Src tyrosine kinase is required for the induction of mammary tumors in transgenic mice." *Genes Dev* **8**(1): 23-32.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hansson, A., Y. E. Marin, J. Suh, A. B. Rabson, S. Chen, E. Huberman, R. L. Chang, A. H. Conney and X. Zheng (2005). "Enhancement of TPA-induced growth inhibition and apoptosis in myeloid leukemia cells by BAY 11-7082, an NF-kappaB inhibitor." *Int J Oncol* **27**(4): 941-948.
- Hao, L., F. Huang, X. Yu, B. Xu, Y. Liu, Y. Zhang and Y. Zhu (2021). "The Role of Early Growth Response Family Members 1-4 in Prognostic Value of Breast Cancer." *Front Genet* **12**: 680132.
- Harbeck, N., F. Penault-Llorca, J. Cortes, M. Gnant, N. Houssami, P. Poortmans, K. Ruddy, J. Tsang and F. Cardoso (2019). "Breast cancer." *Nat Rev Dis Primers* **5**(1): 66.
- Hart, K. C. and D. J. Donoghue (1997). "Derivatives of activated H-ras lacking C-terminal lipid modifications retain transforming ability if targeted to the correct subcellular location." *Oncogene* **14**(8): 945-953.
- Harte, M. T., J. D. Hildebrand, M. R. Burnham, A. H. Bouton and J. T. Parsons (1996). "p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase." *J Biol Chem* **271**(23): 13649-13655.
- Heumann, A., et al. (2018). "High BCAR1 expression is associated with early PSA recurrence in ERG negative prostate cancer." *BMC Cancer* **18**(1): 37.
- Hoesel, B., et al. (2018). "Androgen receptor dampens tissue factor expression via nuclear factor-kappaB and early growth response protein 1." *J Thromb Haemost* **16**(4): 749-758.
- Hornbeck, P. V., B. Zhang, B. Murray, J. M. Kornhauser, V. Latham and E. Skrzypek (2015). "PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations." *Nucleic Acids Res* **43**(Database issue): D512-520.
- Huang, J., H. Hamasaki, T. Nakamoto, H. Honda, H. Hirai, M. Saito, T. Takato and R. Sakai (2002). "Differential regulation of cell migration, actin stress fiber organization, and cell transformation by functional domains of Crk-associated substrate." *J Biol Chem* **277**(30): 27265-27272.
- Huang, W., B. Deng, R. W. Wang, Q. Y. Tan and Y. G. Jiang (2013). "Expression of breast cancer anti-estrogen resistance 1 in relation to vascular endothelial growth factor, p53, and prognosis in esophageal squamous cell cancer." *Dis Esophagus* **26**(5): 528-537.

