

Entdeckung, Charakterisierung und Modulation des Tumorstammzellsystems im WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Florian Olivier Wegwitz

(Dipl. Biochemiker)

geboren am 13.03.1980

in Grasse (FR)

Hamburg 2010

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von März 2006 bis November 2010 am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Jannasch K., Dullin C., Heinlein C., Krepulat F., Wegwitz F., Deppert W. and Alves F. (2009). "Detection of different tumor growth kinetics in single transgenic mice with oncogene-induced mammary carcinomas by flat-panel volume computed tomography." **Int J Cancer** 125(1): 62-70.

Wegwitz F.*, Kluth M. A.*, Manz C.*, Otto B., Gruner K., Heinlein C., Kuhl M., Warnecke G., Schumacher U., Deppert W. and Tolstonog G. V. (2010). "Tumorigenic WAP-T Mouse Mammary Carcinoma Cells: A Model for a Self-Reproducing Homeostatic Cancer Cell System." **PLoS One** 5(8).

Gerstel D.*, Wegwitz F.*, Jannasch K., Ludwig P., Scheike K., Alves F., Beauchemin N., Deppert W., Wagener C. and Horst A. K. „CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation" **Oncogene**, (in Revision)

Gerstel D., Pospisil H., Wegwitz F., Scheike K., Reinhold C., Klatschke K., Brandner J., Wicklein D., Schumacher U., Beauchemin N., Tolstonog G., Deppert W., Wagener C. and Horst A. K. "CEACAM1-expression inhibits pulmonary metastases in murine mammary carcinomas via compartmentalization of TGF β -induced CLUSTERIN expression" **Oncogene**, (eingereicht).

* Gleichberechtigte Erstautorschaften

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Disputationsdatum: 28. Januar 2011

Pour Noah

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABSTRACT	VIII
I EINLEITUNG	1
I.1 Brustkrebs	1
I.2 Die Brustdrüse der Maus	1
I.2.1 Pränatale Entwicklung	2
I.2.2 Postnatale Entwicklung	2
I.2.3 Die adulte Brustdrüse	3
I.3 Stammzellen und Hierarchie in der Brustdrüse	5
I.3.1 Definition der Stammzelle	5
I.3.2 Die Brustdrüsen-Stammzelle	6
I.4 Mechanismen der Entstehung und der Progression von Krebs	8
I.4.1 Das Modell der klonalen Evolution	9
I.4.2 Die Tumorstammzelltheorie	11
I.4.2.1 Therapeutische Implikationen der Tumorstammzelltheorie	12
I.4.2.2 Implikation des Tumorstammzellmodells für die Biologie des Tumors	13
I.4.2.3 Entwicklung des Tumorstammzellmodells in humanen myeloischen Leukämien	13
I.4.2.4 Tumorstammzellen in soliden Tumoren	14
I.4.2.5 Brustkrebs und Stammzellen	15
I.4.3 Tumorstammzellen in Mammakarzinom-Mausmodellen	18
I.4.4 Die ALDH enzymatische Aktivität als Bruststammzell- und Tumorstammzellmarker	20
I.4.5 Stammzell- und Tumorstammzellnische	21
I.4.5.1 CEACAM1 in normalen Gewebe	23
I.4.5.2 CEACAM1 in der Tumorentwicklung	25
I.5 Das WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell	27
I.6 Problemstellung	29
II MATERIAL	31
II.1 BIOLOGISCHES MATERIAL	31
II.1.1 Mausstämme	31
II.1.2 WAP-T transgene Mauslinien	31
II.1.3 CEACAM1 ^{-/-} und CEACAM ^{Endo+} Mauslinien	32

INHALTSVERZEICHNIS	II	
<hr/>		
II.2	Geräte	33
II.3	Chemikalien	34
II.4	Verbrauchsmaterialien	35
II.5	Lösungen und Arzneimittel für Transplantationen	36
II.6	Chemikalien für die Zellkultur	36
II.7	Kits	36
II.8	Enzyme	37
II.9	Antikörper	37
II.9.1	Primärantikörper	37
II.9.2	Sekundäre Antikörper (für IF)	37
II.9.3	Sekundäre Antikörper (für IHC)	38
II.10	Größenstandards:	38
II.11	Oligonukleotide	38
II.11.1	Oligonukleotide für standard PCR	38
II.11.2	Oligonukleotide für qRT-PCR	39
II.12	Lösungen und Puffer	41
III	METHODEN	42
III.1	Züchtung und Anwendung experimenteller Methoden an Tieren	42
III.1.1	Zucht	42
III.1.2	Genotypisierung der Transgentiere	42
III.1.3	Induktion und Beobachtung von Mammakarzinomen bei WAP-T Mäusen	42
III.1.4	Organentnahme	42
III.1.5	Tumorzelltransplantation	43
III.1.6	Injektion von mit FITC markiertem Dextran.	44
III.2	Immunhistologische Methoden	44
III.2.1	Anwendung immunhistologischer Methoden an Paraffinschnitten	44
III.2.1.1	Gewebefixierung in Formalin, Paraffin-Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten	44
III.2.1.2	Herstellung von Gewebeschnitten am Mikrotom	45
III.2.1.3	Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitten	45
III.2.1.4	H&E-Färbung	46
III.2.1.5	Immunhistochemie für das SV40 Large T-Antigen	46
III.2.1.6	Aufnahmen von H&E und IHC-Färbungen	47
III.2.2	Verwendung immunhistologischer Methoden an Kryoschnitten	47
III.2.2.1	Gewebefixierung in Kryomatrix und Herstellung von Kryoschnitten	47
III.2.2.2	Herstellung von Kryoschnitten	48

III.2.2.3	Herstellung einer 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) zur Fixierung von Kryoschnitten	48
III.2.2.4	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten	48
III.2.2.5	Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung auf kultivierten G-2 Zellen	50
III.2.2.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	51
III.2.2.7	Verarbeitung und Auswertung von LSM-Aufnahmen	53
III.3	Versuche mit eukaryotischen Zellen	53
III.3.1	Zellkulturmethoden	53
III.3.1.1	Passagieren von G-2 Zellen	53
III.3.1.2	Kryokonservierung von G-2 Zellen	54
III.3.2	Methoden für Primärzellen	54
III.3.2.1	Dissoziation von Primärtumorzellen aus WAP-T Tumoren	54
III.3.2.2	Entfernung reifer Blutzellen aus Primärtumorzellsuspension: <i>Lineage Cell Depletion</i>	55
III.3.3	Methoden der Durchflusszytometrie	56
III.3.3.1	Markierung von Tumorstamm- und Tumorigenitorzellen mittels des Aldefluor®-Assays	56
III.3.3.2	Antikörpermarkierung von Zellen für durchflusszytometrische Analysen	56
III.3.3.3	Durchflusszytometrische Analyse und Trennung von Zellen	57
III.4	Molekularbiologische Methoden	58
III.4.1	Aufreinigung muriner genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	58
III.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	58
III.4.3	Identifizierung transgener WAP-T Tiere mittels PCR	59
III.4.4	Gelelektrophoretische Auftrennung	60
III.4.5	RNA-Isolierung aus Proben mit geringer Zellenzahl	61
III.4.6	RNA-Isolierung aus eingefrorenem Gewebe	61
III.4.7	Bestimmung der Nukleinsäure (DNA bzw. RNA)-Konzentration einer Lösung	62
III.4.8	Rnase-freie Agarose-Gelelektrophorese zur Bestimmung der RNA-Qualität	62
III.4.9	Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA Synthese)	62
III.4.10	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	63
III.4.11	Microarrays	65
IV	ERGEBNISSE	66
IV.1	Charakterisierung der WAP-T Tumore	66
IV.1.1	Cytokeratine als lineage-spezifische Marker	66
IV.1.1.1	Cytokeratine 8/18 und Cytokeratin 14	69
IV.1.1.2	Cytokeratin 6	71
IV.1.1.3	RNA-Microarrays von WAP-T-NP8 Tumoren	72
IV.1.1.4	Quantitative PCR für die Cytokeratine 6, 14 und 18	74
IV.1.2	Etablierung des Tumorzell-Transplantationsverfahrens	76
IV.1.2.1	Untersuchung der Tumor-initiiierenden Eigenschaften der WAP-T Tumorzellen	76
IV.1.2.2	Kontrolle der Transplantationen in WAP-T Mäuse	78
IV.1.2.3	<i>Lineage</i> -Depletion der primären Tumorzellen	80
IV.1.3	Bestimmung der Frequenz der Tumor-initiiierenden Zellen in WAP-T Tumoren	81
IV.1.4	Charakterisierung und Relevanz der G-2 Zelllinie für das WAP-T Mausmodell	85
IV.1.5	Zellpopulationen mit Tumorstammzeleigenschaften in WAP-T Tumoren	89
IV.1.5.1	Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität in WAP-T Tumoren	89

INHALTSVERZEICHNIS	IV
IV.1.5.2 Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität in G-2 Tumorzellen	95
IV.1.6 Analyse von WAP-T Tumoren auf CSC-assoziierte Oberflächenmarker: Immunfärbungen und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungs-Analysen	98
IV.1.6.1 CD24 (<i>Heat stable antigen</i>)	98
IV.1.6.2 CD49f (Integrin $\alpha 6$)	99
IV.1.6.3 CD29 (Integrin $\beta 1$)	100
IV.1.6.4 CD61 (Integrin $\beta 3$)	101
IV.1.6.5 Sca1 (<i>Stem cell antigen 1</i>)	102
IV.1.6.6 Verteilung einzelner CSC-assoziiertes Oberflächen-Markerkombinationen in Zellpopulationen der G-2 Zelllinie <i>in vitro</i>	104
IV.1.6.7 Metastabilität der G-2 Zellen <i>in vitro</i>	106
IV.1.6.8 Erweiterung des Metastabilitätskonzepts auf Tumorzellen <i>in vivo</i> : transplantierte G-2 und endogene WAP-T Tumore	108
IV.2 Die duale Rolle von CEACAM1 in der WAP-T Mammakarzinogenese	111
IV.2.1 Lokalisierung von CEACAM1 in der normalen Brustdrüse von WAP-T Mäusen und während der Tumorentwicklung	113
IV.2.2 Vergleichende Analyse endogener WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x <i>Ceacam1</i> ^{-/-} Tumore	116
IV.2.3 Vergleich des Metastasierungspotentials von <i>Ceacam1</i> ^{wt} und <i>Ceacam1</i> ^{-/-} WAP-T-NP8 Tumorzellen nach orthotopischer Transplantation in syngenem Empfängertieren	122
IV.2.4 Auswirkung des Verlustes von CEACAM1 auf die Qualität von Blutgefäße in WAP-T Tumore	124
V DISKUSSION:	126
V.1 Charakteristika der WAP-T Tumore	128
V.1.1 Cytokeratine als geeignete <i>lineage</i> -spezifische Marker zur Diskriminierung verschiedener Differenzierungsstatus in WAP-T Tumore	128
V.1.2 Tumorentwickelnde Zellen in WAP-T Mammakarzinomen	132
V.1.3 Tumorentwicklung nach orthotopischer Transplantation primärer WAP-T Tumorzellen in syngenem Tieren	134
V.1.4 Anteil der tumorinitierende Zellen in WAP-T Mammakarzinomen	135
V.1.5 Oberflächenmarker und Vorläufereigenschaften in WAP-T Tumore	138
V.1.6 Oberflächenmarker und Vorläufereigenschaften von G-2 Zellen	139
V.1.7 Aldh-Aktivität und CSC-Eigenschaften in WAP-T Tumoren und G-2 Zellen	142
V.1.8 Konzepte der Tumorstammzellmetastabilität und des „Tumorzellsystems“	144
V.2 Die duale Rolle von CEACAM1 in WAP-T Tumoren	146
V.2.1 Metastatische Eigenschaften von <i>Ceacam1</i> ^{-/-} -Tumorzellen in dem WAP-T Mausmodell	147
V.2.2 Einfluss des Verlustes von CEACAM1 auf die Tumorgefäßqualität	150
V.3 Fazit und Ausblick	152
VI LITERATURVERZEICHNIS	154
VII ANHANG	167

VII.1	Abkürzungsverzeichnis	167
VII.2	Sicherheitstechnischdaten	170
VII.2.1	Verzeichnis der Gefahrensymbole	170
VII.2.2	Verzeichnis der R- und S- Sätze	170
VII.2.2.1	Gefahrenhinweise (R-Sätze)	170
VII.2.2.2	Kombination der R-Sätze	171
VII.2.2.3	Sicherheitsratschläge (S-Sätze)	171
VII.2.2.4	Kombination der S-Sätze	172
VII.2.3	Gefahrenstoffe	172
VII.3	Abbildungsverzeichnis	173
VII.4	Tabellenverzeichnis	175
POSTER, VORTRAGE, KONGRESSTEILNAHMEN, FÖRDERUNG UND KOOPERATION		176
LEBENS LAUF		177
DANKSAGUNG		178
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG		180

ZUSAMMENFASSUNG

Unter allen Krebsarten ist Brustkrebs (lat. Mammakarzinom) mit über 600.000 neuen Fällen pro Jahr die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Frauen in entwickelten Ländern. Trotz intensiver Erforschung der Biologie des Brustkrebs mit über 6000 Publikationen allein im Jahr 2010 liegt das Haupthindernis für bessere und individuellere Therapien immer noch darin, dass die biologischen Mechanismen der Tumorinitiierung und -progression bis heute nur schlecht verstanden sind. Brustkrebs stellt sowohl auf klinischer als auch auf molekularer Ebene eine sehr heterogene Erkrankung dar und erschwert dadurch sowohl die Diagnose als auch die Behandlung. Verschiedene Modelle versuchen die Entstehung und Merkmale von Brustkrebserkrankungen zu erklären. Durch das Grundkonzept, dass adulte Stamm- bzw. Progenitorzellen des normalen Gewebes die Ursprungszelle der Läsion darstellen, bietet die Tumorstammzellentheorie ein sehr attraktives Modell.

In den vergangenen Jahren wurde das WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell wegen seiner großen Ähnlichkeit mit korrespondierenden humanen Läsionen als ein geeignetes Modell zur Analyse früher und später Stadien der Brustkrebsentwicklung etabliert. Um die Mechanismen der Regulation von Tumorstammzellen zu erforschen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Schwerpunkte gesetzt: (i) die Untersuchung der Relevanz der Tumorstammzelltheorie in WAP-T Mammakarzinomen und (ii) die Beantwortung der Frage, die Differenzierung der potentieller Tumorstammzellen beeinflusst werden kann. Um den Vorteil von *in vitro* Untersuchungen zu nutzen, wurde die aus einem WAP-T Tumor etablierte, den Primärtumoren ähnelnde G-2 Zelllinie zusammen mit den endogenen Tumoren analysiert.

Der klassischen Tumorstammzelltheorie nach besitzen Tumore eine durch spezifische molekulare und/oder funktionelle Merkmale definierte kleine tumorigene Tumorstammzellpopulation, die nicht tumorigene differenzierte Tumorzellen als Nachkommen hervorbringen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass endogene WAP-T Mammakarzinome sowie G-2 Zellen viele für Tumorstammzellen beschriebenen Charakteristika, wie eine intrinsische Heterogenität bezüglich der Expression von Differenzierungsmarkern und tumorinitiierender Eigenschaften, aufweisen. Auf der Suche nach spezifischen Phänotypen für Tumorstammzellen wurden WAP-T Tumoren und G-2 Zellen auf die Expression verschiedener Zelloberflächenmarker (CD24, CD29, CD49f, CD61 und Sca1) und eines funktionellen Markers (die Aldh-Aktivität) analysiert. Dabei wurde überraschenderweise beobachtet, dass G-2 Zellen mit Tumorstammzeleigenschaften metastabil sind und *in vitro* mindestens drei verschiedene und interkonvertible Differenzierungsstadien aufweisen. Als verantwortliche Mechanismen

für die Übergänge zwischen den sogenannten „quasi-epithelial“, „intermediär“ und „quasi-mesenchymal“ Phänotypen wurden die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und die mesenchymale-epitheliale Transition (MET) identifiziert. Die Relevanz des Konzepts der Tumorzellmetastabilität konnte *in vivo* auf endogene WAP-T und transplantierte G-2 Tumore erweitert werden. Dementsprechend können Tumorstammzellen der WAP-T Tumore nicht als individuelle Entität mit gut charakterisiertem Phänotyp, sondern vielmehr als homöostatisches heterogenes „Tumorzellsystem“ definiert werden.

Diese Erkenntnisse haben weitreichende Konsequenzen für das Konzept einer Tumorstammzell-spezifischen Therapie und weisen darauf hin, dass ein gezielter Einfluss auf die Metastabilität von Tumorzellsystemen die Effizienz von Behandlungen deutlich steigern könnte.

Das *carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) ist u. A. auf normalen differenzierten Epithelzellen und Endothelzellen der Brustdrüse exprimiert und wird während der Progression zahlreicher Karzinome herunterreguliert. Daher stellte im zweiten Teil der Arbeit CEACAM1 einen interessanten Kandidaten zur Modulation des metastabilen Zustandes von WAP-T Tumorzellen dar. In *in vivo* Analysen zeigten WAP-T Tumortiere mit ausgeschaltetem *Ceacam1*-Gen eine deutlich erhöhte Metastasierungsrate im Vergleich zu *Ceacam1*^{wt}-Tumortieren. Weitere Untersuchungen ermöglichten das Aufdecken einer dualen Rolle von CEACAM1 während der Tumorprogression: (i) der Verlust von CEACAM1 auf Tumorzellen verursacht einen ausgeprägt aggressiveren EMT-Phänotyp, während (ii) der Verlust von CEACAM1 in der Tumormikroumgebung eine Begünstigung der Tumorzell dissemination durch erhöhte Gefäßpermeabilität zur Folge hat. Es konnte somit gezeigt werden, dass CEACAM1 in die Regulation der Metastabilität von WAP-T Tumorzellen involviert ist.

Zusammenfassend betonen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wie wichtig die genaue Charakterisierung von Tumorzellsystemen und deren Regulationsmechanismen für eine Verbesserung von Krebstherapien ist. Das WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell bietet hierbei ein hervorragendes Werkzeug für weitere Studien über die Tumorzellmetastabilität und die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

ABSTRACT

Among all types of cancer breast cancer (also termed mammary carcinoma) is the most common cancerous disease of women in developed countries with over 600.000 new cases per year. Over 6000 publications on breast cancer for the year 2010 only underscore the intense focus on breast cancer research. However, enhancement and individualization of therapies are still limited due to a poor understanding of the biological mechanisms underlying tumor initiation and progression. In addition, heterogeneity of breast cancer on the clinical as well as on the molecular level complicates diagnostics and therapy of this disease. Among the different models that attempt to explain initiation and properties of mammary carcinomas, the cancer stem cell (CSC) theory represents a very attractive concept, proposing that adult stem and progenitor cells of normal tissues constitute the cells of origin of the tumors.

In the past years, the WAP-T mammary carcinoma mouse model has been shown to exhibit high similarities to the corresponding human tumors. Thus this model constitutes an appropriate tool to study early and late stages of breast cancer development. To investigate the mechanisms of cancer stem cell regulation, the present study focused on two main questions: (i) is the cancer stem cell theory an appropriate model to describe WAP-T mammary carcinomas and (ii) if yes, is there a possibility to influence the differentiation state of potential cancer stem cells. To take advantage of *in vitro* analyses, the G-2 cell line that has been established from a WAP-T tumor and bear high resemblance to primary tumors, has been analyzed in parallel with endogenous WAP-T tumors.

According to the classical CSC theory, tumors contain a small population of tumorigenic cancer stem cells, which is characterized by a combination of specific molecular and/or functional markers. These rare CSCs give rise to all other differentiated and non-tumorigenic cancer cells of a tumor. In this study endogenous WAP-T mammary carcinomas as well as G-2 cells displayed many CSC associated features, like tumor initiating properties or intrinsic heterogeneity regarding expression of differentiation markers. In an attempt to identify WAP-T cancer stem cell specific phenotypes, G-2 cells were analyzed using cell surface markers (CD24, CD29, CD49f, CD61 and Sca1) and a functional marker (Aldh-activity). Surprisingly, G-2 cells with CSC properties showed a metastable phenotype, which allowed them to adopt at least three different and interconvertible differentiation states. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal-epithelial transition (MET) were identified as mechanisms responsible for the interconversion of so-called “quasi-epithelial”, “intermediate” and “quasi-

mesenchymal” states. Hence, cancer stem cells in WAP-T tumors cannot be defined as an individual entity with a well defined phenotype, but rather as a homeostatic heterogeneous “cancer cell system”.

The presented concept of a cancer cell system has a high impact on the conception of potential CSC-targeting therapies. Influencing the metastability of a tumor cell system for example could strongly increase the efficiency of specific therapies.

The *carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) is expressed on differentiated epithelial cells and on endothelial cells of the normal mammary gland, and is downregulated during progression of many carcinomas. Therefore, CEACAM1 represents an interesting candidate to modulate the metastability of WAP-T cancer cells. In the present study, WAP-T mice with a *Ceacam1* knockout displayed a strongly increased metastasis rate compared to the *Ceacam1*^{wt} animals. Further analyses allowed the description of a dual role of CEACAM1 during tumor progression: (i) tumor cells lacking CEACAM1 showed an enhanced and more aggressive EMT-phenotype; (ii) the loss of CEACAM1 expression in the tumor microenvironment led to an increased permeability of the blood vessels, thus facilitating the dissemination of tumor cells. These results provide evidence that CEACAM1 is involved in the regulation of the WAP-T cancer cell metastability.

Taken together, the data of the present study emphasize the importance of a characterization of tumor cell systems and the regulatory processes therein in order to develop better cancer therapies. The WAP-T mouse model thereby provides an appropriate tool for a further analysis of cancer cell metastability and development of new therapeutic strategies.

I EINLEITUNG

I.1 Brustkrebs

Brustkrebs ist mit über 600.000 Neuerkrankungen im Jahr 2007 die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Frauen in den Vereinigten Staaten und Europa. Mit 15% aller Fälle ist Brustkrebs die zweithäufigste Todesursache durch Krebs (AmericanCancerSociety 2007; Ferlay, Autier et al. 2007; Vargo-Gogola and Rosen 2007). Der Begriff „Brustkrebs“ (lat. Mammakarzinom) fasst zahlreiche Erkrankungen der Brustdrüse zusammen, die sich in ihrer Histopathologie, Malignität und in ihren molekularen bzw. genetischen Ursachen unterscheiden. Wie andere Karzinome entstehen Mammakarzinome aus Epithelgewebe und werden je nach Ursprung in Plattenepithelkarzinome (aus Plattenepithelgewebe stammend) und Adenokarzinome (Ursprung im Drüsengewebe) unterteilt. Basierend auf der histologischen Klassifizierung werden Adenokarzinome in Untergruppen eingeteilt: invasive duktale Karzinome (IDC) entstehen in Zellen der Milchgänge, repräsentieren 70-80% der Adenokarzinome und sind somit die am häufigsten diagnostizierte Brustkrebsform; invasive lobuläre Karzinome (ILC) machen etwa 15% der Adenokarzinome aus und haben ihren Ursprung in den Zellen der Drüsenläppchen; des Weiteren gibt es auch invasive tubuläre, medulläre und papilläre Karzinome (je etwa 2%).

Eine der größten Herausforderung für ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden Tumorbiologie ist die Entwicklung und Charakterisierung von experimentellen Tiermodellen, welche die Vielfalt dieser Erkrankungen widerspiegeln können. Heutzutage steht eine Vielzahl von Mausmodellen für die Mammakarzinogenese zur Verfügung. Auf Grund der großen Ähnlichkeiten zwischen Nagetieren und Menschen bezüglich Anatomie und Entwicklung der Brustdrüse sowie des Genotyps eignen sich Mäuse besonders gut zur Modellierung des Brustkrebses (Medina 1996).

I.2 Die Brustdrüse der Maus

Die Brustdrüse stellt einen Appendix der Haut dar und ist mit den Hautdrüsen evolutionär eng verwandt. Je nach Säugetierklasse variiert die Anzahl und Lokalisierung der Brustdrüsen (Hennighausen and Robinson 2005). So haben Mäuse fünf Drüsenpaare, die sich zwischen Vorder- und Hinterläufen hintereinander verteilen (siehe Abbildung 1), während sich bei Menschen nur ein Drüsenpaar in der thorakalen Region befindet.

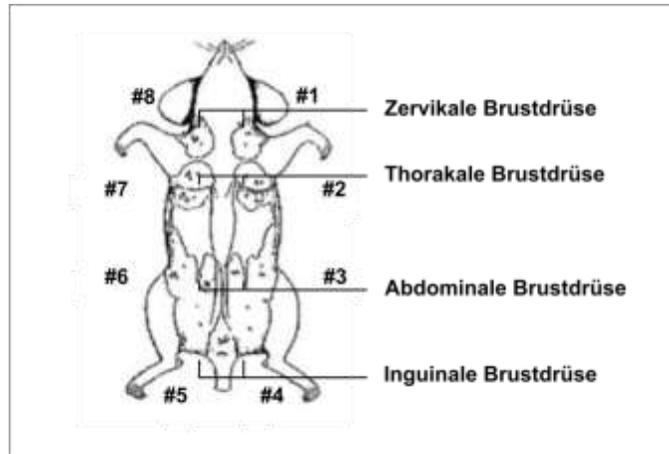


Abbildung 1: Lokalisierung der Brustdrüsen in der Maus

Hier wird die Nummerierung der Mausbrustdrüsen dargestellt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Hierbei bestehen die thorakalen Brustdrüsen #2 und #7 jeweils aus zwei zum Teil überlappenden Drüsen.

I.2.1 Pränatale Entwicklung

Die Entwicklung der embryonalen Brustdrüse ähnelt der Entwicklung anderer Hautanhangsgebilde, wie z.B. Haarhaut, Barthaut oder Zahnknospen. Insbesondere zelluläre Wechselwirkungen, die Sekretion lokaler Wachstumsfaktoren und die Interaktion zwischen epithelialen und mesenchymalen Kompartimenten regulieren die Brustdrüsenentwicklung (Veltmaat, Mailleux et al. 2003).

Die Entwicklung der Brustdrüse in der Maus beginnt am Tag 10-11 der embryonalen Entwicklung. Es treten die sogenannten Milchlinien als zwei Epithelverdickungen auf. Durch Teilung dieser Streifen entstehen fünf ektodermale Inselpaare, die sich im Lauf des nächsten embryonalen Tages zu epithelialen Knospen entwickeln. Entsprechend des Geschlechts entwickeln sich diese epithelialen Inseln bei Weibchen weiter oder bei den Männchen zurück. Bei der Geburt bestehen die Brustdrüsen eines Weibchens aus jeweils einem primären Duktus, der auf einer Seite mit der Brustwarze verbunden ist und sich auf der anderen Seite in 12 bis 15 sekundäre Äste verzweigt (Rosen 2004).

I.2.2 Postnatale Entwicklung

Im Gegensatz zu den meisten anderen Organen findet die Entwicklung der Brustdrüse zum größten Teil postnatal statt. Bis zur dritten Woche nach der Geburt wächst das Drüsengewebe langsam, bis das Epithelgewebe den ersten Lymphknoten in der inguinalen Brustdrüse erreicht (Abbildung 3). Während der Pubertät erhöht sich die Menge der von der Hypophyse und den Eierstöcken synthetisierten, zirkulierenden Hormone (u. a. Östrogen, Progesteron) und führt zur Induktion der weiteren Entwicklung des rudimentären duktales Epithels. Dabei findet die Proliferation hauptsächlich in Strukturen an den distalen Enden der Dukte statt, den sogenannten *terminal end buds* (TEBs). TEBs bestehen hauptsächlich

aus zwei epithelialen Zelltypen: den *cap cells*, welche die äußeren der distalen Zellschichten bilden und den *body cells*, welche die inneren Zellschichten bilden (Abbildung 2). Viele Hinweise deuten darauf hin, dass *cap cells* bipotente Progenitorzellen sind, die sowohl duktale als auch myoepitheliale Zellen generieren können. Die Morphologie des Duktus wird durch ein streng reguliertes Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose erzeugt. Allerdings finden apoptotische Vorgänge ausschließlich bei den *body cells* statt. Das Fettgewebe (engl. *fat pad*) ist 8-9 Wochen nach Geburt komplett von Duktus durchzogen und die Mehrheit der TEB-Strukturen wird abgebaut.

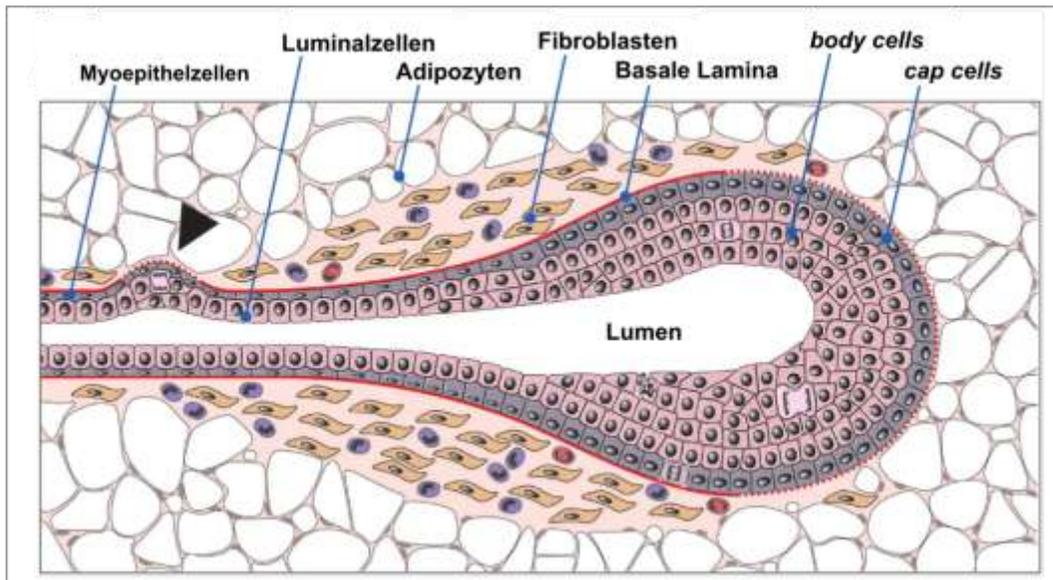


Abbildung 2: Morphologie von *terminal end buds* (TEB) und Duktus

Schematische Darstellung der Architektur eines TEBs mit Duktus. Die gestrichelt dargestellte Basallamina verdeutlicht deren Dickenabnahme in Folge eines partiellen enzymatischen Abbaus und einer unzureichenden *de novo* Synthese an der invasiven Front des TEBs bzw. einer neuen Duktusverzweigung. (Sternlicht 2006)

1.2.3 Die adulte Brustdrüse

Zwischen Pubertät und erster Schwangerschaft besteht das Brustepithel aus einem verzweigten Duktus-Netz mit wenigen *end buds* (Endknospen) und sehr wenigen Alveoli. Die Drüse der adulten, aber nicht tragenden Maus bleibt im Zustand relativer Quieszenz. Das Drüsengewebe wächst isometrisch zur Körpergröße. Während der lutealen Phase der Menstruation weist es einige Alveoli auf, die am Ende des Zyklus zurückgebildet werden (Sheffield 1988).

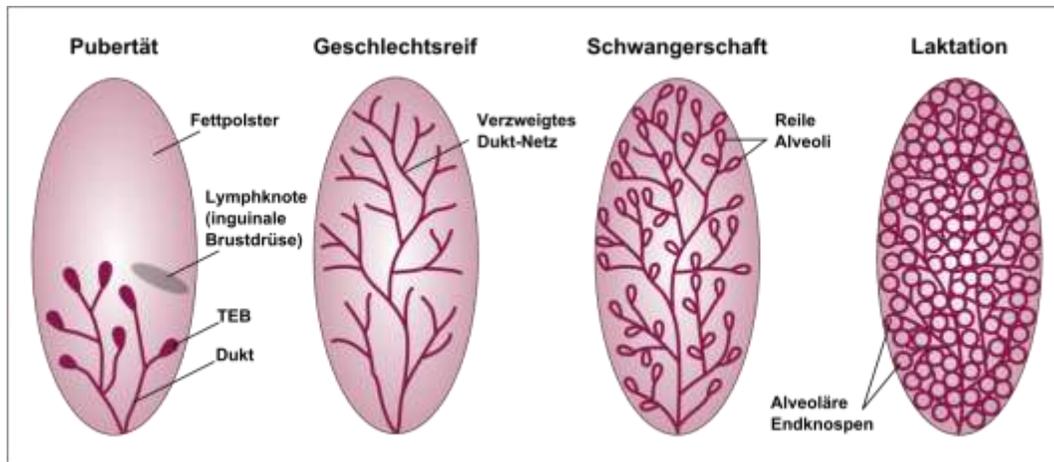


Abbildung 3: Entwicklung der Mausbrustdrüse während der Pubertät, Schwangerschaft und Laktation

In der pubertären und geschlechtsreifen murinen Brustdrüse besteht das Duktus-Netz aus primären und sekundären Verzweigungen und weist nur wenige Alveoli auf. Während der Schwangerschaft wird eine Vielzahl von Alveoli gebildet, die während der Schwangerschaft in Milch sezernierende Alveoli differenzieren. Während der Laktation besteht die Brustdrüse ausschließlich aus dicht gepackten Alveoli, die mit einem ebenfalls Milch sezernierenden Duktus-Netz verbunden sind. (Hennighausen and Robinson 2005)

Eine Schwangerschaft induziert eine erneute, über Prolaktin und Progesteron vermittelte Proliferation und führt das Drüsenepithel in seine zweite Entwicklungsphase. Durch verstärkte Proliferation der Epithelzellen der Brustdrüse (mammary epithelial cells, MECs) verzweigen sich die terminalen Duktus (Tage 6-10) und bilden an ihren Enden zahlreiche Alveoli, welche in zunehmendem Maße zu den Milch-sekretierenden Lobuli differenzieren (Abbildung 3). Ab Tag 18 der Schwangerschaft und während der Laktation besteht die Brustdrüse ausschließlich aus dicht gepackten Lobuli (90% der Zellen der Brustdrüse sind MECs).

Die Laktation, die dritte Phase der adulten Mammogenese ist geprägt von der Milchsekretion. Circa 21 Tage nach dem Absetzen des Nachwuchses geht die Milchdrüse in ihre vierte Entwicklungsphase über. Die Rückbildung (Involution) als letzte Phase der postnatalen Mammagenese geht mit grundlegenden morphologischen und physiologischen Veränderungen einher (Strange, Li et al. 1992). Nahezu das gesamte sekretorische Gewebe, wie Lobuli und kleinere Duktus, bilden sich zurück und werden mithilfe von Enzymen und Makrophagen abgebaut. Nach abgeschlossener Involution ähnelt das morphologische Erscheinungsbild der rückgebildeten Milchdrüse der einer jungfräulichen (nulliparen) Maus (Vonderhaar, Smith et al. 1978).

I.3 Stammzellen und Hierarchie in der Brustdrüse

Die Brustdrüse ist ein sehr dynamisches Organ, das, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, während eines Lebens zyklische morphologische Änderungen erfährt (Menstruation, Schwangerschaft, Laktation und Involution). Diese Zyklen aus Proliferation, Differenzierung und Apoptose können mehrmals im Leben auftreten und weisen stark darauf hin, dass Stammzellen eine zentrale Rolle in der Homöostase und Regeneration der Brustdrüse spielen (Visvader and Lindeman 2006).

I.3.1 Definition der Stammzelle

Stammzellen stellen undifferenzierte Zellen dar, die sich durch die drei folgenden Eigenschaften definieren (Dalerba, Cho et al. 2007):

- **Differenzierung:** die Fähigkeit, heterogene Zellen als Nachkommen zu haben, die sich wiederum stufenweise anhand eines hierarchischen Prozesses differenzieren, um das Gewebe mit reifen Zellen zu regenerieren.
- **Selbsterneuerung (*self-renewal*):** die Fähigkeit, neue Stammzellen mit identischem Proliferations-, Expansions- und Differenzierungspotential zu erzeugen, um auf diese Weise die regenerative Kapazität eines Kompartiments aufrecht zu erhalten.
- **Homöostatische Kontrolle:** die Fähigkeit, die Balance zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung zu modulieren, als Antwort auf Umgebungsstimuli oder zur Kompensation genetischer Einschränkungen.

Durch asymmetrische Teilung einer Stammzelle entstehen zwei Tochterzellen, wobei die eine identisch zur originalen Stammzelle ist und die andere eine so genannte Progenitorzelle ist, die für die gewebsspezifische Differenzierung bestimmt ist (Abbildung 4). Progenitorzellen können nur transient proliferieren, um schließlich ein Spektrum an enddifferenzierten Zellen zu generieren (Hwang-Verslues, Chang et al. 2008).

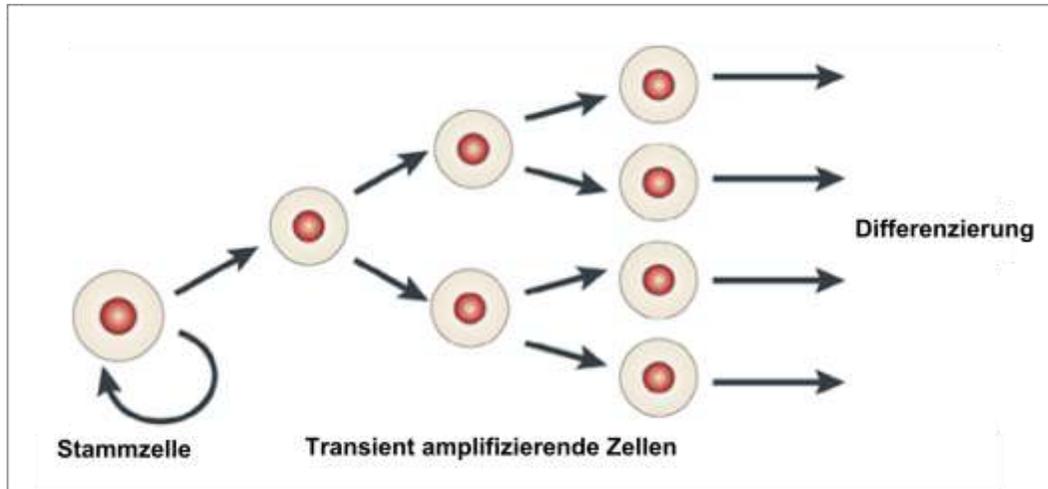


Abbildung 4: Schematische Darstellung von asymmetrischer Teilung und Differenzierung einer Stammzelle

Stammzellen bilden eine Zellpopulation, die sich über die gesamte Lebensspanne eines Organismus teilen kann und für die Produktion neuer Zellen bei der Geweberegeneration zuständig ist. Stammzellen haben die Fähigkeit durch Teilung neue Stammzellen mit gleichen Charakteristika zu produzieren (Selbsterneuerung) und sind pluripotent (Fähigkeit durch Differenzierung alle Zelltypen eines Organs zu generieren). Die meisten Stammzellen teilen sich langsam. Werden differenzierte Zellen gebraucht, so werden transient schnell replizierende Zellen durch asymmetrische Teilung einer Stammzelle produziert. Diese sogenannten Progenitorzellen sind einem „Differenzierungsschicksals“ unterworfen und können nur in bestimmte Zelltypen differenzieren. Der kreisförmige Pfeil stellt Selbsterneuerungseigenschaften dar (Knoblich 2001)

1.3.2 Die Brustdrüsen-Stammzelle

Die Brustdrüse unterscheidet sich von anderen Geweben durch ihr ausgeprägtes regeneratives Potential, welches die Neubildung der Drüsenstruktur nach Transplantationsexperimenten ermöglicht. Vor 50 Jahren entwickelten DeOme et al. die Technik der Transplantation von Gewebefragmenten in Brustfettpolster von Mäusen, deren endogenes Epithel zuvor entfernt wurde (*cleared mammary fat pads*) (Deome, Faulkin et al. 1959). Mit Hilfe dieses Modellsystem konnten Untersuchungen zur Existenz von Brustdrüsen-Stammzellen vorgenommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Bereiche der Brustdrüse in der Lage sind, ein komplettes Netz von Duktal wiederherzustellen. Etwa 30 Jahre später konnten Smith und Medina beweisen, dass die Epithelzellen der neubesiedelten *fat pads* während der gesamten Lebensspanne und unabhängig vom Hormonzustand der adulten Maus vorhanden sind (Smith and Medina 1988). Durch serielle Transplantationsexperimente wurde zudem bewiesen, dass diese Zellen eine begrenzte Lebensdauer bzw. ein begrenztes Teilungspotential haben, und dass sie ggf. nach mehreren konsekutiven Transplantationen seneszent werden können (Young, Medina et al. 1971; Smith, Strickland et al. 2002). In ergänzenden Experimenten konnten Tsai et al Hinweise auf einen klonalen Ursprung der Brustdrüse liefern. Es wurde durch Analysen des Methylierungsstatus von DNA-Polymorphismen gezeigt, dass ganze Drüsenstrukturen, unabhängig vom

Zelltyp, dasselbe X-Chromosom-Inaktivierungsmuster aufwiesen (Tsai, Lu et al. 1996). Kurze Zeit später, im Jahr 1998, wurde die Existenz klonaler Stamm- und Progenitorzellpopulationen in der murinen Brustdrüse von Kordon und Smith eindeutig nachgewiesen. Durch Transplantation von *mouse mammary tumor virus* (MMTV) infizierten Epithelzellen in virusfreie Empfängertiere und anschließender Detektion der einzigen Virusgenom-Integrationsstelle mithilfe von Southernblots konnten die Autoren zeigen, dass die komplett regenerierte Brustdrüse aus einer einzigen Zelle mit multipotentem und regenerativem Potential stammten (Kordon and Smith 1998). Die Häufigkeit dieser Stammzellen wurde auf 1:2.000 bis 1:2.500 aller Brustepithelzellen geschätzt. Außerdem wies diese Studie darauf hin, dass zwei zusätzliche Zellpopulationen mit limitiertem Proliferationspotential im Brustepithelium vorhanden sind und entweder sezernierende Lobuli (*secretory lobule*) oder Duktus-Verzweigungen (*branching ducts*) produzieren können. Diese sogenannten *lineage committed progenitor cells* wurden als direkte Nachkommen der multipotenten Stammzelle identifiziert. Durch Teilung dieser transient amplifizierenden Vorläuferzellen entstehen die enddifferenzierten und voll funktionellen Epithelzellen der Drüse.

In den letzten Jahren konzentrierten sich verschiedene Gruppen auf die Identifizierung und die Charakterisierung der Brustdrüsen-Stammzelle. Im Jahr 2006 berichteten zwei Publikationen über die prospektive Isolierung von Stammzellen aus Mausbrustdrüsen mit Multipotenz- und Selbsterneuerungseigenschaften (Shackleton, Vaillant et al. 2006; Stingl, Eirew et al. 2006) Durch Immunmarkierung spezifischer Oberflächenproteine konnten die Autoren frisch vereinzelte Mamma-Epithelzellen fraktionieren und das regenerative Potential der so entstandenen Subpopulationen durch Transplantation von limitierten Zellzahlen in *cleared mammary fat pads* von Empfängertieren untersuchen. Basierend auf der gleichzeitigen moderaten Expression von *heat stable antigen* (CD24) und der hohen Expression von Integrin $\beta 1$ (CD29) und Integrin $\alpha 6$ (CD49f) wurde dabei eine Zellpopulation in der Mausbrustdrüse identifiziert, in der Stammzellen angereicht sind (siehe auch Tabelle 1). Weitere Transplantationen von $CD24^+/CD29^{high}/CD49f^{high}$ -Einzelzellen in *cleared mammary fat pads* führten in sechs von hundertzwei Experimenten zur vollständigen Regeneration einer funktionstüchtigen, mit eigenen Stammzellen versehenen Brustdrüse. Murine Mamma-Stammzellen des $CD24^+/CD29^{high}/CD49f^{high}$ -Phänotyps zeigten zudem keine Expression des *stem cell antigen 1* Oberflächenproteins (Sca1) und keine Überlappung mit der durch Hoechst 33342-Efflux definierten *side population* (SP), zwei Charakteristika, die zuvor mit Vorläufereigenschaften assoziiert wurden (Welm, Tepera et al. 2002; Welm, Behbod et al. 2003).

Weitere Arbeiten führten zum besseren Verständnis der Epithelzellhierarchie in der Mausbrustdrüse. Zwei Publikationen, erschienen im Jahr 2007, berichten, dass Progenitorzellen, die zur luminalen Differenzierung bestimmt sind, sich durch die hohe Expression von Integrin $\beta 3$ (CD61) und eine geringe bis vernachlässigbare Expression von sowohl Prominin-1 (CD133) als auch Sca1 auszeichnen (Thiery and Sleeman 2006; Asselin-Labat, Sutherland et al. 2007). Dieselben Autoren definierten hierbei reife differenzierte luminalen Zellen als $CD61^{-}/CD133^{+}/Sca1^{+}$. In einem ausführlichen Review fasste Jane E. Visvader diese Daten zusammen und schlug ein Hierarchie-Modell der murinen bzw. der humanen Brustdrüsenepithelzellen vor (Visvader 2009). Dieses Modell wird in Abbildung 5 dargestellt.

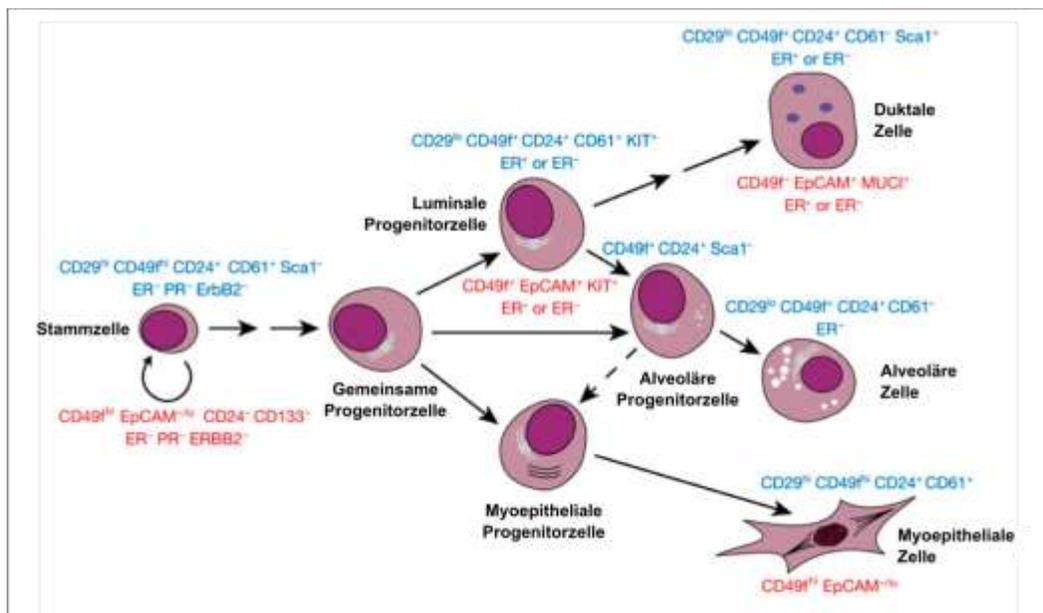


Abbildung 5: Modell der Differenzierungshierarchie innerhalb des Brustdrüsenepithels.

Dargestellt ist die potentielle Zellhierarchie in der Brustdrüse anhand von Zelloberflächenmarkern, die für die Isolierung von murinen (blau) und humanen (rot) epithelialen Fraktionen verwendet wurden. Der kreisförmige Pfeil stellt Selbsterneuerungseigenschaften dar (Visvader 2009)

I.4 Mechanismen der Entstehung und der Progression von Krebs

Die frühe Detektion und die Verbesserungen der Behandlungsmethoden von Brustkrebs in der letzten Dekade ermöglichte zwar eine Senkung der Mortalitätsrate, aber Inzidenz und Frequenz der Rezidive bleiben bei dieser Krankheit nichtsdestotrotz sehr hoch (Ferlay, Autier et al. 2007). Das Haupthindernis für bessere und individuellere Therapien liegt darin, dass die biologischen Mechanismen der Tumorentstehung und -progression bis heute nur schlecht verstanden werden. Allgemein wird die Entstehung von Brustkrebs dadurch erklärt, dass einzelne Zellen verschiedene Mutationen akkumulieren, die ein unkontrolliertes und unbegrenztes Wachstum ermöglichen, (Hanahan and Weinberg 2000; Chen,

Possemato et al. 2004). Ein besonderes Charakteristikum, das alle Tumore gemeinsam aufweisen, ist eine auffallende Heterogenität der Tumorzellen einer einzelnen Läsion (Heppner 1984). Dabei unterscheiden sich diese Zellen bezüglich phänotypischer Merkmale (z.B. Größe, Morphologie, Antigenexpression und Komposition der Membran) und ihrem Verhalten *in vivo* (z.B. Proliferationsrate, Zell-Zell-Wechselwirkungen, metastatische Eigenschaften und Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie). Diese Tumorerheterogenität macht eine Untersuchung und Behandlung von Krebs relativ kompliziert, da eine Tumorprobe nicht unbedingt repräsentativ für die gesamte Tumormasse ist. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die für die Heterogenität der Tumorzellen verantwortlich sind, wird erheblich dazu beitragen, die Krebsbiologie besser zu verstehen und die Effizienz von Therapien zu verbessern. Zur Zeit gibt es zwei sich zum Teil ergänzenden Theorien zur Erklärung der Heterogenität von Krebs: (i) das Modell der klonalen Evolution und (ii) die Theorie der Tumorstammzellen (Polyak 2007).

I.4.1 Das Modell der klonalen Evolution

Das Konzept einer klonalen Evolution während der Karzinogenese wurde 1976 von Nowell entworfen und besagt, dass Tumorzellen im Laufe der Zeit verschiedene Kombinationen von Mutationen erwerben und dass die Tumorprogression stufenweise durch natürliche Selektion der aggressivsten Zellen getrieben wird (Nowell 1976). In dieser Theorie wird angenommen, dass die Tumorentstehung erst nach multiplen Mutationen, die einen Wachstumsvorteil gegenüber der normalen Umgebung bieten, in beliebigen Zellen stattfinden kann. Die so erworbene unkontrollierte Proliferation zusammen mit genetischer Instabilität führen zur Produktion von Tumorzellen mit zusätzlichen Mutationen und somit neuen Eigenschaften. Als Konsequenz entsteht eine Mischung aus Tumorzellen mit diversen Mutationen, die durch Zufall Wachstumsvorteile und/oder Resistenzen gegen Therapien vermitteln können und die zu einem heterogenen Tumorphänotyp führen (Abbildung 6B). Mit diesem Prozess der Akkumulation und Selektion von Mutationen während der gesamten Lebensspanne eines Tumors begründet die Theorie der klonalen Evolution, wie Tumorzellen Invasivität, metastatisches Verhalten, Therapieresistenzen und Rezidivpotential erwerben (Nowell 1976; Nicolson and Rosenberg 1987; Crespi and Summers 2005; Merlo, Pepper et al. 2006).

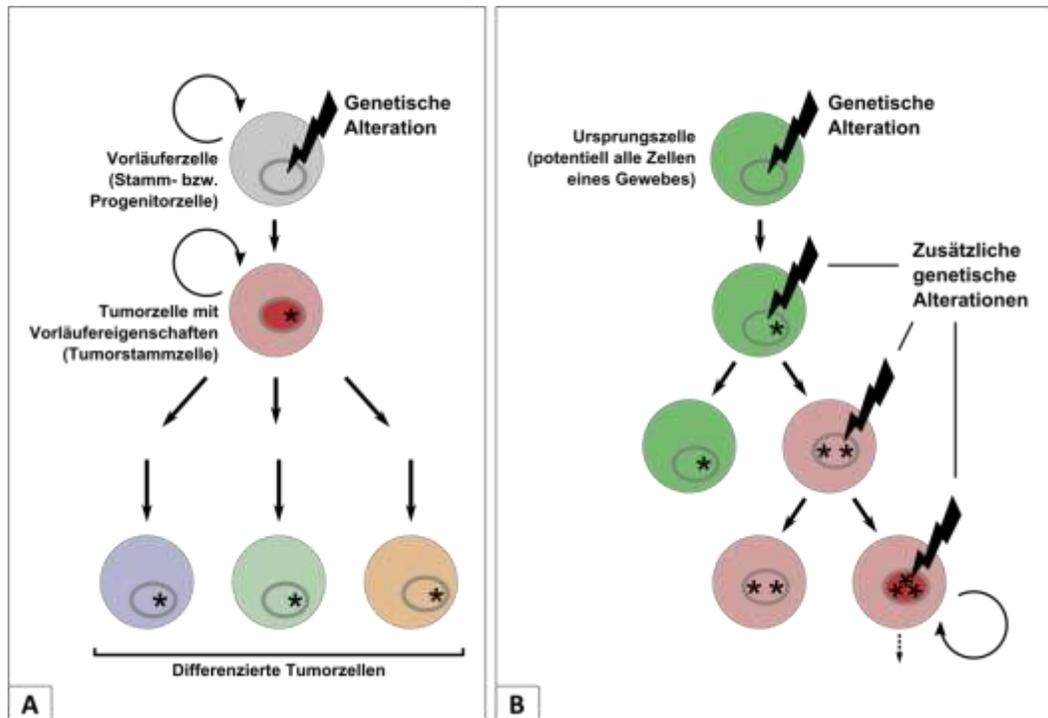


Abbildung 6: Darstellung der zwei Modelle zur Erklärung der Krebsinitiierung und -progression

A: Die Tumorstammzelltheorie: in diesem Modell erfolgt die Akkumulation von Krebs verursachenden Mutationen in Zellen mit Selbsterneuerungseigenschaften (adulten Stamm- bzw. Progenitorzellen). Dadurch werden sogenannte Tumorstammzellen generiert, die einerseits sich selbst erneuern und andererseits differenzieren können. Beim letzten Vorgang werden genetisch identische differenzierte Tumorzellen produziert, die keine Selbsterneuerungseigenschaften mehr aufweisen. Tumorstammzellen können zusätzliche Mutationen im Lauf der Tumorprogression erwerben. **B:** Das Modell der klonalen Evolution: in diesem Modell stellen alle Zellen eines Gewebes, ob differenziert oder nicht, potentielle Ursprünge für die Initiierung von Tumoren dar. Dabei führt die sequentielle Akkumulation von Mutationen zum Erwerb von onkogenen Eigenschaften, die zuerst der Generation von Tumorzellen dient und anschließend eine Verstärkung deren Aggressivität durch neue Eigenschaften wie Dedifferenzierung und Selbsterneuerung ermöglicht. In beide schematische Darstellungen stehen die Blitze für das Erwerben von Mutationen, die Sterne für die Mutationen selbst und die kreisförmige Pfeile für Selbsterneuerungseigenschaften (Campbell and Polyak 2007; Polyak 2007).

Einige Beobachtungen in verschiedenen Krebsarten unterstützen das Modell der klonalen Evolution. So wurde die genetische Instabilität als generelles Phänomen bei Krebserkrankungen beobachtet (Hanahan and Weinberg 2000). Ergänzende Studien zeigen u.a. in Brustkrebs, dass Primärtumor, Metastase und Rezidiv dieselben Muster von genetischen Defekten aufweisen, aber dass einzelne zusätzliche chromosomale Aberrationen spezifisch für die Malignitätserhöhung der letzteren sind (Wolman 1986; Kuukasjarvi, Karhu et al. 1997; Tanaka, Hinoda et al. 1997; Wang, Voiculescu et al. 2006). Andere Gruppen berichteten hingegen, dass Mammakarzinome signifikante Mutationsheterogenität innerhalb einzelner Läsionen haben (Aubele, Mattis et al. 1999; Torres, Ribeiro et al. 2007).

I.4.2 Die Tumorstammzelltheorie

Jedes Gewebe im Körper besitzt eigene Stammzellen, die die Homöostase der individuellen Gewebe ermöglichen und die ggf. die durch gewebespezifische Differenzierungsvorgänge benötigten differenzierten Zelltypen regenerieren können. Die Theorie der Tumorstammzelle (engl. *cancer stem cell*, CSC) wurde bereits vor 150 Jahren entworfen. Das Grundkonzept der Tumorstammzellentheorie ist, dass diese seltene Stamm- bzw. Vorläuferzellen den Ursprung maligner Veränderungen darstellen (Cohnheim 1867; Durante 1874; Cohnheim 1875). Auf Grund ihrer langen Lebensspanne und erhöhten proliferativen Kapazität können Stamm- bzw. Vorläuferzellen onkogene Mutationen akkumulieren und an eine Vielzahl von Tochterzellen weitergeben. Mutierte Stamm- bzw. Vorläuferzellen sind dann in der Lage, sich zu tumorinitiierenden Zellen, den Tumorstammzellen zu entwickeln, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation aufweisen.

So entstehen die zwei folgenden Hauptkonzepte der Tumorstammzelltheorie:

- Tumore entstehen aus Stammzellen oder aus deren direkten Nachkommen, den Progenitorzellen, durch Deregulation der empfindlichen Selbsterneuerungs- und Proliferationsprozesse (*self-renewal*).
- Tumore besitzen ein zelluläres Subkompartiment, das Eigenschaften von Stammzellen aufweist und die Tumorgenese vorantreibt (Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential) und zur zellulären Heterogenität des Tumors führt (Differenzierungspotential) (Wicha, Liu et al. 2006).