- Inoue, A., Y. Omoto, Y. Yamaguchi, R. Kiyama and S. I. Hayashi (2004). "Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells." *J Mol Endocrinol* **32**(3): 649-661.
- Janostiak, R., et al. (2014). "CAS directly interacts with vinculin to control mechanosensing and focal adhesion dynamics." *Cell Mol Life Sci* **71**(4): 727-744.
- Jove, R., S. Kornbluth and H. Hanafusa (1987). "Enzymatically inactive p60c-src mutant with altered ATP-binding site is fully phosphorylated in its carboxy-terminal regulatory region." *Cell* **50**(6): 937-943.
- Kennecke, H., R. Yerushalmi, R. Woods, M. C. Cheang, D. Voduc, C. H. Speers, T. O. Nielsen and K. Gelmon (2010). "Metastatic behavior of breast cancer subtypes." *J Clin Oncol* **28**(20): 3271-3277.
- Khachigian, L. M. (2016). "Early growth response-1 in the pathogenesis of cardiovascular disease." *J Mol Med (Berl)* **94**(7): 747-753.
- Khachigian, L. M., A. J. Williams and T. Collins (1995). "Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells." *J Biol Chem* **270**(46): 27679-27686.
- Kim, E. K., W. C. Noh, W. Han and D. Y. Noh (2011). "Prognostic significance of young age (<35 years) by subtype based on ER, PR, and HER2 status in breast cancer: a nationwide registry-based study." *World J Surg* **35**(6): 1244-1253.
- Kirsch, K., M. Kensinger, H. Hanafusa and A. August (2002). "A p130Cas tyrosine phosphorylated substrate domain decoy disrupts v-crk signaling." *BMC Cell Biol* **3**: 18.
- Kirsch, K. H., M. M. Georgescu and H. Hanafusa (1998). "Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G." *J Biol Chem* **273**(40): 25673-25679.
- Kirsch, K. H., M. M. Georgescu, S. Ishimaru and H. Hanafusa (1999). "CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6211-6216.
- Kirsch, K. H., Y. Korradi and J. P. Johnson (1996). "Mader: a novel nuclear protein over expressed in human melanomas." *Oncogene* **12**(5): 963-971.
- Konstantinovskiy, S., Y. Smith, S. Zilber, H. Tuft Stavnes, A. M. Becker, J. M. Nesland, R. Reich and B. Davidson (2010). "Breast carcinoma cells in primary tumors and effusions have different gene array profiles." *J Oncol* **2010**: 969084.
- Kotiyal, S. and S. Bhattacharya (2014). "Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets." *Biochem Biophys Res Commun* **453**(1): 112-116.
- Kumbrink, J., A. de la Cueva, S. Soni, N. Sailer and K. H. Kirsch (2016). "A truncated phosphorylated p130Cas substrate domain is sufficient to drive breast cancer growth and metastasis formation in vivo." *Tumour Biol* **37**(8): 10665-10673.
- Kumbrink, J., M. Gerlinger and J. P. Johnson (2005). "Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop." *J Biol Chem* **280**(52): 42785-42793.
- Kumbrink, J. and K. H. Kirsch (2011). "Targeting Cas Family Proteins as a Novel Treatment for Breast Cancer." *Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities*. Esra Gunduz and Mehmet Gunduz (Ed.), InTech. (ISBN: 978-953-307-776-5, 37-62).
- Kumbrink, J. and K. H. Kirsch (2012). "Regulation of p130(Cas)/BCAR1 expression in tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant breast cancer cells by EGR1 and NAB2." *Neoplasia* **14**(2): 108-120.
- Kumbrink, J. and K. H. Kirsch (2013). "p130Cas acts as survival factor during PMA-induced apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(3): 531-535.
- Kumbrink, J., K. H. Kirsch and J. P. Johnson (2010). "EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin." *J Cell Biochem* **111**(1): 207-217.
- Kumbrink, J., P. Li, A. Pok-Udvari, F. Klauschen, T. Kirchner and A. Jung (2021). "p130Cas Is Correlated with EREG Expression and a Prognostic Factor Depending on Colorectal Cancer Stage and Localization Reducing FOLFIRI Efficacy." *Int J Mol Sci* **22**(22).