Till und McCulloch postulierten 1961, dass gewebespezifische Stammzellen die Ursprungszellen von Krebserkrankungen darstellen (Till and McCulloch 1961). Basierend auf Erkenntnissen aus Teratokarzinommodellen entwickelte Pierce die Theorie, dass Krebs durch die anormale Unterbrechung des Reifungsprozess einer Stammzelle entstehen kann (Pierce 1967). *In vitro* Experimente, in denen die Fähigkeit zur Koloniebildung einzelner Zellen untersucht wurde, brachten Indizien für die Annahme, dass Tumore eigene Zellpopulationen mit Stammzeleigenschaften besitzen müssen (Bruce and Van Der Gaag 1963; Park, Bergsagel et al. 1971; Reya, Morrison et al. 2001). Diese Annahme wurde durch Transplantationsexperimente bestärkt, in denen beobachtet wurde, dass eine erfolgreiche Tumorbildung nur stattfand, wenn hohe Zellzahlen von humanen Tumorzellen in Maus-Xenograftmodelle transplantiert wurden (Singh, Hawkins et al. 2004)).

Entsprechend der Tumorstammzelltheorie sollte nur eine spezifische Tumorzellpopulation (die langlebigen *cancer stem cells*, CSC) in der Lage sein, das Tumorwachstum aufrecht zu halten. Diese

Hypothese wurde mehrmals in unterschiedlichen Tumorsystemen bestätigt (Dalerba, Cho et al. 2007). Dabei definieren drei Schlüsselbeobachtungen die Existenz von Tumorstammzellen:

- Nur eine Minderheit der Zellen eines Tumors besitzt tumorigenes Potential, wenn sie in immundefiziente bzw. syngene Mäuse transplantiert wird.
- Tumorigene Krebszellen sind durch ein spezifisches (eindeutiges) Markerprofil (z.B. Oberflächenmarkern) charakterisiert, das mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) oder anderen Immunselektionsmethoden deren Isolierung/Trennung von den nicht tumorigenen Zellen ermöglicht.
- Die aus tumorigenen Zellen entstehenden Tumore enthalten eine gemischte Population aus tumorigenen und nicht tumorigenen Krebszellen. Sie rekapitulieren dadurch den heterogenen Phänotyp des primären Tumors.

Die Identifizierung von CSCs ermöglichte die Etablierung von Hierarchie-Modellen für unterschiedliche Zellpopulationen eines Tumors. Zunächst in humanen myeloiden Leukämien entwickelt, werden diese Modelle zunehmend auf solide Tumore übertragen.

1.4.2.1 Therapeutische Implikationen der Tumorstammzelltheorie

Die Beobachtung, dass Krebs durch eine kleine Subpopulation von Tumorzellen (z.B. CSCs) aufrechterhalten wird, ist von großer Bedeutung für die Entwicklung von neuen und effektiveren Antitumorthérapien (Dalerba, Cho et al. 2007). Traditionelle Therapieansätze und Wirkstoffe basieren oftmals auf der Eliminierung sich schnell teilender Zellen. Diesem Ansatz zuwider läuft die Beobachtung, dass sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch Leukämie-Stammzellen sich in einem ruhenden, nicht proliferierenden Status befinden. Angesicht dieser Fakten liegt die Annahme nah, dass traditionelle Krebstherapeutika zwar den größten Teil der Tumormasse zerstören und so eine temporäre Regression der Läsion induzieren können, dass aber das CSC-Kompartiment durch solche Behandlungen nicht effektiv eliminiert werden kann. Dies könnte eine Erklärung sein, warum Rezidive und Metastasierung in vielen Fällen nicht verhindert werden können. (Guzman, Swiderski et al. 2002; Guan, Gerhard et al. 2003). Als Unterstützung dieser Annahme wurde in eine sehr aktuelle Veröffentlichung gezeigt, dass Brustkrebszellen mit Vorläufereigenschaften eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapien aufweisen (Phillips, McBride et al. 2006; Li, Lewis et al. 2008).

Um ausgehend von diesem Konzept traditionelle Behandlungen zu modifizieren und eine gezielte Eliminierung der CSC-Subpopulation zu ermöglichen, müssen die grundlegenden, biochemischen und molekularbiologischen Prozesse, die der Erhaltung des CSC-Kompartiments dienen, analysiert werden (Guzman, Swiderski et al. 2002; Al-Hajj, Becker et al. 2004).

1.4.2.2 Implikation des Tumorstammzellmodells für die Biologie des Tumors

Eine der Hauptkonsequenzen der CSC-Theorie für den Tumorphänotyp ist die zelluläre Heterogenität von Tumorzellen innerhalb einer Läsion. Intratumorale Heterogenität ist eine rekurrende Beobachtung, sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen. Üblicherweise wird dieses Phänomen durch Variationen der Mikroumgebung und die Koexistenz von mehreren unabhängigen Subklonen, die sich auf Grund verschiedener Mutationen genetisch unterscheiden, innerhalb eines Tumors erklärt (Brabletz, Jung et al. 2001; Losi, Baisse et al. 2005). Hingegen führt die CSC-Theorie diese intratumorale Heterogenität auf einen unterschiedlichen Differenzierungsstatus einzelner Tumorzellen zurück. Hierbei zeichnen sich Tumorzellen verschiedener Phänotypen durch eigene Genexpressionsprofile aus, besitzen aber alle die gleichen genetischen Aberrationen.

Gemäß diesem Ansatz müssen Erkenntnisse zur Tumorigenese entsprechend des zellulären Kontexts interpretiert werden, in dem sie erhoben wurden. Beispielsweise könnten die im Tumor aktivsten Stoffwechselwege von geringer Relevanz für die Biologie der CSCs sein, während essentielle, für den Stammzellcharakter entscheidende, biochemischen Signalwege nur in der kleinen Minderheit der Tumorstammzellen aktiv sein könnten.

1.4.2.3 Entwicklung des Tumorstammzellmodells in humanen myeloischen Leukämien

Das hämatopoetische System ist das erste und bestcharakterisierte Organ in Säugetieren hinsichtlich hierarchischer Organisation und sequentieller Differenzierung (Dalerba, Cho et al. 2007). Anhand von Transplantationsexperimenten konnten Till und McCulloch die Existenz von Vorläuferzellen zeigen, welche die Eigenschaft besitzen, das Knochenmark neu zu besiedeln, langfristig zu expandieren und multipotent zu differenzieren (Till and McCulloch 1961). Weitere Untersuchungen ermöglichten es, eine progressive funktionelle und phänotypische Charakterisierung der unterschiedlichen zellulären Abstammungslinien (*lineages*) des Blutsystems zu etablieren (Kondo, Wagers et al. 2003).

Ende der 70er Jahre wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und humaner Leukämie dargestellt (Adamson, Fialkow et al. 1976; Fialkow, Jacobson et al. 1977; Fialkow, Faguet et al. 1981; Fialkow, Singer et al. 1981). Dabei zeigten die Autoren, dass sich

sowohl die chronische myeloische Leukämie (CML) als auch die akute myeloische Leukämie (AML), die essentielle Thrombozythämie und die Polycythemia vera durch Expansion einer monoklonalen Zellpopulation mit der Fähigkeit zur Differenzierung in multiple Linien auszeichnen. Diese Beobachtungen wurden als Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen verwendet, die zur Entdeckung der ersten Tumorstammzellpopulation in verschiedenen humanen AMLs führten (Lapidot, Sirard et al. 1994; Bonnet and Dick 1997). Anhand von Transplantationsexperimenten und unter Anwendung der Marker CD34 (*hematopoietic progenitor cell antigen CD34*) und CD38 (*cyclic ADP ribose hydrolase*), zeigten die Autoren in immundefizienten Mäusen, dass nur die seltenen CD34⁺/CD38⁻-Zellen (0,01% aller Leukämiezellen) in der Lage sind, die Krankheit auszulösen. Die induzierten Tumore rekapitulierten interessanterweise den heterogenen Phänotyp der primären Tumore. Die CD34⁺/CD38⁻-AML-Zellen (sog. *leukemic stem cells, LSCs*) sind also Tumor-initiiierende Zellen, die ein Differenzierungspotential erhalten haben und nicht tumorigene CD38⁺ Zellen als Nachkommen haben. Zusammengefasst lieferten diese Beobachtungen den ersten experimentellen Beweis dafür, dass sich Tumorzellpopulationen in Anlehnung an normale Stammzellsysteme funktional und hierarchisch organisieren.

1.4.2.4 Tumorstammzellen in soliden Tumoren

Solide Tumore stellen ungefähr 80% aller Krebserkrankungen dar (Vaillant, Asselin-Labat et al. 2008). In der Regel werden diese Tumore anhand ihrer histologischen Eigenschaften, Expression von spezifischen Markern, sowie ihren gesamten Expressionsprofilen, verschiedenen Tumorsubtypen zugeordnet. Trotz guter Klassifizierung bleiben die zellulären Ursprünge von soliden Tumoren weitgehend unbekannt. Des Öfteren wird spekuliert, dass die verschiedenen Tumorsubtypen ihren Ursprung jeweils spezifisch in einen Zelltyp finden. Viele Gewebe teilen mit dem hämatopoetischen System die Eigenschaft, sich konstant und zyklisch zu erneuern. Dazu gehören sowohl die Haut als auch die gastrointestinalen Epithelien (z.B. im Mund, Ösophagus, Magen, Darm), die Epithelien der Atemwege (Larynx, Trachea, Bronchien, Lunge) und die der urogenitalen Organen (Brust, Eierstöcke, Vagina, Uterus, Blase und Prostata). Ausgehend von spezifischen adulten Stammzellen folgt diese Regeneration einem hierarchischen System der Differenzierung (Dalerba, Cho et al. 2007). Auch Gewebe mit geringer regenerativer und proliferativer Kapazität (z.B. Gehirn oder Muskeln) besitzen spezifische Stammzellen, die in bestimmten Situationen aktiviert werden können (Collins, Olsen et al. 2005; Ming and Song 2005). Basierend auf diesen Beobachtungen konnten zahlreiche Arbeitsgruppen mit Erfolg das bisher auf Leukämie eingeschränkte Tumorstammzellkonzept auf unterschiedliche solide Tumore erweitern. Die überzeugendste Darstellung von Tumorstammzellen in soliden Tumoren kommt aus Experimenten, in denen Tumorzellpopulationen orthotopisch in Tiermodellen seriell transplantiert werden (Visvader and

Lindeman 2008). Dabei zeigen CSC-beinhaltende Zellpopulationen tumorinitiierende Eigenschaften und induzieren das Wachstum von Tumoren mit gleicher phänotypischer Heterogenität und Selbsterneuerungseigenschaften wie der Primärtumor. So konnte in humanen Gehirntumoren (Glioblastoma multiforme und Medulloblastoma) eine tumorogene Zellpopulation, die den von 5-30% aller Tumorzellen exprimierten Oberflächenmarker CD133 (Prominin-1) aufweist, als Tumorstammzellfraktion identifiziert werden (Singh, Clarke et al. 2003; Galli, Binda et al. 2004; Singh, Hawkins et al. 2004). Diese Erkenntnis liefert die Grundlage für die Isolation von Stammzellen aus Gehirntumoren über sogenannte „*cancer neurospheres*“, Zellpopulationen angereicht mit tumorinitiierenden multipotenten Zellen (Chaichana, Zamora-Berridi et al. 2006). Darüber hinaus konnte CD133 ebenso erfolgreich als CSC-Marker bei Darm-, Pankreas-, Prostata- und Lungenkarzinomen etabliert werden (Collins, Berry et al. 2005; Krepulat, Lohler et al. 2005; Patrawala, Calhoun et al. 2006; O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007; Eramo, Lotti et al. 2008). Weitere Marker wurden mittlerweile erfolgreich für die Isolierung von CSC angewendet. In Darm-, Prostata- und Kopf-Hals-Karzinomen zeigte sich CD44, ein Rezeptor für Hyaluronsäure, als relevanter Marker für die Anreicherung von Tumorzellen mit Vorläufereigenschaften. (Collins, Berry et al. 2005; Patrawala, Calhoun et al. 2006; Dalerba, Cho et al. 2007; Prince, Sivanandan et al. 2007). CSC von hepatozellulären Karzinomen exprimieren CD90 (*thymocyte differentiation antigen 1*, Thy1) in Kombination mit CD44 (Crawford, Alsarraj et al. 2008).

I.4.2.5 Brustkrebs und Stammzellen

Erste Hinweise auf einer Implikation von Stammzellen in der Brustkrebsbiologie brachten Studien zur Brustkrebsentwicklung bei Überlebenden der Atombombenangriffe von Hiroshima und Nagasaki. Dabei berichteten die Autoren, dass die Exposition mit ionisierender Strahlung im Jugendalter die Anfälligkeit für Brustkrebs erhöht, obwohl die Krankheit erst mehrere Jahre nach dem Ereignis auftritt (Land and McGregor 1979). Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass beinahe 40% aller Brustkrebs-Fälle ca. 10 Jahre nach Diagnose und Therapie wiederkehren, weisen darauf hin, dass es eine Zellpopulation mit sehr langer Lebensspanne geben muss, die in der Entstehung und Rezidivität des Krebses involviert ist (Rosen, Groshen et al. 1989; Rosen 2004). Eine weitere Unterstützung des CSC-Konzepts liefert die Beobachtung, dass humaner Brustkrebs heterogene pathologische und molekulare Profile aufweist. Die Läsionen werden in 18 histopathologische Subgruppen klassifiziert. Trotz einer unbestreitbaren prognostischen Relevanz dieser Klassifizierung reagieren die Tumore einer Gruppe heterogen auf Therapieansätze (Brenton, Carey et al. 2005). Die große Anzahl an histopathologischen Faktoren erschwert die Klassifikation humaner Brustkrebssubtypen und führt dazu, dass 60–70% aller Tumore schlussendlich als

invasive duktale „Mammakarzinome von keinem speziellen Typ“ (*breast carcinoma of no special type, NST*) bezeichnet werden (Stingl and Caldas 2007). Hingegen ermöglicht es die Analyse von Genexpressionsprofilen, humane Brustkrebsarten in 5 Subtypen (luminal A, luminal B, ERBB2, basal und normal-like) einzuordnen (Perou, Sorlie et al. 2000; Sorlie, Perou et al. 2001; Sorlie, Tibshirani et al. 2003; Sotiriou, Wirapati et al. 2006). Aber weder die alte, noch die neue Klassifikation ermöglicht es, die Entstehung der Krankheit zu verstehen. Im Gegensatz zum hämatopoetischen System ist die Hierarchie der epithelialen Zellen in der Brustdrüse nur partiell beschrieben (siehe Abbildung 7). So konnten noch keine klaren Verbindungen zwischen Krebsstypen und entsprechenden Stamm- bzw. Vorläuferzelle hergestellt werden, die für die Entstehung der Krankheit verantwortlich sind. Beispielsweise ist bislang unklar, ob in der Brustdrüse ein normales zelluläres Äquivalent zu den Karzinomtypen Her2⁺⁺⁺ oder Luminal B besteht (Abbildung 7).

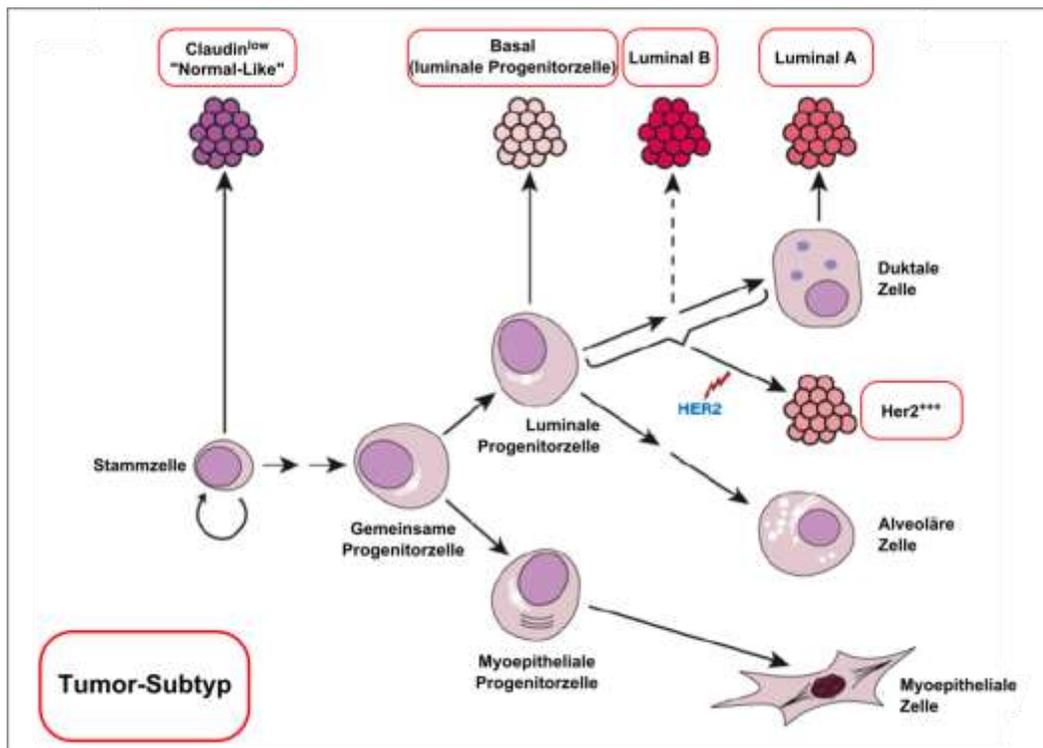


Abbildung 7: Stammzellhierarchie im humanen Brustepithel mit vorgeschlagenen Ausgangszelltypen für verschiedenen Brustkrebs-Subtypen

Darstellung der Sechs verschiedenen Brustkrebs-Subtypen (rot umkreist) mit deren am nächsten verwandten normalen epithelialen Zelltyp-Pendants. Der kreisförmige Pfeil stellt Selbsterneuerungseigenschaften dar (Visvader 2009).

Um das CSC-Konzept im Rahmen humaner Mammakarzinome zu etablieren, untersuchte die Arbeitsgruppe von Clarke die Tumorigenität unterschiedlicher Brustkrebs-Tumorzellpopulationen in immundefizienten Mäusen anhand der Expression von EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule, CD326*),

CD44 und CD24 (*heat stable protein*, HSA). Dabei konnte die Autoren zeigen, dass die kleine EpCAM⁺/CD44⁺/CD24^{-/low} Subpopulation (11 % bis 35 % der Tumormasse) Eigenschaften von CSCs aufweist. Beim Vergleich der Primärtumore mit den im Xenograftmodell initiierten Tumoren zeigte sich eine identische phänotypische Heterogenität der Tumormorphologie. (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Diese Studie konnte zum ersten Mal ein funktionales hierarchisches Tumorstammzellsystem in einem soliden epithelialen Tumor nachweisen. Darauf folgenden Studien zeigten, dass weitere Marker wie CD133, PROCR (*endothelial protein C receptor*, CD201), CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor 4*, CD184) oder die ALDH1-Aktivität in einige Krebstypen durchaus relevante Marker für humane Brustkrebs-CSC sind und in Kombination mit dem EpCAM⁺/CD44⁺/CD24^{-/low} Phänotyp öfter zu einer verstärkten Anreicherung von Tumorstammzellen führen (Ginestier, Hur et al. 2007; Shipitsin, Campbell et al. 2007; Hwang-Verslues, Chang et al. 2008)

Tabelle 1: Liste von Oberflächenmarkern, die in der Literatur für die Fraktionierung von Brustdrüsenepithel- und Mammakarzinomzellen angewendet wurden (Visvader 2009).

Marker	Andere Name	Spezie	Eigenschaften
CD24	<i>Heat shock antigen, HSA</i>	Human Maus	Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankertes Glycoprotein. Bis heute der einzig bekannte Ligand für P-selectin.
CD29	<i>Integrin $\beta 1$, Itgb1</i>	Maus	Integrin: sehr wichtiger Rezeptor für extrazelluläre Komponenten. Wird in Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert. Übt seine Funktion als Heterodimer, bestehend aus jeweils einer Untereinheit α und β , aus.
CD44	<i>PGP-1</i>	Human	Rezeptor für Hyaluronsäure. Wird in Verbindung gebracht mit Prozessen der Zellmigration, Zelladhäsion und T-Lymphozyten Zielsuche. Wird auf Epithelzellen, Leukozyten und Erythrozyten exprimiert.
CD49f	<i>Integrin $\alpha 6$, itga6</i>	Human Maus	Rezeptor für Laminin. Wird auf T-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert.
CD61	<i>Integrin $\beta 3$, Itgb3</i>	Maus	Rezeptor u. A. für Fibronektin, Vitronektin, Laminin und Willebrand Faktor. Bildet Heterodimere mit Integrin αV . Wird auf Blutgefäßen exprimiert.
CD90	<i>thymocyte differentiation antigen 1, Thy1</i>	Human Maus	Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankertes Glykoprotein. Wird u.a. auf hämatopoetischen Stammzellen, Thymozyten und Neuronen exprimiert. Involviert in der Regulation von Adhäsion und Signaltransduktion in T-Zellen
CD133	<i>Prominin 1</i>	Human	Glykoprotein mit fünf Transmembrandomänen
CD326	<i>Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM, ESA</i>	Human	Kalzium abhängiges Adhäsionsmolekül, involviert in homophile Bindungen und exprimiert auf der Basalmembran der meisten Epithele.
Sca1	<i>Stem cell antigen 1, Ly6A/E</i>	Maus	Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankertes Glykoprotein. Mitglied der Ly-6 Familie. Wird auf bestimmten Subpopulationen von Knochenmarkzellen, auf T- und B-Lymphozyten, auf unreifen Thymozyten und auf verschiedenen andere nicht hämatopoetischen Zellen exprimiert

I.4.3 Tumorstammzellen in Mammakarzinom-Mausmodellen

Heutzutage sind zahlreiche und vielfältige Mausmodelle für die Untersuchung der Brustkrebsbiologie vorhanden. Verschiedene Promotoren (z.B. MMTV-LTR-, WAP-, C3-, B-LG- oder MT-Promotor) wurden für die zeit- und gewebespezifische Expression unterschiedlicher Onkogene verwendet (Fantozzi and Christofori 2006). Für die Initiierung der Läsionen sind außerdem verschiedenste Transgene, wie z.B. die viralen Onkoproteine der frühen Genregion von SV40, das Polyomavirus T-Antigen, sowie zelluläre

Onkogene wie z. B. c-Myc, ErbB2/Neu, Cyclin D₁, Cyclin E, ERs, c-Ha-ras, c-Met, Brca1 und Wnt-1, verwendet worden (Dimri, Band et al. 2005).

Die Induktion von Brustkrebs in Mausmodellen durch unterschiedliche Onkogene führt zu verschiedenen Tumorphänotypen. So entwickeln beispielsweise MMTV-*Wnt* Mäuse Tumore epithelialen und myoepithelialen Ursprungs, wo hingegen MMTV-*Her2/Neu* Tiere ausschließlich luminale Tumore ausbilden (Huang, Chen et al. 2008). Diese unterschiedlichen Phänotypen deuten darauf hin, dass die Wnt-abhängigen Tumore aus multipotenten Vorläuferzellen entstehen, während die durch *Her2/Neu* induzierten Tumore aus Progenitorzellen entstehen, die in ihrer Differenzierungskapazität auf das luminale Kompartiment beschränkt sind. Entsprechend dieser Ergebnisse wurden bei diesen Mausmodellen unterschiedliche Phänotypen für putative Tumorstammzellen beschrieben. Basierend auf der Oberflächenmarker-Expression von normalen murinen Mammastammzellen (siehe Tabelle 1 und Abs. 1.3.2), wurde berichtet, dass die CD24⁺/CD29^{high}-Zellpopulation in Neoplasien des MMTV-*Wnt* Mammakarzinom-Mausmodells angereichert ist (Shackleton, Vaillant et al. 2006). Ergänzende Untersuchungen im MMTV-*Wnt* Mammakarzinom-Mausmodell identifizierten CD24⁺/CD49f⁺/CD90⁺-Zellen als Tumor-initiiierenden Zellen (Cho, Wang et al. 2008). Da beschrieben wurde, dass das Heterodimer aus Integrin α6 (CD49f) und Integrin β1 (CD29) die Invasivitäts- und Überlebenseigenschaften von Mammakarzinomzellen fördert, stimmen beide für Tumorstammzellen vorgeschlagenen Phänotypen - CD24⁺/CD29^{high} und CD24⁺/CD49f - mit hoher Wahrscheinlichkeit überein (Grimshaw, Cooper et al. 2008; Pontier and Muller 2009). In anderen Mausmodellen für Brustkrebs mit p53-null Tumoren wurden ähnliche CSC-Phänotypen beobachtet. So waren in der CD24⁺/CD49f⁻-Tumorzellpopulation aus Mammakarzinomen des K14cre;Brca1^{F5-13/F5-13};p53^{F2-10/F2-10} Mausmodells Zellen mit Vorläufereigenschaften angereichert (Pajic, Kersbergen et al. 2010). Des Weiteren erfüllten CD24⁺/CD29^{high}-Mammakarzinomzellen aus Brca1^{Co/Co}; p53^{+/-};MMTV-Cre und p53-null Mäusen Kriterien von Tumor-initiiierenden Zellen (Vassilopoulos, Wang et al. 2008; Zhang, Behbod et al. 2008). Ein weiterer beschriebener Phänotyp für Tumorstammzellen aus MMTV-*Wnt* Mammakarzinomen ist CD24⁺/CD61^{high} (Vaillant, Asselin-Labat et al. 2008).

Allerdings sind diese Marker in manchen Mausmodellen nicht anwendbar. Beispielsweise ermöglichen CD24, CD29 und CD49f in Mammakarzinomen des BALB/c-neuT Modelles keine Anreicherung von Tumorzellen mit Vorläufereigenschaften. Hingegen konnten Sca-1⁺ Tumorzellen *in vitro* als nicht adhärenente Sphären wachsen und *in vivo* nach orthotopischer Transplantation von 100 Zellen Tumore initiieren (Chen, Woodward et al. 2007; Grange, Lanzardo et al. 2008).

Tabelle 2: Oberflächenmarker-Kombinationen, die in der Literatur für die Anreicherung von Tumorstammzellen in verschiedenen Mammakarzinom-Mausmodellen angewendet wurden.

Markerkombination	Modell	Referenz
CD24 ⁺ /CD29 ^{high}	MMTV- <i>Wnt</i> Brca1 ^{Co/Co} ;p53 ^{+/-} ;MMTV-Cre p53-null (BALB/c)	(Shackleton, Vaillant et al. 2006; Vassilopoulos, Wang et al. 2008)
CD24 ⁺ /CD49f	K14cre;Brca1 ^{F5-13/F5-13} ;p53 ^{F2-10/F2-10}	(Pajic, Kersbergen et al. 2010)
CD24 ⁺ /CD49f ⁺ /CD90 ⁺	MMTV- <i>Wnt</i>	(Cho, Wang et al. 2008)
CD24 ⁺ /CD61 ⁺	MMTV- <i>Wnt</i>	(Vaillant, Asselin-Labat et al. 2008)
Sca1 ⁺	BALB/c-neuT COMMA-D Zelllinie (BALB/c)	(Chen, Woodward et al. 2007; Grange, Lanzardo et al. 2008)

Alternativ zur Isolierung anhand von Oberflächenmarkern können Vorläuferzellen anhand spezifischer funktioneller Eigenschaften detektiert werden. *Side Population* (SP) Zellen bilden eine eigenständige Population, die sich dadurch auszeichnet, den DNA-bindenden Farbstoff Hoechst 33342 effektiv auszuschleusen. Die SP-Zellen der murinen Brustdrüse exprimieren zum größten Teil Sca-1 und können luminale und myoepitheliale *lineages* generieren. Dadurch wird diese seltene Zellpopulation als primitiv und undifferenziert bezeichnet. Allerdings sind die funktionellen Stammzeleigenschaften der SP-Zellen wegen der hohen Toxizität von Hoechst 33342 *in vivo* nicht zu untersuchen (Welm, Tepera et al. 2002; Alvi, Clayton et al. 2003).

1.4.4 Die ALDH enzymatische Aktivität als Bruststammzell- und Tumorstammzellmarker

Die Isolierung von Bruststamm- und Tumorstammzellen wird durch die hohe Anzahl der in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen und nicht überlappenden Oberflächenmarker erschwert. Die Verwendung von Hoechst 33342 zur funktionellen Analyse von Stammzeleigenschaften wird limitiert durch die Toxizität des Farbstoffes (Douville, Beaulieu et al. 2008).