- Kumbrink, J., S. Soni, B. Laumbacher, B. Loesch and K. H. Kirsch (2015). "Identification of Novel Crk-associated Substrate (p130Cas) Variants with Functionally Distinct Focal Adhesion Kinase Binding Activities." *J Biol Chem* **290**(19): 12247-12255.
- Laplane, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." *Cell* **149**(2): 274-293.
- Law, S. F., Y. Z. Zhang, S. J. Fashena, G. Toby, J. Estojak and E. A. Golemis (1999). "Dimerization of the docking/adaptor protein HEF1 via a carboxy-terminal helix-loop-helix domain." *Exp Cell Res* **252**(1): 224-235.
- Lee, J. J., K. Loh and Y. S. Yap (2015). "PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer." *Cancer Biol Med* **12**(4): 342-354.
- Lee, M. S., et al. (2016). "Association of CpG island methylator phenotype and EREG/AREG methylation and expression in colorectal cancer." *Br J Cancer* **114**(12): 1352-1361.
- Leszczyniecka, M., T. Roberts, P. Dent, S. Grant and P. B. Fisher (2001). "Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications." *Pharmacol Ther* **90**(2-3): 105-156.
- Li, E., D. G. Stupack, S. L. Brown, R. Klemke, D. D. Schlaepfer and G. R. Nemerow (2000). "Association of p130CAS with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry." *J Biol Chem* **275**(19): 14729-14735.
- Lin, E. Y., J. G. Jones, P. Li, L. Zhu, K. D. Whitney, W. J. Muller and J. W. Pollard (2003). "Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases." *Am J Pathol* **163**(5): 2113-2126.
- Liu, D., I. Evans, G. Britton and I. Zachary (2008). "The zinc-finger transcription factor, early growth response 3, mediates VEGF-induced angiogenesis." *Oncogene* **27**(21): 2989-2998.
- Liu, F., D. E. Hill and J. Chernoff (1996). "Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas)." *J Biol Chem* **271**(49): 31290-31295.
- Loupakis, F., et al. (2014). "Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer." *N Engl J Med* **371**(17): 1609-1618.
- Ma, J., et al. (2009). "Targeted knockdown of EGR-1 inhibits IL-8 production and IL-8-mediated invasion of prostate cancer cells through suppressing EGR-1/NF-kappaB synergy." *J Biol Chem* **284**(50): 34600-34606.
- Makkinje, A., R. I. Near, G. Infusini, P. Vanden Borre, A. Bloom, D. Cai, C. E. Costello and A. Lerner (2009). "AND-34/BCAR3 regulates adhesion-dependent p130Cas serine phosphorylation and breast cancer cell growth pattern." *Cell Signal* **21**(9): 1423-1435.
- Minn, A. J., et al. (2005). "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung." *Nature* **436**(7050): 518-524.
- Mishra, R., H. Patel, S. Alanazi, M. K. Kilroy and J. T. Garrett (2021). "PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects." *Int J Mol Sci* **22**(7).
- Motz, G. T., et al. (2014). "Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors." *Nat Med* **20**(6): 607-615.
- Nakamoto, T., R. Sakai, H. Honda, S. Ogawa, H. Ueno, T. Suzuki, S. Aizawa, Y. Yazaki and H. Hirai (1997). "Requirements for localization of p130cas to focal adhesions." *Mol Cell Biol* **17**(7): 3884-3897.
- Nakamoto, T., T. Yamagata, R. Sakai, S. Ogawa, H. Honda, H. Ueno, N. Hirano, Y. Yazaki and H. Hirai (2000). "CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1649-1658.
- NCCN-guidelines (2021). "Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer; Version 4.2021." *NCCN: Plymouth Meeting, PA, USA, 2021*: p. 79.
- Ni, H., et al. (2021). "Molecular Prognostic Factors for Distant Metastases in Premenopausal Patients with HR+/HER2- Early Breast Cancer." *J Pers Med* **11**(9).
- Nikonova, A. S., A. V. Gaponova, A. E. Kudinov and E. A. Golemis (2014). "CAS proteins in health and disease: an update." *IUBMB Life* **66**(6): 387-395.