Um diese Komplikationen zu vermeiden, wurde die Aldehyd-Dehydrogenase vom Typ1 (ALDH1) als funktioneller Stammzellmarker vorgeschlagen. Die Aldehyd-Dehydrogenasen sind zytosolische Enzyme, die Aldehyde zu Carboxylsäuren oxidieren (Russo and Hilton 1988) und dadurch bei der zellulären Entgiftung eine essenzielle Rolle spielen. In der Leber dient die ALDH1 hauptsächlich der Retinsäure-Biosynthese, einem wichtigen Faktor für die Entwicklung und Homöostase adulter Organe (Evans 1988;

Duester 2008; Mark, Ghyselinck et al. 2009). Die Aktivität der Aldehyde Dehydrogenase Typ1 kann durch den Aldefluor®-Assay gemessen werden. Dabei wird ein Membran-permeables fluoreszierendes Substrat (BODIPY-konjugierter Aminoacetaldehyd) durch die ALDH1 metabolisiert und führt zu einer erhöhten Fluoreszenz der positiven Zellen (Storms, Trujillo et al. 1999). Mithilfe dieses Assays konnte gezeigt werden, dass humane hämatopoetische und neurale Vorläuferzellen eine hohe ALDH-Aktivität aufweisen (Armstrong, Stojkovic et al. 2004; Hess, Wirthlin et al. 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Tumorstammzellen in Myelomen und akuten myeloiden Leukämien ALDH1⁺ sind (Matsui, Huff et al. 2004; Pearce, Taussig et al. 2005). Ginestier et al. konnten 2007 diese Beobachtungen an humanen Brustdrüsen bestätigen. Dabei zeigten die Autoren, dass die ALDH1⁺ Zellen aus normalen Gewebe (ca. 8% aller Zellen) ein erhöhtes Potential zur Selbsterneuerung und Multipotenz aufweisen. Diese Zellen konnten in vitro Mammosphären generieren und in vivo Drüsenstrukturen regenerieren. Parallel wurden 4 Brustläsionen untersucht. Dabei zeigten die ALDH1⁺ Brustkrebszellen (ca. 3-10% aller Tumorzellen) im Vergleich zu den ALDH1⁻-Zellen in Xenotransplantationen eine erhöhte Tumorigenität und rekapitulierten den Phänotyp des Primärtumors (Ginestier, Hur et al. 2007). Innerhalb der ALDH1⁺ Zellpopulation wies die von Al-Hajj et al. beschriebene CD24⁻/CD44⁺ Subpopulation ein noch stärkeres tumorigenes Potential auf.

Anhand von tissue microarrays konnte ALDH1 in 20 bis 30% der Brustläsionen (n=481) nachgewiesen werden. Dabei korrelierte die ALDH1 Positivität mit weiteren Tumoreigenschaften, wie einem hohen histologischen Grad, der ERBB2-Überexpression, der Abwesenheit von Östrogen- und Progesteronrezeptoren und war mit schlechten Überlebenschancen assoziiert (Ginestier, Hur et al. 2007).

1.4.5 Stammzell- und Tumorstammzellnische

Eine Vielzahl verschiedener Arbeiten beschreibt die Mikroumgebung von Stammzellen als den entscheidenden Faktor für die sensible Regulation zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung. Dabei ist eine strikte, sensible Kontrolle beider Prozesse für den Erhalt der Gewebe-Homöostase von zentraler Bedeutung (Sneddon and Werb 2007). Die Integration der Stammzellen in ihrer Nische wird dabei vermutlich durch Zell-Zell-Kontakte und Proteine der extrazellulären Matrix erreicht und spielt eine essenzielle Rolle bei der Stammzell-Sequestrierung und dem damit verbundenen Wirkungsspektrum lokaler Faktoren, die der Differenzierung entgegenwirken und das Selbsterneuerungspotential der Stammzellfunktion unterstützen. Die Wechselwirkungen zwischen Stammzelle und ihrer Mikroumgebung, der Stammzellnische, wurde als erstes für die Keimbahnzellen von *Drosophila*

melanogaster beschrieben. Später gelang es auch intestinale, neurale, epidermale und hämatopoetische Stammzellnischen bei Säugetieren zu identifizieren (Kaplan, Riba et al. 2005; Li and Xie 2005; Moore and Lemischka 2006). Im Fall der Darm- und Haarfollikelstammzelle beispielsweise bestehen die Nischen aus mesenchymalen Zellen. Diese sind durch die Sekretion mitogener Faktoren charakterisiert, die unmittelbar die entwicklungsbiologisch relevanten *Wnt*- und *BMP*- (*Bone morphogenetic proteins*) Signaltransduktionswege beeinflussen und regulieren. Die Arbeiten unterschiedlicher Arbeitsgruppen trugen dazu bei, dass die Beziehungen zwischen Stammzellen und deren Nische nun als viel dynamischer als anfangs vermutet betrachtet werden. Besonders für hämatopoetische Stammzellen (HSC) wurde gezeigt, dass zwei anatomisch und physiologisch distinkte Nischen existieren: auf der einen Seite die Osteoblasten-Nische im Knochenmark, die als Heim für die „ruhenden“-HSCs dient, und auf der anderen Seite die vaskuläre Nische, die „aktivierte“ HSCs beherbergt (Kaplan, Riba et al. 2005; Li and Xie 2005).

Die Existenz solcher multiplen und dynamischen Stammzellnischen könnte auch für die Tumorstammzellforschung von großer Bedeutung sein (Sneddon and Werb 2007). Basierend auf mehreren Beobachtungen wurde die Existenz einer Tumorstammzellnische mit ähnlichen regulatorischen Eigenschaften wie der Nische normaler Stammzellen postuliert. Olumi et al. gelang zudem der Beweis, dass Fibroblasten aus Prostatakarzinomen die Tumorentwicklung unterstützen. Diese Eigenschaft besitzen normale Prostata-Fibroblasten nicht (Olumi, Grossfeld et al. 1999). Zudem wurde beobachtet, dass allein die Deregulation der Nische zur unkontrollierten Vermehrung der Stammzellen führen kann. So konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Stromazellen die Entstehung von Tumoren in der Brustdrüse induzieren können wenn sie die Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP3) überexprimieren (Sternlicht, Lochter et al. 1999). Haut-Basalzellkarzinom assoziierte Fibroblasten, welche die Tumorstammzellnische formen, unterscheiden sich von ihren normalen stromalen Pendants. Sie exprimieren bestimmte anti-Differenzierungsfaktoren die in der normalen Stammzellnische ebenso produziert werden und die Tumorzellen in einem weniger differenzierten Zustand erhalten (Sneddon, Zhen et al. 2006). Aber nicht nur spezialisiertes Stroma wurde als Nische für Stamm- und Tumorstammzellen beschrieben. Neueste Daten über Gehirntumore geben Hinweise darauf, dass das Gefäßnetz als Tumorstammzellnische fungiert. Zuerst wurde gezeigt, dass Gliom-Tumorstammzellen VEGF (*vascular endothelial growth factor*), einen potenten Effektor der Gefäßneubildung, exprimieren (Bao, Wu et al. 2006). Diese Theorie unterstützend resultiert die Xenotransplantation von Gehirntumorzellen, denen zuvor Endothelzellen zugesetzt wurden, in einer Zunahme selbsterneuernder Tumorzellen. Dagegen führte die Depletion der Blutgefäße durch anti-angiogenetische Therapien zur

Verhinderung der Gehirnkrebszellen-Selbsterneuerung und Hemmung des Tumorwachstums (Calabrese, Poppleton et al. 2007).

Diese Beobachtungen machen deutlich, dass Manipulationen von Molekülen, die im Signalaustausch zwischen Tumorstammzellen und Mikroumgebung involviert sind, von zentraler klinischer Bedeutung sein könnten und neue Zielstrukturen für therapeutische Angriffspunkte darstellen könnten. Unter diesem Aspekt stellt das *carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) aufgrund seiner beschriebenen Eigenschaften als Zelladhäsionsmolekül im Epithel und in Blutgefäßen einen sehr interessanten Kandidaten dar (Ocklind, 1982).

I.4.5.1 CEACAM1 in normalen Gewebe

CEACAM1 ist auch unter dem Namen biliäres Glykoprotein (BGP) oder CD66a bekannt und gehört zur „*carcinoembryonic antigen*“-Familie (CEA), welche zur Superfamilie der Immunglobuline gezählt wird. Humanes CEACAM1 besitzt innerhalb der Säugetiere starke Homologien (u.a. bei Nagetieren) und weist eine Vielzahl an Isoformen auf, die in Abbildung 8 dargestellt werden (Beauchemin, Draber et al. 1999; Kammerer, Popp et al. 2004). CEACAM1 besteht generell aus vier stark glykosylierten extrazellulären Immunglobulindomänen (Ig), einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne, welche entweder lang (71 bis 73 Aminosäuren) oder kurz ist (10 Aminosäuren). Im Gegenteil zu der kurzen, besitzt die lange Variante von CEACAM1 mehrere Serine, Threonine und Thyrosine, die für die Transduktion von intrazellulären Signalen phosphoryliert werden können. Sowohl die lange als auch die kurze Form (L und S) werden gewebsspezifisch ko-exprimiert, wobei das Verhältnis zwischen CEACAM1-L und -S über den Signalisierungserfolg entscheidet (Turbide, Kunath et al. 1997; Singer, Scheffrahn et al. 2000; Kuespert, Pils et al. 2006). Die erste beschriebene Eigenschaft von CEACAM1 ist die Beteiligung an Zelladhäsionsprozessen (Ocklind and Obrink 1982; Obrink 1997). Dabei interagieren die Ig-Domänen zweier CEACAM1 Moleküle in einer sogenannten homophilen Bindung miteinander. Darüber hinaus kann CEACAM1 über heterophile Wechselwirkungen andere Moleküle der CEA-Familie binden. In beiden Fällen kommt es zur Induktion intrazellulärer Signalwege. Beispielsweise berichten einige Veröffentlichungen, dass die homo- bzw. heterophile Bindung der CEACAM1-4L Isoform zur Inhibition der Zellproliferation durch Modulation des Wnt-Signaltransduktionswegs führt (Jin, Li et al. 2008). Weiterhin wurde gezeigt, dass in Endothelzellen CEACAM1-L die Motilität von Zellen durch Aktivierung von Proteinen der Rho- und Integrin-Familie positiv beeinflussen kann (Muller, Singer et al. 2005). Darüber hinaus spielt das Molekül in Proliferations- und Differenzierungsprozessen eine wichtige Rolle. CEACAM1 wird während der Embryonalentwicklung und später in Geweben an der Oberfläche vieler

Epithelien (wie z.B. Magen, Darm und urogenitale Organe) aber auch an der Membran von myeloischen Zellen und Endothelzellen exprimiert (Beauchemin, Draber et al. 1999; Nouvion and Beauchemin 2009). Dabei werden CEACAM1 wichtige Aufgaben als Mediator beim Gewebeaufbau und der Zellpolarität zugeschrieben (Thompson, Grunert et al. 1991).

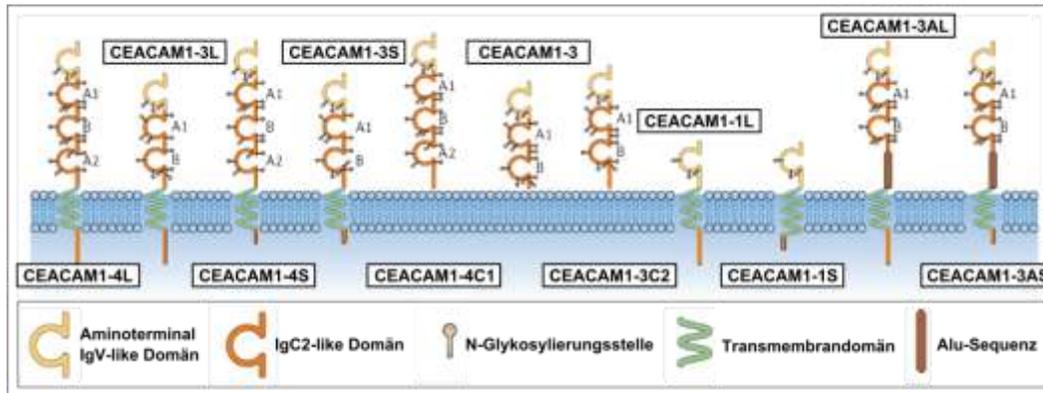


Abbildung 8: Humane CEACAM1 Isoformen

Darstellung der Strukturen und vorhergesagter Glykosylierungsmuster der verschiedenen humanen CEACAM1-Isoformen. Das CEACAM1-Gen besteht aus 9 Exons, die durch alternatives Spleißen 11 unterschiedliche Isoformen generieren können. In der standardisierten Nomenklatur beschreibt die Ziffer nach CEACAM1 die Anzahl an Immunoglobulin ähnlichen Domänen (IgV für variable und IgC für constante *immunoglobulin like* Regionen. Der darauf folgende Buchstabe liefert Informationen über das carboxyterminale Ende: L und S stehen jeweils für einen langen (*long*, L) oder kurzen (*short*, S) zyttoplasmatischen Teil während C die Abwesenheit von Transmembran- und Intrazellulär- Domäne beschreibt (Beauchemin, Draber et al. 1999).

CEACAM1 wird im Zusammenhang mit Vaskulatur und Angiogenese in einer Vielzahl von Veröffentlichungen als wichtiger Faktor beschrieben. Beispielsweise kann die lösliche Variante von CEACAM1 die Proliferation, Chemotaxie und die Bildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen bei Endothelzellen *in vitro* sowie *in vivo* stimulieren und somit pro-angiogenetisch wirken (Ergun, Kilik et al. 2000). Zudem wurde gezeigt, dass der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) die Expression von CEACAM1 auf Endothelzellen deutlich verstärkt und parallel die Neubildung von Gefäß-ähnlichen Mustern *in vitro* induziert. Monoklonale Antikörper gerichtet gegen CEACAM1 hemmen diesen Effekt, woraus man folgern kann, dass CEACAM1 ein Effektor von VEGF ist (Ergun, Kilik et al. 2000; Chen, Chen et al. 2005). Anhand von Gefäßinvasions-Experimenten konnten Horst et al. zeigen, dass die Gefäßneubildung und -invasion in Wachstumsfaktor enthaltenden Matrigel®-Implantaten bei CEACAM1-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp Kontrollmäusen deutlich reduziert ist. Hingegen führte die Überexpression von CEACAM1-4L in Endothelzellen zu einer erhöhten Gefäßinvasion (Horst, Ito et al. 2006). Des Weiteren wurde CEACAM1 anhand von Expressions-Arrays als Teil des genetischen Programms für die Antwort auf Hypoxiebedingungen identifiziert (Chen, Chen et al. 2005; Wu, Laser et

al. 2006). Die Tabelle 3 fasst die bisher beschriebenen Eigenschaften von CEACAM1 in normalen Geweben zusammen.

Tabelle 3: Eigenschaften von CEACAM1 in normalen Geweben

Für CEACAM1 beschriebenen Eigenschaften	Referenz
Zelladhäsion: CEACAM1 ist ein Zell-Zell Adhäsionsmolekül, das sowohl homophile als auch heterophile Bindungen (mit z.B. CEACAM5 oder CEACAM6) bilden kann. Dabei entstehen eher schwache Interaktionen, die vorwiegend eine Rolle als „Sensor“ in der Regulation von zellulären Signalwegen haben.	(Oikawa, Kuroki et al. 1992; Obrink 1997)
Zellproliferation: CEACAM1 inhibiert die Proliferation von Epithelzellen und T-Lymphozyten durch kontaktvermittelte Mechanismen.	(Chen and Shively 2004; Scheffrahn, Singer et al. 2005; Liu, Wei et al. 2007)
Apoptose und Morphogenese: CEACAM1 induziert Apoptose in Mammaepithelzellen bei der Bildung des Lumen während der Brustdrüsen-Morphogenese. Die Expression von CEACAM1 in reifen Kolonozyten führt ebenso zur Apoptose.	(Kirshner, Chen et al. 2003; Nittka, Gunther et al. 2004)
Invasion und Migration: CEACAM1 Expression stimuliert die Invasions- und Migrationseigenschaften von Endothelzellen.	(Muller, Singer et al. 2005; Horst, Ito et al. 2006)
Angiogenese: CEACAM1 wird als positiver Modulator der Angiogenese beschrieben.	(Ergun, Kilik et al. 2000; Chen, Chen et al. 2005; Horst, Ito et al. 2006)
Modulation von Signaltransduktionswegen: CEACAM1-4L kann durch seine intrazelluläre Domäne β -Catenin binden und an die Zellmembran rekrutieren. Dies verhindert die Transaktivierung von Zielgenen des Wnt-Signalweges. Zudem wurde berichtet, dass die Expression von CEACAM1-L den Rho-Signaltransduktionsweg inhibieren und den Rac-Signaltransduktionsweg aktivieren kann, wenn Endothelzellen auf einer Laminin-1 haltigen Matrix <i>in vitro</i> wachsen.	(Muller, Singer et al. 2005; Jin, Li et al. 2008)

I.4.5.2 CEACAM1 in der Tumorentwicklung

In vielen Krebserkrankungen epithelialen Ursprungs, wie z.B. Kolonkarzinomen, Leberkarzinomen, zahlreichen Mammakarzinomen, Prostatakarzinomen, Nierenkarzinomen und Harnblasenkarzinomen, wird im Verlauf der Krankheit die Expression von CEACAM1 in Tumorzellen unterdrückt (Neumaier, Paululat et al. 1993; Rosenberg, Nedellec et al. 1993; Tanaka, Hinoda et al. 1997; Huang, Simpson et al. 1998; Busch, Hanssen et al. 2002; Kammerer, Popp et al. 2004; Oliveira-Ferrer, Tilki et al. 2004; Tilki, Irmak et al. 2006). Der Verlust von CEACAM1 korreliert hierbei mit einer erhöhten Aggressivität der Tumore. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde postuliert, dass CEACAM1 als Tumorsuppressor

fungieren kann. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden Experimente durchgeführt, in denen CEACAM1 negative Kolon- und Prostatakarzinom-Zelllinien mit CEACAM1-Expressionsvektoren transfiziert wurden. Dabei zeigten die Autoren, dass diese Zellen verringerte Wachstumseigenschaften und Kolonien-Bildungseffizienzen *in vitro* sowie geringere Wachstumsraten in Transplantationsexperimenten *in vivo* im Vergleich zur Kontrollzellen aufweisen (Hsieh, Luo et al. 1995; Kunath, Ordonez-Garcia et al. 1995). Andererseits wurde auch gezeigt, dass die Expression von CEACAM1 in Schilddrüsenkrebs, Magenkarzinomen, nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (non-small cell lung cancer, NSCLC) und Melanomen die Metastasierungseigenschaften der Tumorzellen fördert (Kinugasa, Kuroki et al. 1998; Thies, Moll et al. 2002; Siene, Dango et al. 2003; Liu, Wei et al. 2007; Dango, Siene et al. 2008). So kann CEACAM1 nicht grundsätzlich als Tumorsuppressor bezeichnet werden, sondern vielmehr als kontextabhängiger Modulator der Zellproliferation, Apoptose und Zellmigration. Des Weiteren liegt die Annahme nahe, dass je nach Krebsart eine Veränderung der Expression von CEACAM1 der Tumorprogression dient, indem entweder metastatische Eigenschaften im Fall einer Überexpression gewonnen werden, oder Zellteilungs- und Überlebenseigenschaften bei einer Herunterregulation gefördert werden.

Parallel zu den regulatorischen Funktionen in Epithelzellen übt CEACAM1 auf Endothelzellen, wie schon im Abs 1.4.5.1 erwähnt, eine ebenso entscheidende Rolle in Prozessen der Gefäßneubildung aus. Im Kontext der Tumolvaskularisierung zeigten verschiedene Gruppen, dass eine Herunterregulation von CEACAM1 in Tumorzellen von Harnblasen- und Prostatakarzinomen zur Stimulation der Angiogenese in der Tumorperipherie führt (Oliveira-Ferrer, Tilki et al. 2004; Tilki, Irmak et al. 2006). Die Überexpression von CEACAM1 in Prostatakarzinomzellen führte zur Expression von Faktoren, die die Gefäßneubildung inhibieren (Volpert, Luo et al. 2002). Im Gegensatz zeigt sich in NSCLC eine Korrelation zwischen verstärkter CEACAM1-Expression und erhöhter Blutgefäßdichte, erhöhter Metastasierungsrate und einer allgemein schlechteren Prognose (Dango, Siene et al. 2008). Somit spielt CEACAM1 auch bezüglich Tumolvaskularisierung eine kontextabhängige Rolle und kann je nach Krebsart und je nach endothelialer bzw. epithelialer Expression die Tumorneoangiogenese positiv oder negativ beeinflussen. Aufgrund dieser vielseitigen Aspekte wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von CEACAM1 auf die Epitheltumorzellen von Mammakarzinomen und auf deren Mikroumgebung in einem Mausmodell untersucht.

I.5 Das WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell

Wie schon im Abschnitt I.4.3 erwähnt, wurden zahlreiche Mausmodelle zur Untersuchung der Brustkrebsentwicklung generiert (Fantozzi and Christofori 2006). Die in unserem Labor entwickelten WAP-T Mäuse tragen die „frühe“ Region des Simian Virus 40 (SV40) als Transgen unter Kontrolle des gewebespezifischen murinen WAP-Promotors (*wey acidic protein promotor*) (Schulze-Garg, Lohler et al. 2000). Der WAP-Promotor ist ein sehr streng regulierter Promotor, der ausschließlich in den Epithelzellen der Brustdrüse in der späten Schwangerschaft (Tag 12-13) aktiviert wird und bis in die Involutionsphase transkriptionell aktiv bleibt. (Bayna and Rosen 1990; Burdon, Sankaran et al. 1991; Hennighausen, Westphal et al. 1991; Kolb, Gunzburg et al. 1994). Das Anschalten des WAP-Promotors erfolgt durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren NFI, Stat5 und *Glukokortikoid*-Rezeptor in Folge erhöhter Mengen von laktotrophen Hormonen (Prolaktin und Östrogen), Hydrocortison und Insulin während der Schwangerschaft (Liu, Robinson et al. 1995; Mukhopadhyay, Wyszomierski et al. 2001).

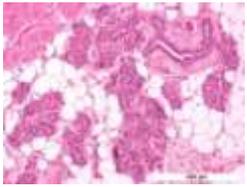
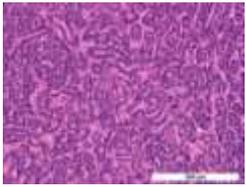
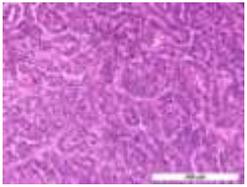
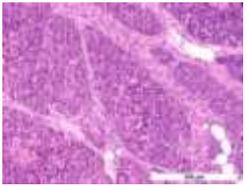
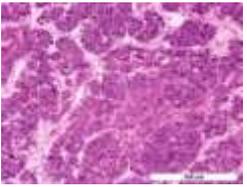
Die Induktion von Mammakarzinomen im WAP-T Mausmodell basiert auf den transformierenden Eigenschaften der drei Produkte der „frühen“ SV40 Region: des großen T-Antigens (*large T antigen*, LT), des kleinen T-Antigens (*small T antigen*, st) und des 17 kT Proteins. Die durch diese Proteine entstehenden Störungen der Zellzyklusregulation führen zu Entwicklungsanomalitäten und Tumorgenese. Das SV40 LT ist ein multifunktionales Protein, dessen Aktivität darauf basiert, dass die Tumorsuppressoren wtp53, pRB, p107, p130, CBP/p300 und RASSF1A gebunden und inaktiviert werden (Zerrahn and Deppert 1993; Ahuja, Saenz-Robles et al. 2005). Als Konsequenz entsteht in den Zellen eine funktionelle p53- und pRb-Null-Situation, was Prozesse wie Apoptose oder Zellzyklus-Arrest verhindert und den Zellzyklus stimuliert (Sheng, Love et al. 2000; Voorhoeve and Agami 2003). Zudem kann LT bzw. der LT-p53 Komplex die Transkription bestimmter Gene aktivieren bzw. reprimieren und Differenzierungsprozesse hemmen (Mahon, Chepelinsky et al. 1987; Chen, Liang et al. 2004; Krepulat, Lohler et al. 2005). Analog zu LT dient das 17 kT Protein zur Reduktion der pRB und p300 Mengen und führt zur Zellzyklus-Stimulierung (Boyapati, Wilson et al. 2003). Zusätzlich zu der LT vermittelten Zelltransformation wird durch das st Protein die Phosphataseaktivität von PP2A (*Protein phosphatase 2*) inhibiert und dessen Substratspezifität geändert. Dadurch wird der *Wnt*-Signalweg konstitutiv aktiviert (Chen, Possemato et al. 2004; Ali-Seyed, Laycock et al. 2006).

Die meisten humanen Mammakarzinome weisen Mutationen oder Repression der Tumorsuppressoren p14ARF, p16INK4a, p53 und pRB, sowie eine Hochregulation von Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen

(Cdk) auf (Silva, Silva et al. 2003). Der dadurch entstehende p53 und pRB Funktionsverlust ist vergleichbar mit der durch LT induzierten Inaktivierung im WAP-T Mausmodell.

Während der Schwangerschaft und Laktation der WAP-T Mäuse exprimieren je nach Linie 5% bis 100% der Epithelzellen der Brustdrüse das SV40-LT (Schulze-Garg, Lohler et al. 2000). Nach Abschluss der Involution exprimiert eine kleine Drüsenzellpopulation das LT Hormon-unabhängig weiter. Durch die SV40-LT vermittelte Inaktivierung von p53 und pRB und zusätzlich akkumulierten genetischen Alterationen entwickeln sich aus diesen Zellen Hyperplasien, Dysplasien und intraepitheliale Neoplasien wie z.B. duktale *in situ* Karzinome (DCIS), die den entsprechenden humanen Läsionen ähneln (Schulze-Garg, Lohler et al. 2000). Weitere Mutationen führen zum Wachstum der Zellen als invasives aber selten metastasierendes Mammakarzinom. Diese durch die SV40 „frühe“ Region verursachten Brustläsionen wurden in 5 unterschiedliche Kategorien klassifiziert, basierend auf deren histologischen Grad und den publizierten Empfehlungen der Annapolis-Konsensus-Konferenz (Cardiff, Anver et al. 2000; Heinlein, Krepulat et al. 2008).

Tabelle 4: Klassifizierung der WAP-T Tumoren in 5 Kategorien, basierend auf dem histologischen Grad
 Als abbildendes Beispiel werden Aufnahmen von H&E-Färbungen dargestellt. Maßstab 250 µm.

Grad 0 (G0)	Differenzierte Tumore		Undifferenzierte Tumore	
	Grad 1 (G1)	Grad 2 (G2)	Grad 3 (G3)	Grad 4 (G4)
Nicht invasive intraepitheliale Neoplasien	Gut differenzierte invasive Adenokarzinome	Mäßig differenzierte invasive Adenokarzinome	Schlecht differenzierte bis undifferenzierte invasive Adenokarzinome	Schlecht differenzierte invasive Adenokarzinome mit anaplastischen Änderungen.
				

Im Rahmen der durchgeführten experimentellen Arbeiten wurde die Maus-Linie WAP-T-NP8 gewählt, da die mittelstarke Expression des Transgens (SV40 frühe Genregion) in den Mammaepithelzellen dieser Mäuse einerseits eine unkomplizierte Züchtung ermöglicht, andererseits aber ausreicht, dass 100% der induzierten WAP-T-NP8 Mäuse Tumore entwickeln.

I.6 Problemstellung

Epitheliale Krebsarten, zu denen u.a. auch Brustkrebs gehört, sind die häufigsten malignen Erkrankungen beim Menschen. Humane Mammakarzinome sind durch eine breite pathologische und molekulare Heterogenität gekennzeichnet, die sich mithilfe der Tumorstammzell- (*cancer stem cell*-, CSC-) Hypothese erklären lässt. Dieser Theorie entsprechend, werden Krebserkrankungen durch eine kleine Population von sogenannten Tumorstammzellen, die Vorläuferzeleigenschaften wie Selbsterneuerungs-, Proliferations- und Differenzierungspotential aufweisen, initiiert und aufrechterhalten (Al-Hajj, Becker et al. 2004; Dalerba, Cho et al. 2007). Durch aberrante Differenzierung dieser Tumorstammzellen entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher differenzierter nicht tumorigener Tumorzellen, die zur intrinsischen Tumorerheterogenität führen. Neuste Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass Tumorstammzellen für die relative Ineffizienz der aktuellen Krebstherapien verantwortlich sind. Einerseits besitzen CSC die Eigenschaft zu disseminieren und sind damit höchst wahrscheinlich in Prozesse der Metastasenbildung involviert (Krepulat, Lohler et al. 2005; Dalerba, Cho et al. 2007). Andererseits können konventionelle Krebsbehandlungen basierend auf Chemo- und Radiotherapien Tumorstammzellen mit nur sehr geringer Effizienz eliminieren, was diese Zellen zur vermutlichen Ursache für Rezidive bei Krebspatienten macht (Phillips, McBride et al. 2006; Yu, Yao et al. 2007; Li, Lewis et al. 2008). Eine besondere Herausforderung in der modernen Krebsforschung besteht somit darin, ein besseres Verständnis über die Identität und Rolle von Tumorstammzellen während der gesamten Karzinogenese, von der Tumorinitiierung über die Tumorprogression bis hin zur Bildung von Metastasen, zu erwerben. Besonders wichtig für die Verbesserung der Patientenbehandlungen ist hierbei u.a. die Identifizierung und Charakterisierung der Tumorzellen, die für eine vollständige Remission eliminiert werden sollen, sowie die Bestimmung ihrer Anzahl. Die Entwicklung und Charakterisierung von experimentellen Modellen, welche die Vielfalt der Krebserkrankungen widerspiegeln können, ist dabei von großer Bedeutung für ein besseres molekulares Verständnis der zugrundeliegenden Tumorbiologie.

Das WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell wurde im Heinrich-Pette-Institut, Abteilung Tumorstammzellbiologie unter der Leitung von Prof. Deppert entwickelt. Dies erwies sich innerhalb der letzten Jahre als geeignetes, die Humansituation widerspiegelndes *in vivo* Modell zur Untersuchung verschiedenster für Brustkrebs relevanter Fragestellungen (Schulze-Garg, Lohler et al. 2000; Heinlein, Krepulat et al. 2008). Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Relevanz der Tumorstammzelltheorie anhand des WAP-T Mausmodells zu untersuchen.

Um dies zu ermöglichen, sollen zuerst WAP-T Tumorzellen bezüglich der in der Literatur für CSC beschriebenen Charakteristika, d.h. Differenzierungs-, Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential untersucht werden. Zur Beantwortung der Frage zur Existenz von Tumorstammzellen in den WAP-T Mammakarzinomen wurde wie folgt vorgegangen: (i) Es sollte aufgeklärt werden, ob eine zelluläre Heterogenität als Hinweis auf Differenzierungspotential innerhalb einzelner WAP-T Tumorgewebe besteht. Hierfür sollten im ersten Teil dieser Arbeit die Expression von bekannten biologischen Markern, die innerhalb des normalen Brustgewebes *lineage*-spezifische Zelltypen charakterisieren, in Tumorgeweben untersucht werden. Um weiterhin die Präsenz von möglichen Tumorstammzellen in WAP-T Tumoren zu untersuchen, sollte (ii) dann beantwortet werden, ob Zellen mit tumorinitiierenden Eigenschaften in den WAP-T Tumoren vorhanden sind. Die Induktion von Tumoren mit Eigenschaften ähnlich der des Primärtumors gilt als anerkannter Beweis für Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential von Tumorzellen (Nakshatri, Srour et al. 2009). Für diesen Zweck sollte zuerst die Methode der orthotopischen Zelltransplantation von Primärtumorzellen etabliert und optimiert werden. Als Nächstes sollte (iii) untersucht werden, ob verschiedene in der Literatur beschriebene Tumorstammzellmarker zur Charakterisierung von Tumorstammzellen in Mammakarzinomen des WAP-T Mausmodels anwendbar sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, das Potential von CEACAM1 als Zielmolekül für die Krebstherapie einzuschätzen. Die Eigenschaften des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 als Modulator der Zellteilung, –apoptose sowie -motilität und vor allem als Regulator der Wnt-, Rho- und Rac-Signaltransduktionswege, machen dieses Molekül zu einem interessanten Kandidaten für potentielle anti-proliferative, anti-migratorische oder anti-Neoangiogenese Krebstherapien (Muller, Singer et al. 2005; Jin, Li et al. 2008; Obrink 2008). So sollte im letzten Teil der vorliegenden Arbeit (iv) untersucht werden, ob eine Modulation von CEACAM1 in den WAP-T Mammakarzinomen eine Veränderung von Tumoreigenschaften wie z.B. Wachstumsgeschwindigkeit und Invasionseigenschaften zur Folge hat.

II MATERIAL

II.1 BIOLOGISCHES MATERIAL

II.1.1 Mausstämme

Der BALB/c Inzucht-Mausstamm trägt eine genetische Prädisposition zur spontanen Mammakarzinomentwicklung. Aus diesem Grund wurden die WAP-T, CEACAM1^{-/-} und CEACAM^{endo+} Mauslinien im BALB/c Hintergrund analysiert. Mauslinien, die ursprünglich in anderen Hintergründen generiert wurden, wurden mindestens 12 Generationen mit BALB/c Tiere rückgekreuzt, bevor sie in Experimenten Anwendung fanden. Damit kann eine über 99,9 prozentige Homozygotie mit dem BALB/c-Stamm (Abbildung 9) erreicht werden.).

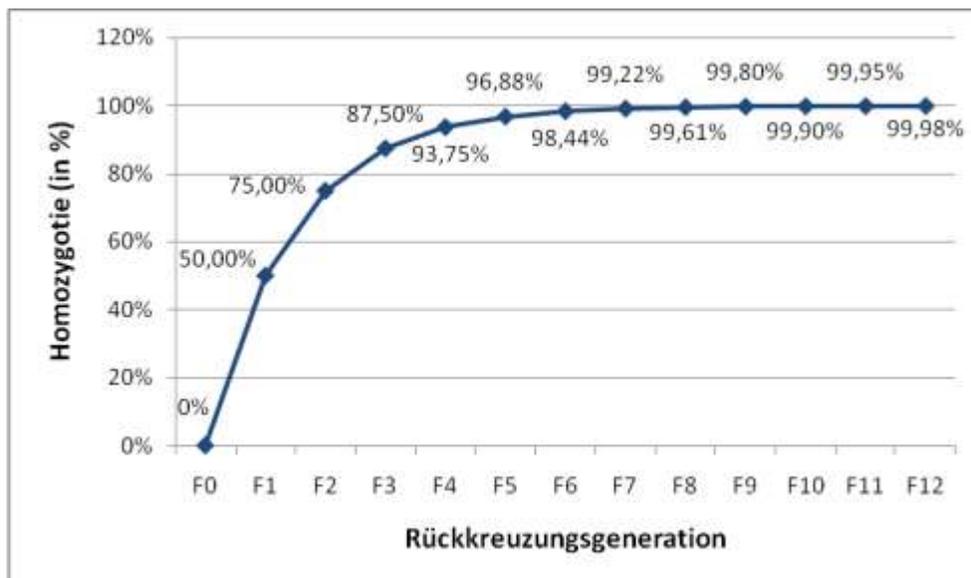


Abbildung 9: Darstellung der Genhomologie zum Hintergrundstamm in Abhängigkeit von der Generation während einer Mauslinien-Rückkreuzung

II.1.2 WAP-T transgene Mauslinien

WAP-T und WAP-T-NP Mäuse wurden im Jahr 1997 in einem BALB/c Hintergrund generiert (Schulze-Garg, Lohler et al. 2000). Diese transgene Mauslinien weisen die frühe Gen-Region des SV40 Virus unter der Kontrolle des murinen WAP-Promotors auf. Während WAP-T1 Mäuse für einen Wildtyp LT kodieren, exprimieren WAP-T-NP8 und -NP6 Mäuse eine Variante des LT-Antigens, welche mit einem Epitop aus dem Nukleokapsid-Protein des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV NP-Epitop) fusioniert ist. Außerdem unterscheiden sich WAP-T1, WAP-T-NP8 und WAP-T-NP6 Mäuse voneinander, indem sie unterschiedliche Kopienzahlen des Transgens, welche an verschiedenen Stellen im Genom integriert

sind, aufweisen. Dies führt unter anderem zu unterschiedlichen Expressionsprofilen von SV40-LT in Epithelzellen der Mammae nach Induktion (siehe

Tabelle 5).

Tabelle 5: Expression von SV40-LT während der Laktation in den WAP-T Mauslinien

Mauslinie	Expression des Transgens (SV40-LT) während der Laktation	
WAP-T1	hohe Expression	ca. 90-100% der Brustdrüsenepithelzellen
WAP-T-NP8	intermediäre Expression	ca. 50-60% der Brustdrüsenepithelzellen
WAP-T-NP6	schwache Expression	ca. 3-5% der Brustdrüsenepithelzellen

II.1.3 CEACAM1^{-/-} und CEACAM1^{Endo+} Mauslinien

CEACAM1^{-/-} Mäuse

Die CEACAM1^{-/-} Mauslinie wurde von N. Beauchemin im C57BL/6-Hintergrund generiert, indem die zwei ersten Exons des Ceacam1-Gens durch eine Kasette ersetzt wurden, die für die Neomycinresistenz (neo^r) unter Kontrolle des Thymidin Kinase (TK) Promotors kodiert (Leung, Turbide et al. 2006). Das Entfernen des Exons 1 führte zum Verlust des ATG-Startkodons. Durch die Deletion des Exons 2 konnte die erste Immunoglobulin-like (Ig-like) Domäne, die am wichtigsten für die Ceacam1-Funktion ist, entfernt werden (Abbildung 10). CEACAM1^{-/-} Mäuse sind lebensfähig, fertil und entwickeln spontan keine Tumore.

CEACAM1^{endo+} Mäuse

Die CEACAM1^{endo+} Mauslinie wurde von A. Horst im FVB/N-Hintergrund generiert (Horst, Ito et al. 2006). In diesen Mäusen dient ein Konstrukt, in dem die Ceacam1-L cDNA unter Kontrolle des für Endothelzellen spezifischen Tie2-Promotor steht, als Transgen (Abbildung 10). Die CEACAM1^{endo+} Mäuse sind ebenfalls lebensfähig, fertil und entwickeln spontan keine Tumore.

Um den Einfluss von Ceacam1 in der WAP-T Mammakarzinogenese zu untersuchen, erfolgte zuerst, wie bereits oben beschrieben, eine Rückkreuzung beider CEACAM1^{-/-} und CEACAM1^{endo+} Mauslinien mit BALB/c Mäusen für mindestens 12 Generationen, um eine über 99,9 prozentige Homozygotie mit dem BALB/c-Stamm zu erreichen (Abbildung 9).

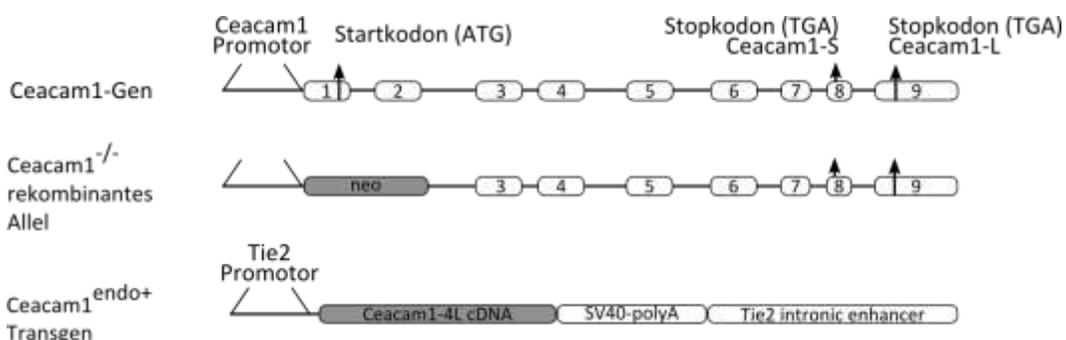


Abbildung 10: Darstellung des Ceacam1-Gens, des Ceacam1^{-/-}-Allels und des Ceacam1^{endo+}-Transgens

II.2 Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACS-Aria	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD FACS-Canto	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Bioanalyzer 2100	Agilent, Waldbronn, DE
Brutschrank B6060	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Chirurgisches Besteck (Dumont)	Roth, Karlsruhe, DE
Cryostats Leica CM3050	Leica, Wetzlar, DE
Digitalkamera (PowerShot G3)	Canon, Krefeld, DE
Einfrierbox Cryo-Safe™	Neolab, Heidelberg, DE
Eismaschine AF 30	Scotsman, Vernon Hills, USA
Feinwaage XSP205	Mettler Toledo, Gießen, DE
Fluoreszenzmikroskop DMI6000B	Leica, Wetzlar, DE
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Gefriertruhe -80 °C	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Geldokumentation BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen, DE
Gelkammer Horizon 11.14	Biometra, Göttingen, DE
Gelkammer Model 40-0911	Peqlab, Erlangen, DE
Handschuhe Latex, Nitril	Kimberly-Clark, Zaventem, B
Heizblock Techne Dri-Block DB 2A	Thermo-Dux, Wertheim, DE
Homogenisator Fast Prep FP120	Qbiogene, Heidelberg, DE
Inkubationsschüttler Multitron 2	Infors AG, Bottmingen-Basel, CH
Konfokalmikroskop LSM 510 META	Zeiss, Oberkochen, DE
Kühlfalle RT100A	Savant Instruments, Farmingdale NY, USA
Kühlschrank 4-8 °C	Liebherr, Biberach, DE
Magnetischer Ständer (MACS® separator)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Magnetrührer COMBIMAG NEO	IKA, Staufen, DE
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach, DE
Membran-Vakuumpumpe MZ2C/1,7	Vakuubrand, Wertheim, DE
Mikroskop Axioplan 2 Imaging	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg, DE
Mikroskop Labowert	Leica, Wetzlar, DE
Mikrotom HM 350 SV	Microm, Walldorf, DE
Mikrowelle NN3256	Panasonic, Hamburg, DE
Mini-Transilluminator	BioRad, München, DE
Orbitalschwenker Polymax 2040	Heidolph, Schwabach, DE
Paraffingießstation EG1160	Leica, Wetzlar, DE
PCR Cycler PTC-200	MJ Research / BioRad, München, DE
pH-Meter SevenEasy	Mettler Toledo, Gießen, DE
Pipetten 10, 20, 200, 1000 µl	Gilson, Bad Camberg, DE
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, DE
Real-Time PCR 7500 Fast System	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Real-Time PCR 7900 HT	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Reinstwassersystem Milli-Q® Academic	Millipore, Schwalbach, DE
Schwenker GFL3015	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE

Gerät	Hersteller
Schwenker Mini Rocker MR1	Peqlab, Erlangen, DE
Spektrophotometer DU® 800	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	Peqlab, Erlangen, DE
Sterile Werkbank KR1250	Kojair Tech Oy, Nideggen, DE
Sterile Werkbank HERA safe KS12	Thermo Electron Corp., Langenselbold, DE
Sterile Werkbank HERA safe KS18	Thermo Electron Corp., Langenselbold, DE
Stromversorgungsgerät EPS 2A 200	Hoefler, San Francisco CA, USA
Stromversorgungsgerät Power Pac 300	BioRad, München, DE
Stromversorgungsgerät Power Pac 3000	BioRad, München, DE
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr, Biberach
Tierohrknipser	Fischer Scientific, Schwerte, DE
Vakuum Gewebeinfiltrationsaut. ASP 3000	Leica, Wetzlar, DE
Vortexer Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage PE360	Mettler Toledo, Gießen, DE
Waage PM460	Mettler Toledo, Gießen, DE
Waage PB3001	Mettler Toledo, Gießen, DE
Wasserbad	Technicon Instruments, Tarrytown NY, USA
Wasserbad GFL1003	Ges. für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Zentrifuge Omnifuge 2.0RS	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Zentrifuge Rotana 96	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE

II.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, DE
2-Propanol	Merck, Darmstadt, DE
Agarose RNase-frei (RNA-Gele)	Sigma-Aldrich, München, DE
Agarose SeaKem® LE (DNA-Gele)	Lonza, Köln, DE
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, DE
BSA	Sigma-Aldrich, München, DE
Chlorophorm	Merck, Darmstadt, DE
Citrat Plus Puffer	DCS, Hamburg, DE
DRAQ5™	Biostatus, Shepshed, Großbritannien
EDTA	Sigma-Aldrich, München, DE
EGTA	Sigma-Aldrich, München, DE
Eosin Y solution	Sigma-Aldrich, München, DE
Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim, DE
Eukitt	Kindler, Freiburg, DE
Formaldehydlösung min. 37% säurefrei	Merck, Darmstadt, DE

Chemikalie	Hersteller
Glycerol	Serva, Heidelberg, DE
Glycin	Serva, Heidelberg, DE
Hepes	Serva, Heidelberg, DE
HMW-FITC dextran (2x10 ⁶ Da)	Sigma-Aldrich, München, DE
Levamisol	DakoCytomation, Glostrup, DK
Mayers Häkalaunlösung	Merck, Darmstadt, DE
Mowiol® 4-88 Reagent	Merck, Darmstadt, DE
Ottix Plus	DiaPath, Hannover, DE
Ottix Shaper	DiaPath, Hannover, DE
Paraffin Typ 3 (Automat)	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo MI, USA
Paraffin Typ 6 (Gießstation)	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo MI, USA
peqGOLD Trifast™	Peqlab, Erlangen, DE
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol, Hamburg, DE
Salzsäure 37% (HCl)	Merck, Darmstadt, DE
SDS	Serva, Heidelberg, DE
Shandon Cryomatrix™	Thermo Scientific, Langensfeld, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trizma Base (Tris)	Sigma-Aldrich, München, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, DE
Xylol	Merck, Darmstadt, DE

Alle weitere Chemikalien, die in dieser Liste nicht erwähnt wurden, wurden bei den Firmen Roche (Mannheim, DE), Flucka (Neu-Ulm, DE), Merck (Darmstadt, DE), Serva (Heidelberg, DE) und Sigma-Aldrich (München, DE) erworben.

II.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cryoröhrchen (2 ml)	Nunc / Thermo Scientific, Langensfeld, DE
FACS-Röhrchen (4 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Falcon® Röhren (15 und 50 ml)	Nunc / Thermo Scientific, Langensfeld, DE
Fast Prep-Röhrchen (Lysing Matrix D)	MP Biomedicals, Illkirch, FR
Fettstift	Immunotech, Marseille, FR
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher & Schüll, Dassel, DE
Histologiekassetten (TurbOflow™)	Microm, Walldorf, DE
MACS® Cell Separation Säule (LD Columns)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Membranfilter (0,2 µm und 0,45µm)	Sartorius, Göttingen, DE
Membranfilter (Sterivex®, 0,22 µm)	Millipore, Schwalbach, DE
Nähzeug	Ethicon, Dülmen, DE
Nylonsieb Thomapor (80 µm Ø Marschen)	Reichert Chemietechnik, Heidelberg, DE
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich, USA
PCR Gefäße (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf, DE
Pipettenspitzen	VWR, Hannover, DE
Pre-Separation Filters (30 µm Ø Marschen)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE

Material	Hersteller
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße (1,5ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Superfrost-Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Zellkulturschalen (Nunclon™ Surface)	Nunc / Thermo Scientific, Langenselbold, DE

II.5 Lösungen und Arzneimittel für Transplantationen

Arzneimittel	Hersteller
Antibiotikum für Trinkwasser (Baytril®)	Bayer, Leverkusen, DE
Augensalbe (Bepanthen®)	Bayer, Leverkusen, DE
Betisadona-Salbe	Mundipharma, Limburg, DE
Betisodona-Lösung	Mundipharma, Limburg, DE
Kochsalzlösung (0,9 % Natrium Chlorid)	Braun, Melsungen, DE
Narkose-Bestandteil (Ketamin)	Albrecht, Bern, CH
Narkose-Bestandteil (Xylazin, Rompun®)	Bayer, Leverkusen, DE
Schmerzmittel für Trinkwasser (Novalgin®)	Pfizer, Karlsruhe, DE
Subkutanes Schmerzmittel (Carprofen)	Pfizer, Karlsruhe, DE

II.6 Chemikalien für die Zellkultur

Chemikalie	Hersteller
DMEM-Pulver	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe, DE
DMSO	Calbiochem / Merck, Darmstadt, DE
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, A
Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München, DE

II.7 Kits

Kit	Hersteller
Aldefluor®-Assay	STEMCELL Technologies, Köln, DE
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ²	Applied Biosystem, Darmstadt, DE
Lineage Cell Depletion Kits	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel, Düren
peqGOLD RNA PURE solution	Peqlab, Erlangen, DE
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystem, Darmstadt, DE
RNA 6000 Nano Chip Kit	Agilent, Waldbronn, DE
Rneasy® Micro Kit	Qiagen, Hilden, DE
Rneasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Turbo DNA-free™ Kit	Ambion/Applied Biosystem, Darmstadt, DE

II.8 Enzyme

Enzyme	Hersteller
DNase I	Sigma-Aldrich, München, DE
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, München, DE
Kollagenase I (Worthington)	CellSystems, Katharinen, , DE
Kollagenase III (Worthington)	CellSystems, Katharinen, , DE
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München, DE
Taq DNA-Polymerase	5 Prime, Hamburg, DE
Trypsin (1:250) 2,5 % (w/v)	Biochrom AG, Berlin, DE

II.9 Antikörper

II.9.1 Primärantikörper

Name	Klon	Spezies	Hersteller
CD11b (MAC1)	Klon M1/70.15.1	Ratte	Millipore, Schwalbach, DE
CD24 (HSA)	Klon M1/69	Ratte	BioLegend / Biozol, Eching, DE
CD29 (Integrin β 1)	HMB β 1-1	Armenien Hamster	BioLegend / Biozol, Eching, DE
CD31 (PEACAM1)	Klon Mec 13.3	Ratte	BioLegend / Biozol, Eching, DE
CD49f (Integrin α 6)	Klon GoH3	Ratte	BioLegend / Biozol, Eching, DE
CD61 (Integrin β 3)	Klon 2C9.G2	Armenien Hamster	BioLegend / Biozol, Eching, DE
CD90.2 (Thy1)	Klon 30-H12	Ratte	BioLegend / Biozol, Eching, DE
CEACAM1 (P1)	polyklonal	Kaninchen	Produziert von C. Wagener / A. Horst
Cytokeratin 5	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge, GB
Cytokeratin 6	polyklonal	Kaninchen	Covance, München, DE
Cytokeratin 7	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg, DE
Cytokeratin 14	polyklonal	Kaninchen	Covance, München, DE
Cytokeratin 8/18	polyklonal	Meerschweinchen	Acris, Herford, DE
E-Cadherin	Klon 114420	Ratte	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt, DE
EpCAM	Klon G8.8	Ratte	BioLegend / Biozol, Eching, DE
Kollagen I	polyklonal	Kaninchen	GenTex / Biozol, Eching, DE
Kollagen IV	polyklonal	Kaninchen	Millipore, Schwalbach, DE
MMP9	polyklonal	Ziege	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt, DE
NG2	polyklonal	Kaninchen	Novus Biologicals, Cambridge, GB
R15 (anti SDS-T)	polyklonal	Kaninchen	(Deppert and Pates 1979)
Sca1 (Ly6A/E)	Klon D7	Ratte	BioLegend / Biozol, Eching, DE
Vimentin	polyklonal	Hähnchen	Acris, Herford, DE

II.9.2 Sekundäre Antikörper (für IF)

Spezies	Reaktivität	Konjugat	Pre-Adsorption	Hersteller
Ziege IgG (H+L)	anti-Maus	Alexa 488	Bo,Go,Hu,Rb,Rt	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ziege IgG (H+L)	anti-Maus	Alexa 568	Bo,Go,Hu,Rb,Rt	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Maus	Alexa 488	Bo,Ck,Go,Gp,Hs,Ho,Hu,Rb,Rt,Sh	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Maus	Alexa 555	Hu,Rb,Bo,Go,Sh,Ho,Gp,Ck,Hs	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ziege IgG (H+L)	anti-Kaninchen	Alexa 488	Bo,Go,Hu,Ms,Rt	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ziege IgG (H+L)	anti-Kaninchen	Alexa 555	Bo,Go,Hu,Ms,Rt	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Kaninchen	Alexa 488	Hu,Ms,Rt,Bo,Go,Sh,Ho,Gp,Ck,Hs	Invitrogen, Karlsruhe, DE

Spezies	Reaktivität	Konjugat	Pre-Adsorption	Hersteller
Esel IgG (H+L)	anti- Kaninchen	Alexa 555	Bo,Ck,Go,Gp,Hs,Ho,Hu,Ms,Rb,Sh	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Ziege	Alexa 488	Bo,Ck,Go,Gp,Hs,Ho,Hu,Rb,Rt,Sh	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Ziege	Alexa 555	Hu,Rb,Ms,Rt	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Ziege	Alexa 568	Hu,Rb,Ms,Rt	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ziege IgG (H+L)	anti-Ratte	Alexa 488	Hu,Ms	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ziege IgG (H+L)	anti-Ratte	Alexa 555	Hu,Ms	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Ratte	DyLight 488	Bo,Ck,Go,Gp,Hs,Ho,Hu,Rb,Rt,Sh	Dianova, Hamburg, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Ratte	DyLight 549	Bo,Ck,Go,Gp,Hs,Ho,Hu,Rb,Rt,Sh	Dianova, Hamburg, DE
Ziege IgG (H+L)	anti-Hähnchen	Alexa 488	Hu,Ms	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ziege IgG (H+L)	anti-Hähnchen	Alexa 555	Hu,Ms	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Hähnchen	DyLight 488	Bo,Ck,Go,Gp,Hs,Ho,Hu,Ms,Rb,Sh,Rt	Dianova, Hamburg, DE
Esel IgG (H+L)	anti-Hähnchen	DyLight 549	Bo,Ck,Go,Gp,Hs,Ho,Hu,Ms,Rb,Sh,Rt	Dianova, Hamburg, DE

II.9.3 Sekundäre Antikörper (für IHC)

Name	Reaktivität	Konjugat	Hersteller
Histofine Simple Stain	anti-Kaninchen	Alkalische Phosphatase	Nichirei, Amsterdam, NL

II.10 Größenstandards:

Größenstandard	Hersteller
Gene Ruler™ 100 bp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Gene Ruler™ 1 kbp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot, DE

II.11 Oligonukleotide

II.11.1 Oligonukleotide für standard PCR

Name	Sequenz	Richtung	Bindestelle	Tm	Amplikon	Anwendung
AC	TATGTCAGCAGAGCCTGTAGAACCAAAC	antisense	SV40-LT	65,4 °C	766 bp	Transgen-Identifizierung WAP-T
DC	GAGAAAGGTAGAAGACCCCAAG	sense	SV40-LT	57,0 °C		
Actin-N	CGAGCAGGAGATGGCCACTGC	sense	Actin	68,4°C	507 bp	Positivkontrolle standard PCR
Actin-H	GTGAGCTCTCTGGGTGCTGGG	antisense	Actin	35,4°C		
2T5	GGGAAGTCGCAAAGTTGTGAGTT	sense	Tie2-Promotor	62,5°C	100 bp	Transgen-Identifizierung CEACAM ^{endo+}
46N1	CTTCATGGTGATTTTGG	antisense	Ceacam1 (N-Term.)	48,2°C		
PN5	CTGCCCTGGCGCTTGGA	sense	Ceacam1	68,8°C	250 bp	Transgen-Identifizierung CEACAM-/-
PN8	TACATGAAATCGCACAGTCGC	antisense	Ceacam1	60,6°C		
neofwd	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	sense	neo ^r	64,7°C	550 bp	Transgen-Identifizierung CEACAM-/-
neorev	GCCGCCAAGCTCTTCAGCAA	antisense	neo ^r	66,8°C		