- onkopedia-Leitlinien-APL (2020). "<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-promyelozyten-leukaemie-apl/@@guideline/html/index.html#ID0EFHAE>."
- onkopedia-Leitlinien-KRK (2018). "<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/kolonkarzinom/@@guideline/html/index.html>."
- Polte, T. R. and S. K. Hanks (1995). "Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23): 10678-10682.
- Prat, A., J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He and C. M. Perou (2010). "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer." *Breast Cancer Res* **12**(5): R68.
- Radvanyi, L., et al. (2005). "The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 11005-11010.
- Rho, O., D. J. Kim, K. Kiguchi and J. Digiovanni (2011). "Growth factor signaling pathways as targets for prevention of epithelial carcinogenesis." *Mol Carcinog* **50**(4): 264-279.
- Ruschoff, J., et al. (2021). "MSI testing : What's new? What should be considered?" *Pathologe*.
- Saha, S. K., et al. (2021). "Prognostic role of EGR1 in breast cancer: a systematic review." *BMB Rep* **54**(10): 497-504.
- Sakai, R., A. Iwamatsu, N. Hirano, S. Ogawa, T. Tanaka, H. Mano, Y. Yazaki and H. Hirai (1994). "A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner." *Embo J* **13**(16): 3748-3756.
- Sevetson, B. R., J. Svaren and J. Milbrandt (2000). "A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene." *J Biol Chem* **275**(13): 9749-9757.
- Shah, M. A., et al. (2016). "Impact of Patient Factors on Recurrence Risk and Time Dependency of Oxaliplatin Benefit in Patients With Colon Cancer: Analysis From Modern-Era Adjuvant Studies in the Adjuvant Colon Cancer End Points (ACCENT) Database." *J Clin Oncol* **34**(8): 843-853.
- Shin, N. Y., R. S. Dize, J. Schneider-Mergener, M. D. Ritchie, D. M. Kilkenny and S. K. Hanks (2004). "Subsets of the major tyrosine phosphorylation sites in Crk-associated substrate (CAS) are sufficient to promote cell migration." *J Biol Chem* **279**(37): 38331-38337.
- Soni, S., B. T. Lin, A. August, R. I. Nicholson and K. H. Kirsch (2009). "Expression of a phosphorylated p130(Cas) substrate domain attenuates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway in tamoxifen resistant breast cancer cells." *J Cell Biochem* **107**(2): 364-375.
- Stahler, A., et al. (2016). "Influence of mRNA expression of epiregulin and amphiregulin on outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-FU/LV plus irinotecan or irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment (FIRE 1-trial)." *Int J Cancer* **138**(3): 739-746.
- Steelman, L. S., A. M. Martelli, L. Cocco, M. Libra, F. Nicoletti, S. L. Abrams and J. A. McCubrey (2016). "The therapeutic potential of mTOR inhibitors in breast cancer." *Br J Clin Pharmacol* **82**(5): 1189-1212.
- Stintzing, S., et al. (2018). "Amphiregulin (AREG) and Epiregulin (EREG) Gene Expression as Predictor for Overall Survival (OS) in Oxaliplatin/Fluoropyrimidine Plus Bevacizumab Treated mCRC Patients-Analysis of the Phase III AIO KRK-0207 Trial." *Front Oncol* **8**: 474.
- Stintzing, S., et al. (2016). "FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial." *Lancet Oncol* **17**(10): 1426-1434.
- Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray (2021). "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA Cancer J Clin* **71**(3): 209-249.
- Suzuki, T., et al. (2007). "Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor." *Endocr Relat Cancer* **14**(2): 279-292.
- Svaren, J., B. R. Sevetson, E. D. Apel, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu and J. Milbrandt (1996). "NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli." *Mol Cell Biol* **16**(7): 3545-3553.