II.11.2 Oligonukleotide für qRT-PCR

Name	Spezie	Sequenz	Orient.	Bindestelle	Tm	Amplikon
Krt5-Q1	Maus	AAGCGTACCACGGCTGAGAA	sense	Exon 3 (Pos. 853)	61,7°C	81 bp
Krt5-Q2	Maus	CTCCAGCTCCACCTTGTTCA	antisense	Exon 4 (Pos. 933)	59,8°C	
Krt6-Q1	Maus	ATCCAGAGGCTGAGATCTGA	sense	Exon 6 (Pos. 1186)	55,4°C	192 bp
Krt6-Q2	Maus	GAGTTCCTGGTACTCCTTCA	antisense	Exon 7 (Pos. 1377)	52,7°C	
Krt14-Q1	Maus	CAGAGCGGCAAGAGTGAGAT	sense	Exon 5 (Pos. 1046)	59,1°C	163 bp
Krt14-Q2	Maus	TGCCGATCATCTCTGGATCT	antisense	Exon 6 (Pos. 1208)	62,8°C	
Krt18-Q1	Maus	AGTCTGTGGAGAGCGACATC	sense	Exon 3 (Pos. 569)	56,3°C	174 bp
Krt18-Q2	Maus	TCAATCCAGAGCTGGCAATC	antisense	Exon 4 (Pos. 742)	59,7°C	
Aldh1a1-Q3	Maus	TCTTGCCGCTCACTGAATTG	sense	Exon 1 (Pos. 64)	60,9°C	76 bp
Aldh1a1-Q4	Maus	CCACTGGCCGACTTGAAGAT	antisense	Exon 2 (Pos. 139)	61,0°C	
Aldh1A2 -Q1a	Maus	AGAAGGATGGATGCGTCTGA	sense	Exon 3 (Pos. 286)	59,2°C	122 bp
Aldh1A2 -Q2a	Maus	GCTTGCAAGGAATGGCTTACC	antisense	Exon 4 (Pos. 407)	60,6°C	
Aldh1A3-Q1a	Maus	GTGAGGTGGAAGAAGGAGAT	sense	Exon 2 (Pos. 247)	54,1°C	140 bp
Aldh1A3-Q2a	Maus	TACAAGGTCAGCCAGCTGAT	antisense	Exon 3 (Pos. 386)	56,9°C	
Aldh1a7-Q1	Maus	GAATGGCATGATTCGGTGAG	sense	Exon 2 (Pos. 126)	59,9°C	130 bp
Aldh1a7-Q2	Maus	AAGCCTGTCTTGCGGCCTTC	antisense	Exon 3 (Pos. 255)	64,7°C	
Aldh111-Q3	Maus	CGGCATGGCTCCATCATCTA	sense	Exon 3 (Pos. 441)	62,8°C	137 bp
Aldh111-Q4	Maus	CCAGTGTCCAGACCGTCATC	antisense	Exon 4 (Pos. 577)	60,0°C	
Aldh112-Q3	Maus	CGCTCGCTCCTCTACATCAT	sense	Exon 1+2 (Pos. 31)	59,0°C	106 bp
Aldh112-Q4	Maus	GGCCAATAAGTGCCAACCTTC	antisense	Exon 3 (Pos. 136)	58,1°C	
Aldh2-Q3	Maus	GAGGTCTTCTGCAACCAGAT	sense	Exon 1 (Pos. 446)	55,3°C	148 bp
Aldh2-Q4	Maus	CCTTCACTGCCTTGTCTACG	antisense	Exon 2 (Pos. 593)	57,0°C	
Aldh3a2-Q1	Maus	ATGGTGCAAGAGCGCGAGAA	sense	Exon 1 (Pos. 218)	65,1°C	154 bp
Aldh3a2-Q2	Maus	CCGGTCTCGCAGAAGCCAAT	antisense	Exon 2 (Pos. 371)	65,5°C	
Aldh3B1-Q1a	Maus	CGGTCTTGGATGAAGGATGA	sense	Exon 3 (Pos. 257)	59,4°C	72 bp
Aldh3B1-Q2a	Maus	CTTCCGGATGAAGGCTGAGT	antisense	Exon 4 (Pos. 328)	60,2°C	
Aldh3b2-Q1	Maus	TGGTGC GTTCCAACATCTGA	sense	Exon 8 (Pos. 1255)	62,1°C	179 bp
Aldh3b2-Q2	Maus	AGACGTGCAGGAGACAGAGC	antisense	Exon 9 (Pos. 1433)	59,2°C	
Aldh4a1-Q3	Maus	TGGCCAAGTTCTGCTATGCT	sense	Exon 4 (Pos. 398)	59,4°C	127 bp
Aldh4a1-Q4	Maus	TCTGCCGCTTCAGGAAGAC	antisense	Exon 5 (Pos. 524)	63,6°C	
Aldh5a1-Q1	Maus	AATACGGCGAGCTTCTCTG	sense	Exon 2 (Pos. 460)	60,3°C	120 bp
Aldh5a1-Q2	Maus	AAGGACGACCTTGCCAAGAT	antisense	Exon 3 (Pos. 579)	59,5°C	
Aldh6a1-Q3	Maus	CCAGCCACCAATGAAGTTGT	sense	Exon 3+4 (Pos. 195)	59,4°C	70 bp
Aldh6a1-Q4	Maus	ACTCAACGGCTGCGTCCATC	antisense	Exon 4 (Pos. 264)	64,4°C	
Aldh7a1-Q1	Maus	CGACCTATTGCTCTGCTAAC	sense	Exon 4 (Pos. 216)	53,5°C	167 bp
Aldh7a1-Q2	Maus	CCGGAAGGCATCGCCAATCT	antisense	Exon 6 (Pos. 382)	67,3°C	
Aldh8A1-Q1a	Maus	GCAGTCTCTGGAGGAGTTAG	sense	Exon 2 (Pos. 284)	52,6°C	138 bp
Aldh8A1-Q2a	Maus	TCCGATACGTGGTGCAGGTT	antisense	Exon 3 (Pos. 421)	62,2°C	
Aldh9a1-Q1	Maus	GGCAGCCTCTAGGAGGACTT	sense	Exon 1 (Pos. 306)	58,5°C	256 bp
Aldh9a1-Q2	Maus	AGCAGTCGCCGCTGAGTA	antisense	Exon 2 (Pos. 561)	65,0°C	
Aldh16a1-Q3	Maus	GGATGTGGCTGAAGCCAGAA	sense	Exon 2 (Pos. 194)	62,1°C	146 bp
Aldh16a1-Q4	Maus	GCTCCAGGCCTTGAATGCTA	antisense	Exon 3 (Pos. 339)	61,2°C	
Aldh18a1-Q1	Maus	GAGACACATGCACCGCTCTG	sense	Exon 3 (Pos. 159)	61,5°C	215 bp
Aldh18a1-Q2	Maus	CAATTCTCTTGGCGTGCTTC	antisense	Exon 4 (Pos. 373)	59,4°C	
NH-GAPDH-1	Maus	GGTGAAGGTCGGTGTGAAC	sense	Exon 2 (Pos. 53)	57,3°C	238 bp
NH-GAPDH-2	Maus	GGGGTCTCGCTCCTGGAA	antisense	Exon 3 (Pos. 290)	62,1°C	
mHPRT1-Q1	Maus	GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA	sense	Exon 6 (Pos. 594)	57,9°C	131 bp
mHPRT1-Q2	Maus	AGGGCATATCCAACAACAACTT	antisense	Exon 8 (Pos. 724)	59,6°C	

Name	Spezie	Sequenz	Orient.	Bindestelle	Tm	Amplikon
SV40LTag-Q1	Maus	TCCTGGCTGTCTTCATCATC	sense	Pos. -	57,1°C	179 bp
SV40LTag-Q2	Maus	TACAGACCTGTGGCTGAGTT	antisense	Pos. -	54,2°C	
Krt7-Q1	Maus	AGATGAACCGCTCTATCCAG	sense	Pos. 960	55,4°C	203 bp
Krt7-Q2	Maus	CTCCTGGTACTCTCGAAGTTG	antisense	Pos. 1162	55,2°C	
Krt19-Q1	Maus	AGGACTTGCGCGACAAGATTC	sense	Pos. 468	62,5°C	186 bp
Krt19-Q2	Maus	TGGCCAGAGTCAGCTCATCCA	antisense	Pos. 653	65,1°C	
Epcam-Q1	Maus	GAGTCCGAAGAACCGACAAGG	sense	Pos. 823	61,9°C	113 bp
Epcam-Q2	Maus	CTGATGGTCGTAGGGGCTTTC	antisense	Pos. 935	61,7°C	
Vim-Q1	Maus	CGGCTGCGAGAGAAATTGC	sense	Pos. 671	62,8°C	124 bp
Vim-Q2	Maus	CCACTTTCGGTTCAAGGTCAAG	antisense	Pos. 794	61,7°C	
Slit3-Q1	Maus	TGCCCCACCAAGTGTACCT	sense	Pos. 159	59,8°C	151 bp
Slit3-Q2		GGCCAGCGAAGTCCATTTTG	antisense	Pos. 309	63,6°C	

II.12 Lösungen und Puffer

4% Formalin / 0,1M Phosphatepuffer

10% (v/v) Formaldehydlösung (37%),
10% (v/v) 1 M Phosphatpuffer (pH 7,3),
in MilliQ-H₂O

10X TBE

0,89 M Tris,
0,89 M Borsäure,
0,02 M EDTA (pH 8,0)

DMEM

13,38 g DMEM Pulver,
3,7 g NaHCO₃,
in 1 L Zellkulturwasser, pH 7,3 (HCl),
steril filtrieren; bei 4 °C lagern.

Ladepuffer (10x DNA-Ladepuffer)

0,1% Xylencyanol (v/v),
50% Glycerol (w/v),
0,1 M EDTA,
0,1% SDS,
in 10x TAE

Lysispuffer

100 mM Tris-HCl (pH 8,5),
5 mM EDTA,
0,2% SDS (w/v),
200 mM NaCl

MACS-Puffer

0,5% BSA (w/v),
2 mM EDTA,
in PBS (pH 7,4)

PBS

10% 10x PBT (v/v),
in MilliQ-H₂O, pH 7,4 (HCl),
autoklavieren

RNA-Ladepuffer (5X)

50% Glycerol (w/v),
0,1 g Bromphenolblau,
50% DEPC-Wasser,
Lagerung bei 4°C

TAE 50x

2 M Tris-HCl pH 8,0,
1 M Essigsäure,
50 mM EDTA

10x PBS

137 M NaCl,
27 mM KCl,
100 mM Na₂HPO₄,
18 mM KH₂PO₄,
pH 7,4 (HCl)

DEPC-Wasser

0,01% (w/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat),
in MilliQ-H₂O,
ÜN bei RT rühren; autoklavieren

Einfriermedium

10% DMSO,
90% FCS

Lens cleaning fluid (Objektivputzlösung)

50% (v/v) 2-Propanol,
50% (v/v) MilliQ-H₂O,
0,04% (v/v) Tween 20

Mowiol-Eindeckmedium (für 20 ml)

6 g Glycerol,
2,4 g Mowiol 4-88,
über Nacht bei RT rühren,
6 ml MilliQ-H₂O,
12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5),
ÜN bei RT rühren; zentrif. für 15 min bei 5000 g,
Aliquots bei -20 °C lagern

PBS-T

10% 10x PBT (v/v),
in MilliQ-H₂O,
pH 7,4 (HCl),
autoklavieren,
0,1 % Tween 20

Proteinase K Stamm-Lösung

20 mg/ml,
in MilliQ-H₂O,
Lagerung bei -20°C

Phosphatpuffer (0,2 M, für 1l Puffer)

28,42 g Na₂HPO₄ x 2H₂O,
7,76 g Na₂HPO₄ x 2H₂O,
in MilliQ-H₂O,
pH 7,3 (HCl)

III METHODEN

III.1 Züchtung und Anwendung experimenteller Methoden an Tieren

III.1.1 Zucht

Für die Tierhaltung wurden die offiziellen Regeln für Labortiere unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen angesetzt. Die Tiere wurden in einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus bei Futter und Wasser *ad libitum* im Tierstall des Heinrich-Pette-Instituts gehalten. Das Erhalten der verschiedenen Mauslinien erfolgte durch Verpaarung heterozygoter Transgentiere mit Wildtyp BALB/c Tieren. Somit konnte die Gefahr einer Akkumulation von Mutationen durch homozygote Verpaarung vermieden werden. Anzeigepflichtige Präparationen der Mäuse wurden vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Hamburg genehmigt.

III.1.2 Genotypisierung der Transgentiere

Die Genotypisierung der Transgentiere erfolgte mittels Schwanzbiopsien. Drei bis vier Wochen alte Tiere wurden durch Diethylether in eine kurze Narkose versetzt. Nach Eintreten der Narkose wurden 0,5 bis 1 cm große Schwanzbiopsien entnommen und die Wunde wurde kauterisiert. Aus den Biopsien wurde anschließend genomische DNA aufgereinigt und PCRs zum Nachweis der Transgene durchgeführt (siehe Abs. III.4.2).

III.1.3 Induktion und Beobachtung von Mammakarzinomen bei WAP-T Mäusen

Die Induktion der Mammakarzinome erfolgte durch Verpaarung von WAP-T Weibchen im Alter von 8 Wochen. Die Aktivierung des WAP Promotors erfolgte ab ca. Tag 10 der Schwangerschaft durch das Ausschütten von laktotrophen Hormonen und führte zur Expression des Transgens (frühe Region des SV40) in Epithelzellen der Brustdrüse. Die Expression von SV40 LT und st führte anschließend zur Entwicklung von intraepithelialen Neoplasien, dukatalen Karzinomen *in situ* (DCIS) und invasiven Mammakarzinomen. Induzierte Tiere wurden einmal wöchentlich abgetastet bis eine Läsion detektiert wurde. Dann erfolgte eine Messung der Tumorgöße zweimal pro Woche. Nach 4 bis 8 Monaten konnten die Tumore entnommen werden.

III.1.4 Organentnahme

Ein schlechter Allgemeinzustand, ein moribundes Stadium bzw. das Vorliegen von Tumoren mit bis zu 1,5 cm Durchmesser waren die Entscheidungskriterien für die Durchführung der Sezierung. Die Betäubung und Tötung des Versuchstiers erfolgte durch Diethylether. Sofern ein Tumor zur Gewinnung

von Primärtumorzellen vorgesehen war, wurden die nächsten Schritte unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Die getötete Maus wurde zuerst mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach Öffnung der Bauchdecke erfolgte eine makroskopische Beurteilung der Mammae und der Tumore (Staging). Die Organen wurden in folgender Reihenfolge entnommen und den entsprechenden Erkennungsnummern zugewiesen: Mammae bzw. Tumore (#1 bis #8), Milz (#10), Leber (#9) und anschließend Lunge (#11). Dabei wurden Tumorproben je nach Bedarf in drei bzw. vier Stücke geteilt. Für spätere RNA-, DNA- bzw. Proteinextraktionen wurde jeweils ein Teil in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für histologische Untersuchungen wurde ein Teil in 4% Formalin / 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (für histologische Untersuchungen) (siehe Abs. III.2.1). Ein Teil wurde in Kryomatrix eingebettet und ggf. ein Teil wurde in sterilem 37°C warmen Quantum Medium bis zur Durchführung der Zelldissoziation aufbewahrt (siehe Abs. III.3.2.1). Mammagewebe, Milz, Leber und Lunge wurden geteilt, jeweils in 4% Formalin / 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) fixiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

III.1.5 Tumorzelltransplantation

Die Methode der orthotopischen Tumorzelltransplantation wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. vet. Tiemann von der UKE-Versuchstierhaltung entwickelt. Das Transplantationsverfahren erfolgte nach intraperitonealer Ketamin/Xylazin Kombinationsnarkose (12 mg/ml Ketamin; 1,6 mg/ml Xylazin: Applikation 7 – 8 µl/g Körpergewicht). Nach Eintreten der Narkose wurde ein Schmerzmittel subkutan in die Nackenfalte verabreicht (Carprofen, 5 mg/ml: Applikation 1,2 µl/g Körpergewicht). Dann wurden die Augen vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe geschützt. Die Empfängertiere wurden an der Brustdrüse #3 (siehe Abbildung 1) sorgfältig rasiert, anschließend mit 70% Ethanol und zuletzt mit Betaisodona-Lösung desinfiziert. Die Transplantation wurde unter sterilen Bedingungen (sterile Werkbank) durchgeführt. Die narkotisierte Maus wurde zum Schutz vor Unterkühlung auf ein vorgewärmtes *Gelpad* gelegt. Auf Höhe der Brustdrüse #3 wurde ein 2-3 mm kleiner Schnitt durchgeführt. Nach vorsichtiger Trennung des darunterliegenden Mammagewebes von dem Bindegewebe wurde die Zellsuspension (20 – 30 µl) mittels Insulinspritze direkt in das leicht vorgelagerte Mammagewebe injiziert. Die Wunde wurde mit einem Hautheft verschlossen und zur Unterstützung der Wundheilung mit Betaisodona-Salbe versorgt. Um den Kreislauf des Empfängertiers zu stabilisieren, wurden nach dem Eingriff 250 µl sterile isotonische Kochsalzlösung (0,9 % Natriumchlorid, vorgewärmt) subkutan appliziert. Dies förderte ein schnelleres Erwachen und eine bessere Verträglichkeit der

Narkose. Die Transplantationsdauer betrug 5 bis 10 min. Empfängertiere blieben 30 bis 45 min unter Narkose. Zum Aufwachen aus der Narkose wurden das transplantierte Tier unter eine Wärmelampe gelegt, bis sich sein Allgemeinzustand soweit normalisiert hatte, dass die selbstständige Futter- und Wasseraufnahme gegeben war. Der Maus wurde eingeweichtes Futter angeboten, um die Aufnahme von Flüssigkeit und Nahrung zu vereinfachen. Transplantierte Tiere wurden 14 Tage mit Trinkwasser versorgt, das mit Antibiotikum (Baytril 2,5 %: 1 ml / 250 ml Wasser) und Schmerzmittel (Novalgin 500 mg/ml: 100 µl/250 ml Wasser) supplementiert war.

Transplantierte Tiere wurden zweimal wöchentlich für eine Beobachtungszeit von maximal 9 Monaten abgetastet und die Tumorgröße mithilfe einer Schieblehre gemessen.

III.1.6 Injektion von mit FITC markiertem Dextran.

Die zu injizierenden Mäuse wurden 10 Minuten vor Injektion unter eine Wärmelampe gebracht, um eine Dilatation der Schwanzvene zu verursachen. Ungefähr 15 Minuten vor Sezierung wurden den Tieren 150 bis 200 µl FITC-Dextran (HMW-FITC dextran, SIGMA, 2×10^6 Da, 50mg/ml in PBS) intravenös appliziert. Der Nachweis der Fluoreszenz erfolgte dann anhand von Schnitten der Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe (siehe Abs. III.2.1.1)

III.2 Immunhistologische Methoden

III.2.1 Anwendung immunhistologischer Methoden an Paraffinschnitten

III.2.1.1 Gewebefixierung in Formalin, Paraffin-Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Die frisch präparierten Gewebe wurden sofort in histologische Kassetten übertragen und über Nacht in 4% Formalin / 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) bei Raumtemperatur unter Schwenken fixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben in 0,1 M Phosphatpuffer umgesetzt und für weitere 4 bis 6 Stunden auf dem Schwenker gewaschen. Anschließend wurden die Proben in eine 50% Ethanol-Lösung übertragen und bei 4°C gelagert.

Die Probe wurden dann durch sequentielle Inkubationsschritte in 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Ethanol-Lösungen und Xylol entwässert und mit Paraffin infiltriert. Entwässerung und Infiltration erfolgten in einem Gewebefiltrationsautomaten (ASP300, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit folgendem Programm (Tabelle 6):

Tabelle 6: Programm „Organe 1“ zur Gewebeerwässerung und -infiltration

Schritt	Dauer
Ethanol 70 %	1 h
Ethanol 80 %	1 h
Ethanol 90 %	1 h
Ethanol 95 %	1 h
Ethanol 100 %	1 h
Ethanol 100 %	1,5 h
Xylol I	1 h
Xylol II	1 h
Paraffin Typ 3 58 °C I	1 h
Paraffin Typ 3 58 °C II	1 h
Paraffin Typ 3 58 °C III	1 h

Schließlich konnte die Gewebe in Paraffinblöcke (Paraplast X-TRA, Sherwood Medical, Sulzbach, Deutschland) mithilfe der Leica EG1160 Paraffinausgießstation (Leica, Wetzlar, Deutschland) eingebettet werden. Formalin-fixiertes Gewebe in Paraffinblöcken wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

III.2.1.2 Herstellung von Gewebeschnitten am Mikrotom

Die Paraffinblöcke wurden zuerst mithilfe einer Kühlplatte (CP60, Microm, Walldorf, Deutschland) mindestens 30 min auf -20°C vorgekühlt. Die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgte am Mikrotom (HM 325 SV, Microm, Walldorf, Deutschland) mit einer Schnittdicke von 4 µm. Die Schnitte wurden sofort im Wasserbad bei ca. 45 °C gestreckt, auf SuperFrost/Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgenommen und über Nacht bei 37 °C im Umluft-Wärmeschrank (B15, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) getrocknet. Solche Objektträger konnten entweder sofort Färbungen unterzogen werden oder bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen aufbewahrt werden.

III.2.1.3 Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitten

Für histochemische und immunhistochemische Markierungen wurden die Gewebeschnitte zuerst manuell entparaffiniert und rehydriert. Dies erfolgte durch sequentielle Inkubationsschritte in Xylol gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitten

Schritt	Dauer
Ottix Plus I	5 min
Ottix Plus II	5 min
Ottix Plus III	5 min
Ottix Plus IV	5 min
Ottix Shaper I	2 min
Ottix Shaper II	2 min
Ottix Shaper III	2 min
Ottix Shaper IV	2 min
Aqua. Dest.	2 min
Aqua. Dest.	2 min

III.2.1.4 H&E-Färbung

Für die Beobachtung der Gewebemorphologie und die Zuweisung des *Tumorgrading* wurden Hämalaun- und Eosinfärbungen (H&E-Färbung) durchgeführt. Die H&E-Färbung ist eine Standardfärbung in der Histologie und dient als Übersichtsfärbung. Hierbei werden die Zellkerne durch Hämalaun dunkelblau bis violett und das Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten durch Eosin rot markiert.

Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden für 6 min in Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt, kurz in 100 % Ethanol mit 3% HCl geschwenkt und anschließend unter fließendem Leitungswasser 4 min gebläut. Daraufhin erfolgte eine 3 minütige Inkubation in alkoholischem Eosin (Sigma Aldrich, München, Deutschland). Die Färbung wurde in entionisiertem H₂O gestoppt und die Gewebeschnitte wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe (siehe Tabelle 8) mit einer abschließenden Inkubation in Xylol entwässert und in Eukitt (Kindler, Freiburg) eingedeckelt.

Tabelle 8: Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung der Gewebeschnitte

Schritt	Dauer
Ethanol 70 %	5 min
Ethanol 80 %	5 min
Ethanol 90 %	5 min
Ethanol 100 % I	5 min
Ethanol 100 % II	5 min
Xylol I	5 min
Xylol II	5 min

III.2.1.5 Immunhistochemie für das SV40 Large T-Antigen

Die Immunhistochemie (IHC) dient der Detektion von Zielproteinen in Formaldehyd-fixierten Organen. Der Nachweis beruht auf der Affinität von Primärantikörpern zu einem bestimmten Epitop dieses Proteins. Primärantikörper werden spezifisch durch mit einem Detektionssystem gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Diese Detektionssysteme basieren auf die durch ein Enzym katalysierte Umwandlung eines farblosen Substrats in ein farbiges Endprodukt. So können schon sehr geringe Mengen an Zielproteinen verstärkt dargestellt werden.

Die Fixierung des Gewebes durch 4 prozentiges Formalin kann zu einer chemischen Veränderung der Antigene führen. Dies kann eine Maskierung der Epitope hervorrufen, so dass der Antikörper unter Umständen sein Antigen nicht erkennt (Shi, Key et al. 1991). Mit Hitze können die Epitope in vielen Fällen wieder demaskiert werden (Kim, Kook et al. 2004).

Um die Zielproteine besser für ihre Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Gewebeschnitte für 16 min in der Mikrowelle in Citrat Plus-Puffer (DCS, Hamburg) gekocht. Nach 30 minütigem Abkühlen

wurden die Schnitte dreimal 3 min mit 0,1% (v/v) Triton-X100 in TRIS-HCl Puffer (pH 7,6) gewaschen. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die einzelnen Schnittbereiche auf den Objektträgern mit einem Hydrophobstift umrandet und 20 bis 30 min luftgetrocknet. Durch eine Inkubation für 30 min mit 5% Ziegen-Normalserum in Tris-HCl Puffer konnten unspezifische Hintergrundfärbungen minimiert werden. Der anti SV40-LT Kaninchen polyklonale R15 Primärantikörper wurde 1:20000 in TRIS-HCl verdünnt und auf die Gewebeschnitte gegeben. Die Inkubation fand über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer statt. Am Folgetag wurden die Objektträger dreimal 5 min in TRIS-HCl / 0,1% Triton-X100 gewaschen. Der Zweitantikörper Histofine Simple Stain (Nichirei, Amsterdam, Niederland) wurde anschließend auf die Schnitte gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Dabei handelt es sich um ein mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Polymer, an das anti-Kaninchen Fab'-Antikörperfragmente gekoppelt sind. Nach drei Waschschritten mit TRIS-HCl / 0,1% Triton-X100 wurde Neufuchsin Plus (Dako, Hamburg) als Chromogen für die alkalische Phosphatase auf die Schnitte gegeben. Dabei wurde Levamisol als Inhibitor der endogenen alkalischen Phosphatase verwendet. Das Substratsystem erzeugt an der Stelle des Zielantigens eine rote Färbung. Nach ca. 5 min wurde die Farbreaktion in entionisiertes H₂O gestoppt. Zur Gegenfärbung wurden die Gewebeschnitte 25 sec in Mayers Hämalaunlösung (1:2 mit Aqua Dest. verdünnt) getaucht, kurz in entionisiertem H₂O gewaschen und anschließend für 2 bis 5 min in Leitungswasser gebläut. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

III.2.1.6 Aufnahmen von H&E und IHC-Färbungen

H&E und IHC Färbungen wurden mithilfe eines Axioskop 2 Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer "ProgRes C12" CCD Kamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) versehen war, aufgenommen. Dabei wurden folgende Objektive verwendet: Luft-Objektiv Plan-Neofluar 5x NA 0,15, Luft-Objektiv Plan-Apochromat 10x NA 0,45, Immersionsöl-Objektiv Plan-Neofluar 16x NA 0,5, Luft-Objektiv Plan-Apochromat 20x NA 0,75. Bildaufnahme, -verarbeitung und -export erfolgten mit der *ImageAccess* Bilddatenbank-Software (Version 5.1, Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz, <http://imagic.ch>).

III.2.2 Verwendung immunhistologischer Methoden an Kryoschnitten

III.2.2.1 Gewebefixierung in Kryomatrix und Herstellung von Kryoschnitten

Die frisch präparierten Gewebestücke wurden unmittelbar nach Präparation in einen mit Shandon Cryomatrix™ (Thermo Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland) gefüllten Behälter übertragen, mit der Matrix überdeckt und in einer Isopentan/Trockeneis-Mischung schockgefroren. Wenn Proben und Matrix durchgehend gefroren waren, wurden die so entstandenen Blöcke in 2 ml Cryoröhrchen (Thermo

Scientific, Nunc, Thermo Scientific) bei -80°C aufbewahrt. Die Herstellung von Kryoschnitten wird im Abs. III.2.2.2 beschrieben.

III.2.2.2 Herstellung von Kryoschnitten

Das Schneiden von in Kryomatrix fixierten Geweben erfolgte mithilfe eines Cryostats (CM3050, Leica, Wetzlar, Deutschland). Je nach Qualität und Natur der Gewebe wurden folgende Temperatureinstellungen verwendet (Tabelle 5):

Tabelle 9: Temperatureinstellungen des Cryostats

	Kammertemperatur	Objektkopf Temperatur
Normales Mammagewebe	-25°C	-30 bis -35°C
Tumorgewebe	-20°C	-20 bis -22°C

Je nach Bedarf wurden die Proben mit einer Schnittdicke von 8 bis 15 μm geschnitten und auf SuperFrost/Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) gebracht. Nach 30 minütiger Trocknung bei RT wurden die Schnitte entweder sofort für Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet oder in einem luftdicht versiegelten Objektträgerkasten bei -20°C aufbewahrt.

III.2.2.3 Herstellung einer 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) zur Fixierung von Kryoschnitten

20 g Paraformaldehyd-Pulver wurden in 450 ml Wasser (auf 60°C vorgewärmt) aufgenommen und unter Rühren bei 60°C gelöst. Die vollständige Lösung des PFA-Pulvers erfolgte nach Zugabe von 5 Tropfen 2 N NaOH. Die Lösung wurde dann bei Raumtemperatur langsam abgekühlt und anschließend durch Zugabe von 50 ml 10X PBS auf das Endvolumen von 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mithilfe 37%iger HCl auf 7,2 eingestellt und die Lösung über Filterpapier filtriert. Schließlich wurde die PFA-Lösung in 40 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

III.2.2.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten

Das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenzfärbung basiert auf folgendem Prinzip: das zu visualisierende Protein wird zuerst mithilfe eines für dieses Protein spezifischen Antikörpers markiert. Diese sogenannten Primärantikörper besitzen eine hohe Affinität für ein (monoklonaler Antikörper) oder mehrere (polyklonaler Antikörper) Epitop(e) des Zielproteins und bilden somit spezifische Antigen-Antikörper Interaktionen. Primärantikörper werden dann durch einen spezifischen, mit Fluorochromen versehenen Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die Visualisierung und Aufnahme des Fluoreszenzsignals erfolgt mithilfe eines Fluoreszenz- bzw. eines konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops.

Die Immunmarkierungen von frisch geschnittenem Gewebe konnte sofort durchgeführt werden. Die bei -20 °C aufbewahrten Kryoschnitte wurden zuerst in dem luftdicht versiegelten Kasten, in dem sie gelagert wurden, langsam auf Raumtemperatur akklimatisiert. Durch diese Vorkehrungen konnte die durch Kondenswasser verursachte Kristallbildung auf den Objektträgern und die daraus resultierende Zerstörung von Zellstrukturen vermieden werden.

Die einzelnen Schnittbereiche auf den Objektträgern wurden mit einem Hydrophobstift umrandet und 20 bis 30 min luftgetrocknet. Durch Zugabe von jeweils 200 µl 4% PFA-Lösung pro Schnitt und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben fixiert. Die Lösung wurde dann abgesaugt und die Schnitte mit jeweils 200 µl 1% Triton-X100 in PBS (pH 7,4) für 10 min permeabilisiert. Die Zellmembran-Permeabilisierung ist vor allem für die Detektion von intrazellulären Proteinen in intakten Zellen notwendig, da dabei ein Zugang zu den Epitopen für den Antikörper geschaffen wird. Wenn Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) verankerte Proteine (z.B. Scal und CD24) nachgewiesen werden sollten, wurde auf die Permeabilisierung verzichtet, um deren Auswaschung zu vermeiden. Nach dem Verwerfen der Permeabilisierungslösung wurden die Objektträger in eine mit PBS gefüllte Glasküvette 10 min unter Schwenken gewaschen und anschließend in einer Feuchtkammer übertragen. Es erfolgte dann ein Blockierungsschritt zur Reduktion unspezifischer Antikörperadsorptionen und somit des Hintergrundsignals. Hierfür wurden die Proben jeweils mit 100-200 µl Blocklösung (0,5% BSA in PBS, supplementiert mit 1:100 Esel- bzw. Ziegen Serum je nach Spezies des Sekundärantikörpers) für 30 min inkubiert. Die gewünschten Primärantikörper bzw. Primärantikörperkombinationen wurden mit 0,5% BSA in PBS verdünnt. Nach Absaugen der Blocklösung wurden 100 bis 200 µl des verdünnten Antikörpers auf die blockierten Gewebeschnitte pipettiert und für 120 min bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Erstantikörper-Inkubation wurden die Objektträger in eine Glasküvette überführt und dreimal 5 Minuten mit PBS / 0,1% Tween 20 (PBS-T, pH 7,4) gewaschen. Bei Detergenzempfindlichen Proteinen (z.B. Scal und CD24) wurde dieser Waschschrift mit einfachem PBS durchgeführt. Zum Schutz der an den Sekundärantikörper gekoppelten Fluorochromen wurden ab diesem Schritt alle Inkubationsschritte im Dunkeln durchgeführt. Die Sekundärantikörper wurden auf die vorgesehenen Konzentrationen mit 0,5% BSA in PBS verdünnt, 200 µl wurden jeweils auf die Proben gegeben und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift von jeweils 5 min in einer abgedunkelten, mit PBS-T bzw. PBS gefüllten Glasküvette. Die Zellkerne wurden sowohl mit 4-,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als auch mit DRAQ5™ (Biostatus, Shephed, Groß Britannien) gefärbt. Dies ermöglichte gleichzeitig die Visualisierung der Kerne bei 461 nm (DAPI) und deren 3D-Aufnahme am Konfokalmikroskop bei 681 nm

(DRAQ5™). Zuerst wurde eine DAPI Stammlösung (0,1 mg/ml) 1:1000 mit 4%igen PFA verdünnt. 200 µl dieser Verdünnung wurden auf die Gewebeschnitte gegeben und 5-10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei erfolgte durch PFA eine zusätzliche Vernetzung der Antikörper mit den Proben. Nach einem Waschschrift von 5 Minuten in PBS wurden anschließend pro Probe 100-200 µl einer 1:2000 Verdünnung von DRAQ5™ in PBS gegeben, 5-10 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend gründlich abgesaugt. Zum Schluss wurden die Proben mit Mowiol und Deckgläschen eingedeckelt. Die gefärbten Präparate wurden bei 4°C im Dunkeln bis zu einem Monat ohne Qualitätsverlust aufbewahrt. Die Visualisierung und Aufnahme des Fluoreszenzsignals erfolgte mithilfe eines Fluoreszenz- bzw. eines Konfokalmikroskops.

III.2.2.5 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung auf kultivierten G-2 Zellen

G-2 Zellen wurden auf Deckgläsern, die sich auf dem Boden einer 6-Well Platte befanden, ausgesät und bis zu einer 50-70%igen Konfluenz inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Deckgläser für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit vorgewärmten PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden die Deckgläser für 10 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS (pH 7,4) bei Raumtemperatur behandelt (800µl/Well). Dann wurde das PFA abgesaugt und die auf den Deckgläsern befindlichen, fixierten Zellen für 10 Minuten bei RT mit 1% Triton-X-100 in PBS (pH 7,4) permeabilisiert (1 ml/Well). Beim Nachweis von GPI-verankerten Proteinen (z.B. Scal) muss auf die Permeabilisierung verzichtet werden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (3 Minuten/Waschschrift). Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperadsorptionen wurden die Deckgläser mit 0,5% BSA in PBS (pH 7,4) für 30 Minuten bei RT blockiert. Die entsprechenden Primärantikörper wurde mit 0,5% BSA in PBS verdünnt und die blockierten Deckgläser anschließend in einer feuchten Atmosphäre mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen mit Parafilm beschichteten Deckel einer 6-Well Platte mit 70-100 µl des verdünnten Antikörpers für 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach Erstantikörper-Inkubation wurden die Deckgläser in eine saubere 6-Well Platte überführt und dreimal mit PBS-T (bzw. PBS für den Nachweis von GPI-verankerten Proteinen) jeweils 3 Minuten gewaschen, bevor die Inkubation des ebenfalls in 0,5% BSA in PBS verdünnten Sekundärantikörpers erfolgte (30-60 Minuten, RT, auf Parafilm, 100 µl/Deckglas). Anschließend wurden die Deckgläser erneut in eine neue 6-Well Platte überführt, dreimal mit PBS-T gewaschen und der Sekundärantikörper für 10 Minuten bei RT mit 800 µl/Well 4% PFA fixiert. Die Deckgläser wurden erneut dreimal 3 Minuten gewaschen mit PBS-T bzw. PBS und anschließend in Mowiol auf einem Objektträger eingebettet. Nach dem Absaugen des überschüssigen Mediums mit Filterpapier wurden die Deckgläser mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert und die

Präparate nach dem Aushärten mittels Fluoreszenzmikroskopie oder durch Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) analysiert (siehe Abschnitt III.2.2.6).

III.2.2.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Verglichen mit kultivierten Zellen besitzen Gewebeschnitte eine höhere intrinsische Hintergrundfluoreszenz, hauptsächlich wegen größerer Mengen an autofluoreszierender, extrazellulärer Matrix (ECM). Dadurch, dass Emissionssignale oberhalb und unterhalb der Fokusebene ebenfalls detektiert werden, ist die Auflösung der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie in der z-Ebene beschränkt und liefert somit Aufnahmen von Gewebeschnitte mit mäßiger Qualität. Die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie ermöglicht es, die Limitationen der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie zu umgehen, indem das von einer Probe emittierte Fluoreszenzsignal dreidimensional aufgenommen werden kann.

Hierfür wird der aufzunehmende Bereich der Probe mithilfe eines Lasers eingescannt. Indem das Licht des Lasers über ein Objektiv auf einer bestimmten z-Ebene der Probe fokussiert wird, werden die Fluorochrome dieses Plans erheblich stärker angeregt als die außerhalb dieses Plans. Das von dort emittierte Licht wird auf eine variable Lochblende (auch *pinhole* genannt) fokussiert und von einem hinter dem *pinhole* liegenden Detektor (*photomultiplier*) detektiert. Da der Fokuspunkt und das *pinhole* in konjugierten Ebenen liegen, also konfokal sind, kann nur Licht aus dem Fokuspunkt das *pinhole* passieren (siehe Abbildung 11). Streulicht, das ober- und unterhalb der Fokusebene emittiert wird, wird durch das konfokale *pinhole* wirksam unterdrückt.

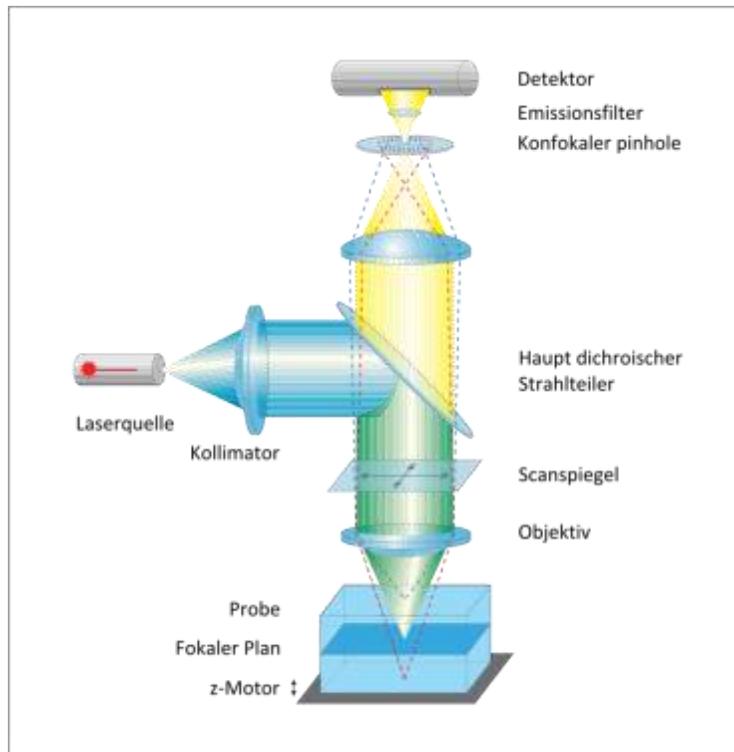


Abbildung 11: Prinzip der konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie
(www.zeiss.de)

In der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird das gesamte Sichtfeld zeitgleich angeregt und detektiert. Die LSM zeichnet sich dadurch aus, dass das Laserlicht mithilfe galvanometrischer Scanspiegel sequentiell durch die Probe (Punkt für Punkt und Linie für Linie) geführt wird. Durch das schrittweise Verschieben der Fokusebene lassen sich Stapel optischer Schnitte in der z-Ebene anfertigen. So entstehen kontrastreiche, hoch aufgelöste optische Schnitte, die anschließend zu einem dreidimensionalen (3D) Bildstapel zusammengesetzt und digital verarbeitet werden können. Durch die Verwendung von Anregungslasern mit verschiedenen Wellenlängen, können gleichzeitig 3D-Aufnahmen von verschiedenen Fluorochrome anhand einer einzelnen Probe erfolgen. Durch eine spätere Überlagerung der Einzelfluoreszenzen lässt sich bei entsprechender Farbdarstellung eine Co-Lokalisation der Fluoreszenzfarbstoffe oder der mit ihnen markierten Proteine nachweisen.

Die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie erfolgte mithilfe des LSM 510 META (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das auf einem Axiovert 200M Mikroskop basiert. Das System war mit folgenden Lasern ausgestattet: Ar-Laser (458 nm, 488 nm, 514 nm, 25 mW), HeNe-Laser (543 nm, 1 mW) und HeNe-Laser (633 nm, 5 mW). Für die verschiedenen Aufnahmen wurden folgende Objektive angewendet: Immersionsöl-Objektiv Plan-Neofluar Ph3 63x NA 1,4, Immersionsöl-Objektiv Plan-Neofluar Ph3 40x NA 1,3, Luft-Objektiv Plan-Neofluar Ph1 10x NA 0,3.

III.2.2.7 Verarbeitung und Auswertung von LSM-Aufnahmen

Dekonvolution

Wenn eine besonders hohe Qualität benötigt war, wurden die rohen LSM-Aufnahmen mithilfe der Huygens Essential Software (Version 2.7.2p0, Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, NL; <http://www.svi.nl>) dekonvolviert.

3D-Rekonstruktion

Für die Darstellung und die 3D-Rekonstruktion der LSM-Aufnahmen wurden die rohen bzw. dekonvolvierten Bilddaten mithilfe des Imaris Software Pakets (Version 5.0.1, Bitplane AG, Switzerland; <http://www.bitplane.com>) bearbeitet. Dabei wurden Tonwertkorrektur, Schwellenwertanpassung, Gammakorrektur und Glättung durchgeführt. Anschließend wurde das „Easy 3D“ Modul für die Darstellung der 3D-Rekonstruktion angewendet.

Co-Lokalisationsanalysen

Die Co-Lokalisationsanalysen erfolgten mit dem Imaris Coloc Modul. Beiden Fluoreszenzkanälen wurde ein der Hintergrundfluoreszenz entsprechender Schwellenwert zugewiesen. Für die Darstellung wurden Co-Lokalisationsergebnisse als separate Kanäle abgespeichert und ins 3D-Bild integriert.

III.3 Versuche mit eukaryotischen Zellen

Alle Arbeitsschritte der Versuche mit Zellkultur- und Primärzellen wurden unter sterilen Bedingungen auf einer Sterilbank (Heraeus, HERA safe) durchgeführt. Für die Beobachtung der Vitalität, Morphologie und Konfluenz sowie die Bestimmung von Zellzahlen wurden ein IMT-2 Mikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) bzw. ein Leitz Labowert Mikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland) angewendet.

III.3.1 Zellkulturmethoden

III.3.1.1 Passagieren von G-2 Zellen

G-2 Zellen wurden unter adhärennten Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit einem Zusatz von 10% FCS (fötale Kälberserum) gehalten. Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Kontakt mit den Zellen auf 37°C erwärmt. Wenn die Zellen 70% bis 80% Konfluenz erreicht hatten (nach ca. 3 Tagen), wurden sie von den Kulturschalen mithilfe der Protease Trypsin (2% w/v, Biochrom AG, Berlin) gelöst und umgesetzt. Dazu wurden zuerst die Zellen mit PBS gewaschen, für eine Minute mit Trypsin / EDTA bei Raumtemperatur inkubiert, die Trypsin-Lösung wurde abgesaugt und die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert. EDTA entzieht den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen, so dass die Kontakte gelockert werden. Durch Zugabe von mit 10% FCS supplementierten DMEM Kulturmedium wurde die Enzymreaktion gestoppt. Für die Erhaltung der Zelllinie, wurden G-2 Zellen 1:3 bis 1:5 in frischem DMEM / 10% FCS

verdünnt und in neue Kulturschalen (Nunclon™, Nunc / Thermo Scientific GmbH, Langensfeld, Deutschland) ausgesät.

Zu Kryokonservierungs- und Analysezwecken wurde die Zellzahl ggf. in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

III.3.1.2 Kryokonservierung von G-2 Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung von Zellen können diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden. Dazu wurden die Zellen in eiskaltem Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO (v/v)) aufgenommen (ca. 1×10^6 Zellen/ml). Anschließend wurden die Zellen in speziellen 2 ml Kryoröhrchen (Nunc / Thermo Scientific GmbH, Langensfeld, Deutschland) von Raumtemperatur auf -80°C mithilfe eines Einfrierbox Cryo-Safe™ (Neolab, Heidelberg, Deutschland) heruntergekühlt und in den Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen kurz im 37°C Wasserbad erwärmt, bis das Einfriermedium mit den Zellen fast vollständig aufgetaut war. Die Zellsuspensionen wurden jeweils in 15 ml Röhrchen (Falcon®, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) übertragen, in 10 ml vorgewärmtem DMEM / 10% FCS aufgenommen und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnten die Zellpellets schließlich mit jeweils 10 ml vorgewärmtem DMEM / 10% FCS resuspendiert und in neue Zellkulturschalen übertragen werden.

III.3.2 Methoden für Primärzellen

III.3.2.1 Dissoziation von Primärtumorzellen aus WAP-T Tumoren

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Kontakt mit den Zellen auf 37°C erwärmt und alle Gegenstände waren steril. Um die Quantität und Qualität der zu transplantierenden Primärtumorzellen kontrollieren zu können, sollten Tumorzellen aus WAP-T Spendertieren zuerst dissoziiert werden. Dazu wurden Tumore unmittelbar nach dem Sezieren verarbeitet. Die sezieren Tumorstücke im Quantum-Medium (siehe Abs. III.1.4) wurden in sterile Glaspetrischalen übertragen und der Überschuss an Medium wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt. Mithilfe von zwei Skalpellern wurden dann die Tumore in $< 1\text{mm}$ große Stücke zerkleinert. Dabei wurde darauf geachtet, dass für die Zellen tödliche Scherkräfte vermieden wurden. Zerkleinerte Tumore wurden anschließend in 5 ml vorgewärmtem Quantum-Medium resuspendiert und in das 15 ml Röhrchen gegeben. Nach Zentrifugation von 5 min bei 300 g und Raumtemperatur wurden die Zellpellets einmal mit 5 ml vorgewärmten Quantum-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min / 300 g / Raumtemperatur). Schließlich wurden die Zellen in 5 ml Kollagenase-Lösung (200 U/ml Kollagenase III, 100 U/ml Hyaluronidase in Quantum-Medium) resuspendiert und 2 bis 4 Stunden unter Schwenken bei 37°C inkubiert.

Der Kollagenase-Verdau ermöglicht es, die Mehrheit der extrazellulären Matrix (ECM) zu lösen und dadurch die Dissoziation der Tumorzellen zu erleichtern. Das Sterben vieler Zellen durch das Zerkleinern und die lange Inkubationsschritte ist nicht zu vermeiden. Eine große Menge genomischer DNA wird dabei freigesetzt, haftet an den vereinzelt Zellen der Suspension und bildet somit Aggregate. Durch Zugabe von 100 µl DNaseI (5000 U/ml in PBS) und eine weitere Inkubation von 15 min bei 37°C unter Schütteln konnten diese Aggregate erfolgreich gelöst werden. Um die letzten Zellverbände zu lösen, wurde ein kurzer Trypsin-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zuerst 5 min bei 300 g und Raumtemperatur pelletiert, in 5 ml vorgewärmtem 2% Trypsin resuspendiert und 5 min bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min / 300 g / Raumtemperatur), in 5 ml vorgewärmtem MACS-Puffer (0,5% BSA w/v, 2 mM EDTA in PBS) resuspendiert und sequentiell durch Zellsiebe mit 150 µm (Edelstahlsieb), 80 µm (Thomapor, Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 30 µm (Pre-Separation Filters, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) große Maschen filtriert. Dadurch konnten die letzten Zellaggregate und ECM-Reste entfernt und eine aus Einzeltumorzellen bestehende Suspension gewonnen werden.

Schließlich wurde die Zellkonzentration der Suspension mit Neubauer-Zählkammer bestimmt, die Zellen wurden zentrifugiert (5 min / 300 g / Raumtemperatur) und in dem für den nächsten Schritt passenden Puffer resuspendiert.

III.3.2.2 Entfernung reifer Blutzellen aus Primärtumorzellsuspension: *Lineage Cell Depletion*

Die Entfernung von reifen hämatopoetischen Zellen (*Lineage* positive Zellen, Lin⁺) wie z.B. T-Zellen, B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, Erythrozyten und deren kommittierten Vorläufer aus der Primärtumorzellsuspension wurde durch Anwendung des *Lineage Cell Depletion* Kits der Firma Miltenyi Biotec nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Das Verfahren basiert auf die Markierung des zu depletierenden Zelltyps mit Primärantikörpern, die spezifisch für Oberflächenmarker dieser Zellen (CD5, CD45R, CD11b, Ly-6G/C, 7-4 und Ter-119) und mit Biotin gekoppelt sind. Magnetische Anti-Biotin *MicroBeads* dienen der sekundären Markierung der Primärantikörper. Unter Anwendung eines starken magnetischen Feldes werden anschließend die markierten Lin⁺-Zellen in einer Säule (MACS[®]-Column kombiniert mit MACS[®]-Separator) zurückgehalten. *Lineage*-negativen (Lin⁻) Zellen wandern ungehindert durch die Säule durch und können schließlich eingesammelt werden.

Die Vorgehensweise wird für 10⁷ Zellen kurz zusammengefasst: zunächst wurden dissoziierte Primärtumorzellen in 40 µl eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Antikörpercocktail und Mischen durch sanftes Schnipsen wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert.

Dann wurden 30 µl eiskalter MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin MicroBeads zugegeben. Erneut wurde die Zellsuspension durch sanftes Schnipsen gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml eiskaltem MACS-Puffer gewaschen, pelletiert (5 min / 300 g / 4°C), in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die magnetische Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 1 ml eiskaltem MACS-Puffer gewaschen. Eluierte Lin⁻ Zellen wurden schließlich gesammelt und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

III.3.3 Methoden der Durchflusszytometrie

III.3.3.1 Markierung von Tumorstamm- und Tumorprogenitorzellen mittels des Aldefluor[®]-Assays

Das Prinzip der Detektion von Stamm- und Progenitorzellen sowie von Tumorstamm- und Tumorprogenitorzellen durch den Aldefluor[®]-Assay der Firma Aldagen basiert auf der gesteigerten Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (Aldh) in diesen Zelltypen (siehe Abs. I.4.4). In diesem Assay wird ein ungeladenes, fluoreszierendes Substrat (BODIPY-Aminoacetaldehyde, BAAA) durch die Aldh in ein geladenes Produkt (BODIPY-Aminoacetate, BAA) umgewandelt. Im geladenen Zustand verliert das Produkt die Fähigkeit, durch die Plasmamembran zu diffundieren, akkumuliert somit in Zellen mit hoher Aldh-Aktivität und erhöht dementsprechend deren Fluoreszenz (fluoreszierende bzw. nicht fluoreszierende Zellen werden jeweils als Aldh^{br} und Aldh^{low} bezeichnet).

Trypsinierte G-2 Zellen einer laufenden Kultur (siehe Abs. III.3.1.1) bzw. frisch dissoziierte Lin⁻ WAP-T Primärtumorzellen (siehe Abs. III.3.2.1 und III.3.2.2) wurden in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml im vorgewärmten Aldefluor[®]-Puffer aufgenommen. 5 µl Aldefluor[®]-Reagenz pro 10⁶ Zellen wurden hinzugegeben und anschließend vorsichtig gemischt. 500 µl dieser Zellsuspension wurden in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, in dem 5 µl DEAB (Diethylaminobenzaldehyd) vorgelegt wurden. Da DEAB ein spezifischer Inhibitor der Aldh ist, dient dieser Ansatz als Negativkontrolle der Aldefluor[®]-Reaktion. Nach einer Inkubation für 30 bis 60 Minuten bei 37°C unter Schwenken im Dunkeln wurden die Zellen der Negativkontrolle und der Probe durch Zentrifugation bei 4°C und 300 g für 5 min pelletiert und in jeweils 500 µl eiskaltem Aldefluor-Puffer resuspendiert. Schließlich konnten die Aldh^{br} / Aldh^{low} Zellen durch durchflusszytometrische Verfahren analysiert und ggf. voneinander getrennt werden (siehe Abs. III.3.3.3).

III.3.3.2 Antikörpermarkierung von Zellen für durchflusszytometrische Analysen

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die zu färbenden G-2 Zellen bzw. Primärtumorzellen wurden in eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert (100 µl/10⁶ Zellen). Mit

Fluorochromen gekoppelte Primärantikörper wurden in entsprechenden gewünschten Konzentrationen zu den Zellsuspensionen gegeben und für 20 bis 30 min inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen, durch Zentrifugation unter 300 g für 5 Minuten und 4°C pelletiert und anschließend in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellpopulationen konnten direkt durchflusszytometrisch analysiert und ggf. voneinander getrennt werden.

III.3.3.3 Durchflusszytometrische Analyse und Trennung von Zellen

Die Durchflusszytometrie mittels eines *fluorescence-activated cell sorters* (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand von spezifischen Oberflächenantigenen oder Fluoreszenzemissionen intrazellulärer Farbstoffe zu quantifizieren, zu unterscheiden und entsprechen dieser Eigenschaften voneinander zu trennen.

Die zu analysierenden Zellen werden mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern bzw. mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Aldefluor®) markiert und mittels eines laminaren Flüssigkeitsstroms einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Aufgrund von charakteristischen Zelleigenschaften wie Größe, Form und Granularität kommt es zu für diese Eigenschaften spezifische Lichtstreuung. Diese Streuung wird von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht, engl. *forward scatter*, FSC) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht, engl. *sideward scatter*, SSC) Linse gesammelt und photometrisch detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Anhand dieser Kriterien wird eine gewünschte Zellpopulation definiert, ausgewählt und anschließend weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Hierfür werden die für die Zellmarkierung eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe durch weitere Laserstrahlen angeregt. Die dadurch entstehenden Emissionen spezifischer Wellenlängen werden mittels einer Linse gesammelt, durch Filter nach Wellenlängen getrennt und schließlich mithilfe unterschiedlicher Detektoren aufgenommen. Auf diese Weise ist es möglich, die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei Mehrfarbenanalyse getrennt aufzunehmen und quantitativ auszuwerten. Aufgenommene Fluoreszenzsignale sind hierbei proportional zur Menge an Oberflächenmarkern bzw. an verstoffwechselten, fluoreszierenden Farbstoffen pro Zelle. Aufgrund von Überschneidungen der Spektren verschiedener Farbstoffe gelingt die Auftrennung der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter nicht vollständig. Durch Kompensationsalgorithmen lassen sich diese Überschneidungen elektronisch korrigieren. Für die Einstellung der Kompensation werden bestimmte Kontrollproben, ohne und mit jeweils einer einzelnen fluoreszierenden Markierung (Antikörper bzw. Farbstoff), benötigt. Strahlt dabei ein bestimmtes

Fluorochrom in andere Kanäle hinein, kann dieser Anteil von dem jeweiligen Fluoreszenzsignal über den Algorithmus abgezogen werden.

Durchflusszytometrische Analysen erfolgten mithilfe des BD FACS-Canto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), das mit 2 Laser (488 nm (blau) *Solid State* Laser und 635 nm (rot) HeNe Laser) für die Detektion von bis zu 6 Fluoreszenzen sowie Größe und Granularität versehen war.

Die Trennungen unterschiedlicher Zellpopulationen wurden mithilfe eines BD FACS-Aria (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), das mit 2 Laser (488 nm (blau) *Solid State* Laser und 635 nm (rot) HeNe Laser) für die Detektion von bis zu 7 Fluoreszenzen sowie Größe und Granularität versehen war, durchgeführt. Gesortete Zellen wurden in sterilen 5 ml FACS-Röhrchen, die mit 1 ml vorgewärmten DMEM / 10% FCS gefüllt waren, aufgenommen.

Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen und des Sortens erfolgten mithilfe des FACS-Diva Softwares (Version 6.1.3, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

III.4 Molekularbiologische Methoden

III.4.1 Aufreinigung muriner genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Schwanzbiopsien jüngerer Tiere (bis zu 12 Wochen alt) wurden über Nacht in 500 µl Lysispuffer und 50 µg Proteinase K bei 56°C im Thermomixer proteolytisch abgebaut. Nachdem die verbliebenen Gewebetrümmer und Haare für 5 min bei 13000 rpm und RT sedimentiert wurden, erfolgte die Präzipitation der DNA durch gründliches Invertieren des Überstands mit 1 Volumen Iso-Propanol. Nach Pelletieren der DNA (10 min, 13000 rpm, RT), Waschen in 70% EtOH und erneutem Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm, RT), wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet bei RT getrocknet und in Wasser gelöst.

Bei Schwanzbiopsien älterer Tiere wurde die genomische DNA unter Verwendung des NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben isoliert. Etwa 100 ng (entsprechen ca. 1-2 µl) der hierbei isolierten DNA wurden für die nachfolgenden PCR-Analysen zur Identifizierung transgener Tiere (siehe III.4.3) eingesetzt.

III.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die in vitro Amplifizierung von kurzen und spezifischen DNA-Sequenzen (Saiki, Scharf et al. 1985; Mullis and Faloona 1987). Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der komplementären Bindung zweier Oligonukleotidprimer an den Flanken der zu amplifizierenden

DNA. Die Verwendung einer thermostabilen Polymerase ermöglicht die zyklische Denaturierung von DNA durch Erhitzen und die anschließende Verlängerung der Oligonukleotidprimer. Dadurch, dass die Primer jeweils auf dem sense- und antisense-Strang binden und verlängert werden, entstehen komplementäre Stränge, die dann als Matrix für den folgenden Elongationszyklus dienen können. Das PCR-Verfahren lässt sich in drei Schritte unterteilen, die 25-40 Mal wiederholt werden. Im ersten Schritt wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang bei hohen Temperaturen von ca. 95°C denaturiert, so dass zwei Einzelstränge vorliegen. Durch Abkühlen auf 40-70°C wird die Hybridisierung (annealing) der Oligonukleotidprimer mit der komplementären DNA-Zielsequenz ermöglicht. Die Oligonukleotidprimer werden im großen Überschuss (um den Faktor 10^6 gegenüber der Zielsequenz) eingesetzt. Temperatur und Dauer des Hybridisierungsschritts ist u.a. von der Sequenz der Primer abhängig. Anschließend erfolgt eine Elongationsphase, in der die thermostabile DNA-Polymerase ausgehend von dem 3'-terminalen Ende dieser Oligonukleotidprimer bei 72°C in 5' → 3'-Richtung den komplementären DNA-Gegenstrang synthetisiert (Chien, Edgar et al. 1976). Durch Wiederholung dieses Amplifizierungszyklus wächst die Zahl der PCR-Amplifikate exponentiell mit der Zykluszahl. Mit einer Effizienz von 100% verdoppelt sich die Anzahl der Amplikons mit jedem Zyklus. Somit ergibt sich nach 20 PCR-Zyklen eine theoretische Anreicherung um den Faktor $2^{20} \geq 10^6$. Meist wird aber nur eine Ausbeute von ca. 85 % erreicht.