- Ta, H. Q., K. S. Thomas, R. S. Schrecengost and A. H. Bouton (2008). "A novel association between p130Cas and resistance to the chemotherapeutic drug adriamycin in human breast cancer cells." *Cancer Res* **68**(21): 8796-8804.
- Tancredi, R., J. Furlanetto and S. Loibl (2018). "Endocrine Therapy in Premenopausal Hormone Receptor Positive/Human Epidermal Growth Receptor 2 Negative Metastatic Breast Cancer: Between Guidelines and Literature." *Oncologist* **23**(8): 974-981.
- Taurin, S. and H. Alkhalifa (2020). "Breast cancers, mammary stem cells, and cancer stem cells, characteristics, and hypotheses." *Neoplasia* **22**(12): 663-678.
- Thiel, G. and G. Cibelli (2002). "Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1." *J Cell Physiol* **193**(3): 287-292.
- Tikhmyanova, N. and E. A. Golemis (2011). "NEDD9 and BCAR1 negatively regulate E-cadherin membrane localization, and promote E-cadherin degradation." *PLoS One* **6**(7): e22102.
- Tornillo, G., B. Bisaro, P. Camacho-Leal Mdel, M. Galie, P. Provero, P. Di Stefano, E. Turco, P. Defilippi and S. Cabodi (2011). "p130Cas promotes invasiveness of three-dimensional ErbB2-transformed mammary acinar structures by enhanced activation of mTOR/p70S6K and Rac1." *Eur J Cell Biol* **90**(2-3): 237-248.
- Tornillo, G., et al. (2013). "p130Cas alters the differentiation potential of mammary luminal progenitors by deregulating c-Kit activity." *Stem Cells* **31**(7): 1422-1433.
- Tsiftoglou, A. S., I. S. Pappas and I. S. Vizirianakis (2003). "Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells." *Pharmacol Ther* **100**(3): 257-290.
- Ulrich, C. M., K. Robien and H. L. McLeod (2003). "Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond." *Nat Rev Cancer* **3**(12): 912-920.
- van der Flier, S., A. Brinkman, M. P. Look, E. M. Kok, M. E. Meijer-van Gelder, J. G. Klijn, L. C. Dorssers and J. A. Foekens (2000). "Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and response to tamoxifen treatment." *J Natl Cancer Inst* **92**(2): 120-127.
- van Schaik, R. H. (2005). "Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes." *Invest New Drugs* **23**(6): 513-522.
- Van Slambrouck, S., C. Grijelmo, O. De Wever, E. Bruyneel, S. Emami, C. Gespach and W. F. Steelant (2007). "Activation of the FAK-src molecular scaffolds and p130Cas-JNK signaling cascades by alpha1-integrins during colon cancer cell invasion." *Int J Oncol* **31**(6): 1501-1508.
- Varghese, V., L. Magnani, N. Harada-Shoji, F. Mauri, R. M. Szydlo, S. Yao, E. W. Lam and L. M. Kenny (2019). "FOXO1 modulates 5-FU resistance in colorectal cancer through regulating TYMS expression." *Sci Rep* **9**(1): 1505.
- Wallden, B., et al. (2015). "Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay." *BMC Med Genomics* **8**: 54.
- Wang, B., H. Guo, H. Yu, Y. Chen, H. Xu and G. Zhao (2021). "The Role of the Transcription Factor EGR1 in Cancer." *Front Oncol* **11**: 642547.
- Waters, A. M., et al. (2021). "Targeting p130Cas- and microtubule-dependent MYC regulation sensitizes pancreatic cancer to ERK MAPK inhibition." *Cell Rep* **35**(13): 109291.
- Yaginuma, T., et al. (2020). "p130Cas induces bone invasion by oral squamous cell carcinoma by regulating tumor epithelial-mesenchymal transition and cell proliferation." *Carcinogenesis* **41**(8): 1038-1048.
- Yeaman, T. J. (2004). "A renaissance for SRC." *Nat Rev Cancer* **4**(6): 470-480.
- Zhang, P., A. Guo, A. Possemato, C. Wang, L. Beard, C. Carlin, S. D. Markowitz, R. D. Polakiewicz and Z. Wang (2013). "Identification and functional characterization of p130Cas as a substrate of protein tyrosine phosphatase nonreceptor 14." *Oncogene* **32**(16): 2087-2095.
- Zhao, Y., J. Kumbrink, B. T. Lin, A. H. Bouton, S. Yang, P. A. Toselli and K. H. Kirsch (2013). "Expression of a phosphorylated substrate domain of p130Cas promotes PyMT-induced c-Src-dependent murine breast cancer progression." *Carcinogenesis* **34**(12): 2880-2890.

Zhao, Y., A. Scott, P. Zhang, Y. Hao, X. Feng, S. Somasundaram, A. M. Khalil, J. Willis and Z. Wang (2017). "Regulation of paxillin-p130-PI3K-AKT signaling axis by Src and PTPRT impacts colon tumorigenesis." *Oncotarget* **8**(30): 48782-48793.

Zheng, X., R. Ravatn, Y. Lin, W. C. Shih, A. Rabson, R. Strair, E. Huberman, A. Conney and K. V. Chin (2002). "Gene expression of TPA induced differentiation in HL-60 cells by DNA microarray analysis." *Nucleic Acids Res* **30**(20): 4489-4499.

5 Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Andreas Jung und Prof. Dr. Kathrin Kirsch für die langjährige Unterstützung und ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ich möchte mich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Studien am Pathologischen Institut der LMU München bei Herrn Prof. Dr. Kirchner und Herrn Prof. Dr. Klauschen und am Department of Biochemistry der Boston University bei Herrn Prof. Dr. David Harris bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Andreas Jung, besonders Ágnes Pok-Údvari und Sabine Sagebiel-Kohler, und der damaligen AG Kathrin Kirsch, insbesondere Dr. Ana de la Cueva und Dr. Yingshe Zhao, für die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die engagierte Arbeit bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank Prof. Dr. Thomas Kirchner und Prof. Dr. Doris Mayr für die Unterstützung und Einbeziehung in Kollaborationsprojekte. Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Jens Neumann und PD Dr. Marlies Michl für die *fruitful* Kooperationen bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei den technischen Mitarbeitern/-innen, insbesondere der molekularen Pathologie, des Pathologischen Instituts.

Mein Dank gilt ferner den zahlreichen Kooperationspartnern/-innen, insbesondere in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III und der Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums der Universität München.

Last, but not least geht mein Dank erneut an Stephan Lehmann, Barbara Lösch und meine Mutter, die durch ihre Unterstützung und Hospitalität die Finalisierung einiger Studien und damit auch dieser Arbeit ermöglicht haben.

6 Originalarbeiten

Regulation of p130Cas/BCAR1 expression in tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant breast cancer cells by EGR1 and NAB2.

Kumbrink, J and Kirsch, KH (2012).

Neoplasia 14: 108-120. PMID: 22431919. <https://doi.org/10.1593/neo.111760>

EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin.

Kumbrink, J, Kirsch, KH, and Johnson, JP (2010).

J Cell Biochem. Sep 1; 111(1): 207-17. PMID: 20506119. <https://doi.org/10.1002/jcb.22690>

p130Cas acts as survival factor during PMA-induced apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells.

Kumbrink, J and Kirsch, KH (2013).

Int J Biochem Cell Biol. Mar;45(3):531-5. doi: 10.1016/j.biocel.2012.12.017. Epub 2012 Dec 31. PMID: 23287717. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.12.017>

A truncated phosphorylated p130Cas substrate domain is sufficient to drive breast cancer growth and metastasis formation in vivo.

Kumbrink J, de la Cueva A, Soni S, Sailer N, Kirsch KH (2016).

Tumour Biol. Aug;37(8):10665-73. doi: 10.1007/s13277-016-4902-8. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26867768. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4902-8>

Expression of a Phosphorylated Substrate Domain of p130Cas Promotes PyMT-induced c-Src-dependent Murine Breast Cancer Progression.

Zhao, Y*, **Kumbrink, J***, Lin, BT, Bouton, AH, Yang, S, Toselli, PA, and Kirsch, KH (2013).

Carcinogenesis Dec;34(12):2880-90. doi: 10.1093/carcin/bgt238. Epub 2013 Jul 3. PMID: 23825155. *equal contribution. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt238>

p130Cas Is Correlated with EREG Expression and a Prognostic Factor Depending on Colorectal Cancer Stage and Localization Reducing FOLFIRI Efficacy.

Kumbrink J, Li P, Pók-Udvari A, Klauschen F, Kirchner T, Jung A (2021).

Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(22), 12364. PMID: 34830244. <https://doi.org/10.3390/ijms222212364>

Molecular Prognostic Factors for Distant Metastases in Premenopausal Patients with HR+/HER2- Early Breast Cancer.

Ni H*, **Kumbrink J***, Mayr D, Seiler A, Hagemann F, Degenhardt T, Sagebiel S, Würstlein R, Kates R, Harbeck N, Eggersmann TK (2021).

J Pers Med. 2021 Aug 25;11(9):835. PMID: 34575612. <https://doi.org/10.3390/jpm11090835>
*equal contribution.