PCR-Primer werden synthetisch hergestellt. Sie leiten sich aus den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz ab. Die Oligonukleotidprimer haben eine mittlere Länge von 20 bis 30 Nukleotiden. Bei der Festlegung der Oligonukleotidprimer wurde darauf geachtet, dass zwei parallel verwendete Primer eine ähnliche Hybridisierungstemperatur besitzen. Zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur werden von der Schmelztemperatur 5°C abgezogen. Die Konsensus-Sequenz der Primer bestimmt schließlich die Schmelztemperatur, welche sich, unter Berücksichtigung der Wasserstoffbrückenbindungen, nach folgender Formel errechnen lässt (Wu, Ugozzoli et al. 1991):

$$\Sigma(2 \times A + 2 \times T + 4 \times G + 4 \times C) \text{ °C} = T_m \text{ in °C}$$

In der vorliegenden Arbeit wurden PCRs für die Identifizierung transgener Tiere (siehe Abs. III.4.3) und quantitative PCRs (siehe Abs. III.4.10) für die Bestimmung der Expression von Aldh-Isotypen und von Cytokeratinen durchgeführt.

III.4.3 Identifizierung transgener WAP-T Tiere mittels PCR

Für die Identifizierung der transgenen WAP-T Tiere wurden ca. 100 ng der genomischen DNA in einer PCR eingesetzt. Die Identifizierung der SV40-LT und CEACAM1^{endo+} Transgene erfolgte zusammen mit interner Aktin-Kontrolle (Tabelle 10). Die Identifizierung des CEACAM1^{KO}-Genotyps erfolgte mit einer

internen Kontrolle für den ersten CEACAM1-Exon (Tabelle 10). Alle PCRs wurden in einem Thermocycler (PTC-200, MJ Research / BioRad, München, Deutschland) mit den in der

Tabelle 11 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der PCR Ansätze für die Identifizierung der SV40-LT und CEACAM1^{endo+} Transgene sowie des CEACAM1^{KO} Genotyps

Komponenten	SV40-LT PCR	CEACAM1 ^{Endo+} PCR	CEACAM1 ^{KO} PCR	Volumen	Endkonzentrationen
10x Reaktionspuffer				2,5 µl	1x
dNTPs (2 mM)				2,5 µl	200 µM
Primer (10 µM)	AC	2T5	PN8	0,5 µl	200 nM
Primer (10 µM)	DC	46N1	PN5	0,5 µl	200 nM
Primer (10 µM)	Aktin-N	Aktin-N	NeoForward	0,5 µl	200 nM
Primer (10 µM)	Aktin-R	Aktin-R	NeoDown	0,5 µl	200 nM
DNA (ca. 100 ng/µl)				1 µl	ca. 4 ng/µl
Autoklaviertes H ₂ O				16,7 µl	-
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)				0,3 µl	0,06 U/µl
Endvolumen				25 µl	-

Tabelle 11: PCR-Programm für die Detektion der Transgene und des *Knockouts*

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 s	35 Zyklen
Primerhybridisierung	60°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min	
Termination	72°C	5 min	
Ende des Programms	4°C	∞	

Die berechnete PCR-Amplikongröße werden im Abs. II.11.1 angegeben.

III.4.4 Gelelektrophoretische Auftrennung

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der analytischen Auftrennung von PCR-Amplifizierungsprodukten und der Qualitätsbestimmung von RNA-Proben. Die Produkte wurden auf einem mit 10 µg / 100 ml Ethidiumbromid versetzten 1% Agarose-Gel aufgetragen. Die Auftrennung von DNA oder RNA erfolgte in horizontale Elektrophoreseapparaturen (Horizon 11.14, Whatman Inc., Dassel, Deutschland bzw. 40-0911, Peqlab, Erlangen, Deutschland) bei konstanter Spannung unter 120 V für 30 bis 60 min in 1x TAE- (für DNA) oder 0,5x TBE-Puffer (für RNA). Für die RNA-Gelelektrophorese wurden ausschließlich RNase-freie Apparate und Puffer verwendet. Die zu untersuchenden Nukleinsäure-Proben wurden mit

6x Probenpuffer gemischt und in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Nukleinsäuren wurden mithilfe eines UV-Transilluminators (BioRad, München, Deutschland) sichtbar gemacht und mit einer Geldokumentationsanlage (BioDocAnalyse, Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland) aufgenommen. Zur Größenbestimmung wurde ein DNA-Größenstandard parallel mit aufgetragen.

III.4.5 RNA-Isolierung aus Proben mit geringer Zellenzahl

Aufgrund nur geringer Mengen an Probenmaterial im Bereich weniger Mikrogramm wurde für die RNA-Isolierung aus Zellkulturen und durchflusszytometrisch-isolierten Zellen das RNeasy® Mini Kit (für Zellzahlen zwischen 5×10^5 und 5×10^6 Zellen) und das RNeasy® Micro Kit (für bis zu 5×10^5 Zellen) der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Dieses für geringe Probenmengen entwickelte Kit ermöglicht die Isolierung von Gesamt-RNA aus bereits einer einzelnen Zelle. Die Isolierung von Total-RNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und 1 µg RNA in einem Volumen von 10 µl für die anschließende cDNA-Synthese eingesetzt (siehe Abs. III.4.8).

III.4.6 RNA-Isolierung aus eingefrorenem Gewebe

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus in N₂ eingefrorenem Gewebe (siehe Abs. III.1.4) wurde mithilfe des PeqGOLD TRIFAST®-Reagenz der Firma Peqlab (Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden jeweils 50 mg Gewebe gewogen und in RNase-freien Reaktionsgefäßen mit Lysismatrix D (MP Biomedicals, Illkirch, France) übertragen. Nach Zugabe von 1 ml PeqGOLD TRIFAST® wurden die Proben im FastPrep®-120 Homogenisator (MP Biomedicals, Illkirch, France) dreimal 15 s bei Stufe 5,5 aufgeschlossen. Es erfolgte dann ein Inkubationsschritt für 10 min bei Raumtemperatur. Die Gewebelysate wurden anschließend in autoklavierte 1,5 ml Reaktionsgefäßen überführt und 200 µl Chloroform zugegeben. Nach kräftigem Vortexen erfolgte erneut ein Inkubationsschritt für 10 min bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation (5 min / 12 000 g / 4°C) trennte sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Die RNA-haltigen wässrigen Phasen wurden in autoklavierte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol konnte dann die RNA 15 min auf Eis gefällt werden. Nach Zentrifugation für 10 min / 12 000 g / 4°C wurden die RNA-Pellets zweimal mit 1 ml eiskaltem 75% EtOH gewaschen, 5 bis 10 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und schließlich in 45 bis 90 µl RNase-freiem DEPC-H₂O resuspendiert. Die RNA-Isolierung mit PeqGOLD TRIFAST® hat den Vorteil der geringen Kontamination mit DNA. Trotzdem wurden die RNA-Präparationen vor weiteren Verwendungen mit DNaseI behandelt. Hierfür wurde das *Turbo DNA free* Kit (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach Angabe des Herstellers angewendet. Konzentration und Reinheit der RNA wurden spektrophotometrisch bestimmt (siehe Abs. III.4.7). Die Qualität der

extrahierten RNA wurde entweder anhand eines RNase freien Agarosegels (siehe Abs. III.4.8) oder mithilfe des Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland) bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C .

III.4.7 Bestimmung der Nukleinsäure (DNA bzw. RNA)-Konzentration einer Lösung

Die Konzentration von RNA- und DNA-haltigen Lösungen (siehe Abs. III.4.1, III.4.5 und III.4.6) wurde photometrisch über die Messung der Adsorption bei 260nm und 280nm am Spektrophotometer ND1000 (Nano Drop, Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Die Quantifizierung der Nukleinsäure lässt sich anhand der Adsorptionswerte berechnen. Das Verhältnis der Absorptionswerte 260 nm und 280 nm entspricht die Reinheit der Lösungen. Werte über 1,8 (für DNA) bzw. 2,0 (für RNA) deuten auf eine saubere Nukleinsäure-Lösung hin. Kalibrierung und Blank-Wert des Geräts wurde mit MilliQ-H₂O bzw. RNase-freiem DEPC-H₂O durchgeführt. Anschließend wurde 1 - 2 μl der DNA- bzw. RNA-Lösung in den Messstrahl der Nano Drop-Einheit pipettiert und die Konzentration gemessen.

III.4.8 Rnase-freie Agarose-Gelelektrophorese zur Bestimmung der RNA-Qualität

400 ng RNA wurden auf ein Endvolumen von 40 μl mit DEPC-H₂O gebracht und mit 10 μl 5x RNA-Ladepuffer gemischt. Durch eine 10 minütige Inkubation bei 70°C wurden die Sekundärstrukturen der RNA-Stränge gelöst. Die RNAs wurden anschließend auf einem 1% Agarosegel (0,5x TBE in DEPC-H₂O, mit 10 μg / 100 ml Ethidiumbromid versetzt) 30 min bei 100 V aufgetrennt. Anhand der ribosomalen RNA-Banden konnte die Qualität der RNA-Präparation festgestellt werden: wenn die 28S- und 16S-Transkripte distinkte Banden und eine Ratio von ca. 2:1 aufwiesen, wurde die Qualität als gut betrachtet.

III.4.9 Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA Synthese)

Die cDNA Synthese erfolgte mithilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die cDNA-Synthese war notwendig, um die Expression bestimmter Gene qualitativ oder quantitativ mithilfe PCR (siehe Abs. III.4.2) bzw. quantitativer PCR (siehe Abs. III.4.10) vergleichen zu können.

Üblicherweise wurde 1 μg der isolierten RNA auf einem Volumen von 10 μl mit DEPC-Wasser verdünnt und für die cDNA-Synthese eingesetzt. Wenn die extrahierten RNA-Mengen zu gering waren, wurde das gesamte RNA-Extrakt für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Ansätze für die cDNA-Synthese setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 12: Zusammensetzung der Ansätze für die cDNA-Synthese

Komponenten	Volumen
RNA (1 µg/10µl in DEPC-Wasser)	10 µl
10 X RT-Random Primer	2 µl
10 X RT-Puffer	2 µl
25 X dNTP-Mix (100 mM)	0,8 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1 µl
RNase-free water (DEPC-Wasser)	4,2 µl
Endvolumen	20 µl

Die Reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler PTC-200 (MJ Research / BioRad, München, Deutschland) unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 13: Übersicht über das zur cDNA-Synthese benötigte Temperaturprogramm

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	10 min	120 min	5 sec	∞

Die Lagerung der neu synthetisierten cDNA erfolgte bei -20°C.

III.4.10 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real-time PCR*) ermöglicht eine relativ preiswerte direkte und quantitative Erfassung der Expression spezifischer Gene (Higuchi, Dollinger et al. 1992; Higuchi, Fockler et al. 1993; Gibson, Heid et al. 1996; Heid, Stevens et al. 1996). Eine qRT-PCR unterscheidet sich von der Kombination aus konventioneller PCR und Gelelektrophorese, indem die Amplifizierung und die Detektion der PCR-Produkte hier zeitgleich erfolgen. Dabei wird die Konzentration an doppelsträngigen DNA-Produkten durch Anwendung von interkalierenden Farbstoffen (z.B. SYBR® Green I) bzw. von Fluorochrom-gekoppelten Primern (z.B. TaqMan®-Sonden) und anschließender Messung der Fluoreszenzintensität erfasst. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Amplikons zu. Die Bestimmung der Probenfluoreszenz nach jedem Amplifizierungszyklus ermöglicht die Zeichnung einer Amplifikationskurve, aus dessen exponentieller Phase die Quantifizierung berechnet wird. Innerhalb der exponentiellen Amplifizierungsphase wird ein Fluoreszenz-Schwellenwert entweder automatisch oder manuell eingestellt. Der Ct-Wert (*cycle threshold*) einer Probe beschreibt die Anzahl an Amplifikationszyklen, die notwendig sind, um diesen Schwellenwert zu erreichen, und ist proportional zur Menge der zu quantifizierenden DNA-Sequenz in der Probe.

In der vorliegenden Arbeit wurde das SYBR® Green I Detektionsprinzip zusammen mit dem 7500 Fast Real-Time PCR Gerät (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Da durch diese Methode spezifische und unspezifische Produkte nicht unterschieden werden können, wurde eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die qRT-PCR durchgeführt. Jedes PCR-Produkt besitzt eine individuelle Schmelztemperatur, die abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt ist. Eine Schmelzkurve mit mehreren Dissoziierungs-Peaks war der Beweis für unspezifische Nebenprodukte und führte zum Ausschluss der Probe. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte über die ermittelten Fluoreszenzdaten in der exponentiellen Amplifikationsphase. Für den Vergleich der Genexpression verschiedener Proben in der qRT-PCR, wurden die Ct-Werte der Zielgene relativ zu den Ct-Werten eines konstitutiv exprimierten Haushaltsgens (*housekeeping gen*) normiert. In dieser Arbeit wurden HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) als Haushaltsgen für die Normierung und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als endogene Kontrolle der Normierung eingesetzt. Schließlich konnten diese sogenannten Δ Ct-Werte (relative Expressionswerte) der Proben miteinander verglichen. Die aus einem solchen Vergleich entstehenden Ergebnisse werden $\Delta\Delta$ Ct-Werte (relative Expressionsunterschiede) genannt. Um diese Ergebnisse in einem „n-fachen“ Expressionsunterschied darstellen zu können, galt die Gleichung $n=2^{-\Delta\Delta Ct}$. Nach Normierung mit HPRT1 wurde darauf geachtet, dass kein Expressionsunterschied zwischen den GAPDH-Werten aller Proben bestand.

Jede Bestimmung wurde in dreifachen Ansätzen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bestätigen. Die Zusammensetzung eines Einzelansatzes wird in der Tabelle 14 beschrieben. Als Negativkontrolle wurde anstelle der entsprechenden cDNA DEPC-Wasser eingesetzt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der qRT-PCR Ansätze

Komponenten	Volumen	Endkonzentrationen
2x Power SYBR Green PCR Master Mix	5 μ l	1x
Primer A (1 μ M)	1 μ l	100 nM
Primer B (1 μ M)	1 μ l	100 nM
cDNA (ca. 5 ng/ μ l)	1 μ l	0,5 ng
DEPC-H ₂ O	2 μ l	-
Endvolumen	10 μl	-

III.4.11 Microarrays

Für die Genexpressionsprofile wurden Mouse Genome GeneChips Version 430 2.0 von Affymetrix verwendet. Es wurden von jeweils sieben differenzierten WAP-T Tumoren, acht undifferenzierten WAP-T Tumoren und drei G-2 Tumoren in WAP-T-NP8 Empfängertiere Expressionsanalysen erstellt. Die Microarrayexperimente wurden von der Firma Signature Diagnostics AG (Potsdam, DE) durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung wurde mithilfe des dChip Programmes durchgeführt.

IV ERGEBNISSE

IV.1 Charakterisierung der WAP-T Tumore

WAP-T-NP8 Mäuse entwickeln 4 bis 6 Monate nach Induktion des Transgens Mammakarzinome. Diese durch die „frühen“ SV40 Proteine verursachten Brustläsionen wurden, basierend auf den publizierten Empfehlungen der Annapolis-Konsensus-Konferenz, nach ihrem histologischen Erscheinungsbild in 5 Kategorien, die sogenannte histologische Grade G0-G4, klassifiziert (Cardiff, Anver et al. 2000; Heinlein, Krepulat et al. 2008).

Um die Komplexität des Mausmodels möglichst einzugrenzen, beschränkten sich die Arbeiten auf invasive Mammakarzinome. Die Unterscheidung der Tumore erfolgte dabei anhand ihres Differenzierungsgrades in differenzierte (G1, G2) und undifferenzierte (G3, G4) Tumore (Tabelle 4).

IV.1.1 Cytokeratine als *lineage*-spezifische Marker

Cytokeratine (CK) sind als Intermediärfilamente Bestandteile des Zytoskeletts und werden spezifisch in Epithelzellen exprimiert. Dabei besitzt jede Epithelart ein spezifisches Cytokeratin-Expressionsmuster. Derzeit sind 20 verschiedene Cytokeratin-Proteine bekannt, die sich in zwei Hauptgruppen unterteilen lassen: CK1 bis CK8 werden als „neutral-basisch“ bezeichnet während CK9 bis CK20 zu den „sauren“ Cytokeratinen gehören.

Cytokeratine werden paarweise exprimiert (co-exprimiert) und bilden Heterodimere aus jeweils einem basischen und einem sauren Molekül, die als Grundbausteine für Cytokeratinfilamente dienen. Im Epithelium der normalen Brustdrüse kommen die Cytokeratine 5, 7, 8, 14, 15, 17, 18 und 19 vor. Davon werden in der basalen (myoepithelialen) Schicht die Paare CK5 - CK14 und CK7 - CK19 exprimiert, während die luminalen Epithelzellen CK7 - CK19 und CK8 - CK18 aufweisen (Taylor-Papadimitriou, Stampfer et al. 1989). Diese spezifische Verteilung der Cytokeratine wird genutzt um die unterschiedlichen Zell-*lineages* zu diskriminieren.

Cytokeratin 6 ist in der reifen, differenzierten Brustdrüse sehr selten exprimiert (Smith, Mehrel et al. 1990). Hingegen wird CK6 spezifisch in Progenitorzellen der Brustdrüse während der embryonalen Entwicklung und der dukalen Morphogenese exprimiert (Grimm, Seagroves et al. 2002; Li, Welm et al. 2003; Grimm, Bu et al. 2006; Moll, Divo et al. 2008). Die spezifische Verteilung der Cytokeratine wurde in

der vorliegenden Arbeit als Grundlage zum Beweis der zellulären Heterogenität innerhalb des Tumors verwendet.

Um die Verteilung der Keratine innerhalb der normalen Maus-Brustdrüse von WAP-T-NP8 Tieren zu untersuchen, wurden Kryoschnitte vom Mammagewebe jungfräulicher Weibchen angefertigt und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Dabei wurden Antikörper gegen die luminalen Keratine CK8/18 und gegen das myoepitheliale Keratin CK5 sowie dessen Bindungspartner CK14 verwendet. Zusätzlich wurde auf CK6 gefärbt. Für die weitere Diskriminierung der Zellen wurde Vimentin, ein für den mesenchymalen Ursprung spezifisches Intermediärfilament, und EpCAM, ein Oberflächenprotein das in allen epithelialen Zelltypen exprimiert wird, verwendet. Abbildung 12: stellt eine repräsentative Zusammenfassung dieser Färbungen dar.

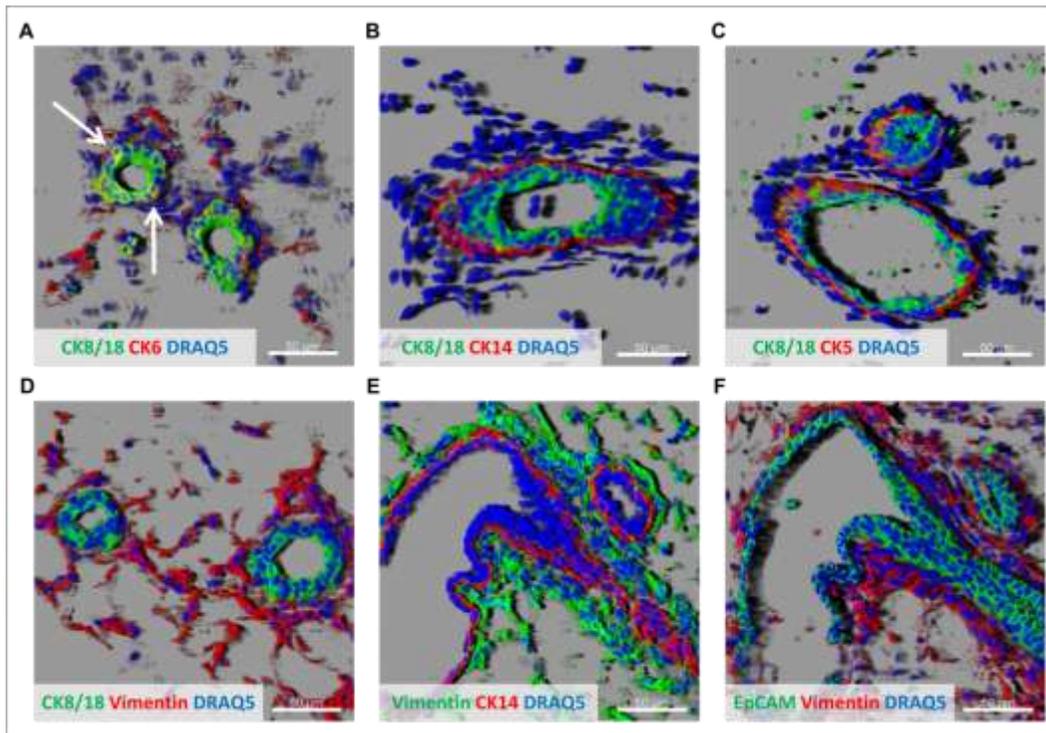


Abbildung 12: Darstellung von lineage spezifischen Markern in der normalen WAP-T-NP8 Brustdrüse

Die Expression und Lokalisation von CK5, CK6, CK14, CK8/18, Vimentin und EpCAM wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Färbungen in den Mammageweben einer 4 Monate alten jungfräulichen WAP-T-NP8 Maus (#12842) untersucht. Die Antikörper wurden in folgenden Kombinationen auf 15 µm dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet: CK8/18 mit CK6 (A), CK8/18 mit CK14 (B), CK8/18 mit CK5 (C), CK8/18 mit Vimentin (D), Vimentin mit CK14 (E) und EpCAM mit Vimentin (F). Die weißen Pfeile in der mikroskopischen Aufnahme oben links weisen auf jeweils eine CK6⁺-Epithelzelle. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Alle mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 µm.

Die Färbung des normalen Mammagewebes bestätigte die erwarteten Cytokeratin-Expressionsprofile: die Cytokeratine CK5 und CK14 werden ausschließlich in den basalen Schichten des Brustdrüsen-Epithels exprimiert (Abbildung 12B, Abbildung 12C), während das Cytokeratinpaar CK8/18 nur in den luminalen Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 12A-Abbildung 12D). Darüber hinaus korrelierte die Cytokeratin bzw. EpCAM-Färbung in keinem Fall mit dem mesenchymalen Marker Vimentin (Abbildung 12D, Abbildung 12F). Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass in nicht induzierten WAP-T-NP8 Tieren die Expression der Cytokeratine mit einem epithelialen Phänotyp korreliert und die unterschiedliche Verteilung der Cytokeratine eine Diskriminierung der Zell-*lineage* ermöglicht.

Der Tumorstammzelltheorie nach entsteht die intrinsische zelluläre Heterogenität von Tumoren durch Differenzierungsprozesse von Tumorzellen mit Vorläufereigenschaften. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Zellen eines Tumors hinsichtlich phänotypischen Merkmalen und Verhaltenseigenschaften. So stellte sich in der vorliegenden Arbeit als erstes die Frage, ob die nach Induktion entstehenden WAP-T Mammakarzinome eine intrinsische zelluläre Heterogenität aufweisen. Angesichts der Ergebnisse der Färbungen von normalem Mammagewebe (Abbildung 12) eignen sich die ausgewählten Cytokeratine als Marker zur Diskriminierung von Zellen unterschiedlicher *lineage*-Differenzierung bzw. Herkunft und somit zur Beantwortung dieser Fragestellung. Jeweils drei differenzierte und drei undifferenzierte Mammakarzinome wurden für diese Untersuchung ausgewählt.

H&E-Färbungen von Paraffinschnitten der Tumorprobe, die exemplarisch in der Abbildung 13 dargestellt werden, ermöglichen die Bestimmung des Tumorgads anhand der Tumormorphologie: bei differenzierten Tumoren ordnen sich die Zellen in einer Art „Perlenkette“ an, die eine Übertreibung der normalen Brustdrüsenmorphologie darstellt, während die Zellen undifferenzierter Tumore ohne erkennbare Ordnung entweder als „Tumorbälle“ oder als breiter, mehrschichtiger Streifen wachsen. Jeder analysierte Tumor wurde anhand eines H&E-Schnitts untersucht und dem entsprechenden Grad zugeordnet.

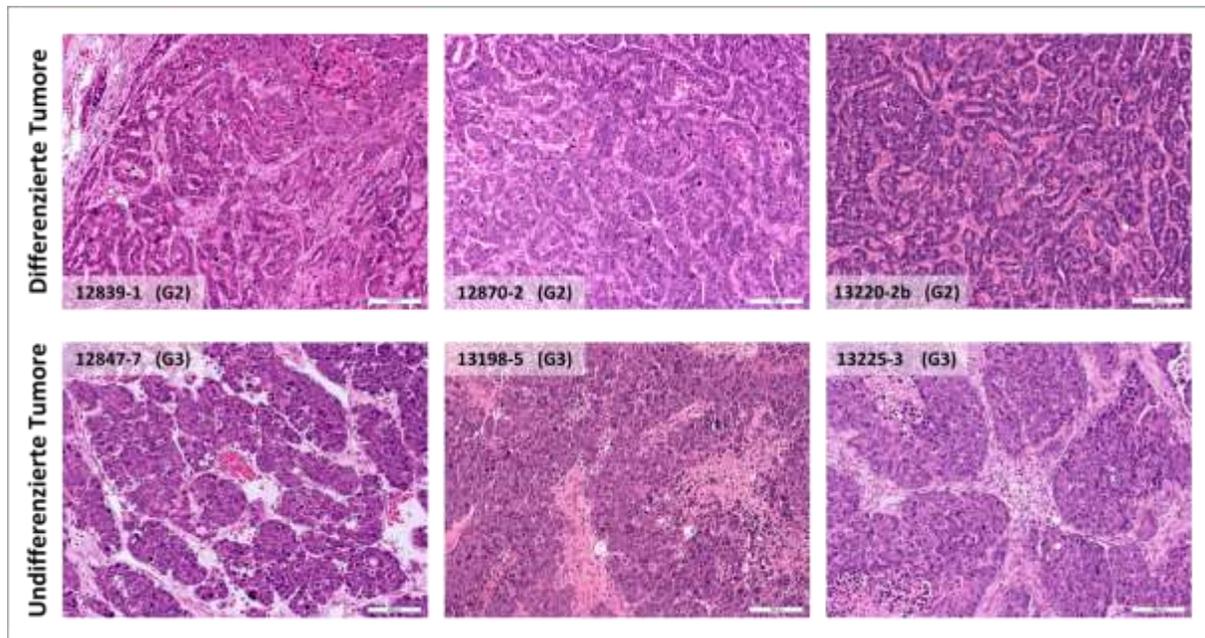


Abbildung 13: Morphologie der für die Charakterisierung angewendeten WAP-T-NP8 Tumoren

Darstellung von H&E gefärbten, 4 µm dicken Paraffinschnitten aus WAP-T-NP8 Tumoren. Die obere Zeile zeigt mikroskopische Aufnahmen von drei differenzierten Tumoren und die untere Zeile von drei undifferenzierten Tumoren. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 20x Objektiv eines Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer ProgRes C12 CCD-Kamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) versehen war. Maßstab: 100 µm.

IV.1.1.1 Cytokeratine 8/18 und Cytokeratin 14

Zur Analyse der Verteilung von Keratinen in den Tumoren wurden Kryoschnitte differenzierter und undifferenzierter WAP-T-NP8 Tumore mit Antikörpern gegen Cytokeratine gefärbt. Für die Detektion basaler und luminaler Phänotypen wurden jeweils Antikörper gegen CK14 bzw. CK8/18 verwendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Sekundärantikörper mittels Laser-Konfokalmikroskopie.

Abbildung 14 stellt repräsentative Co-Färbungen von CK8/18 mit SV40 Large-T-Antigen (SV40-LT), CK14 mit LT und CK8/18 mit CK14 dar. Da die Proteine des Transgens (frühe Region des SV40-Virus) die Induktion und Progression der Mammakarzinome in dem WAP-T Mausmodell bewirken, ermöglicht eine SV40-LT-Färbung die Visualisierung der Tumorzellen (Verweis auf Einleitung). Die Abbildung 14 (A, C, D und F) zeigt, dass CK8/18 unabhängig vom Tumorstadium in nahezu allen Tumorzellen exprimiert wird. Allerdings können sowohl Tumorzellverbände mit starker als auch mit schwacher CK8/18-Expression beobachtet werden.

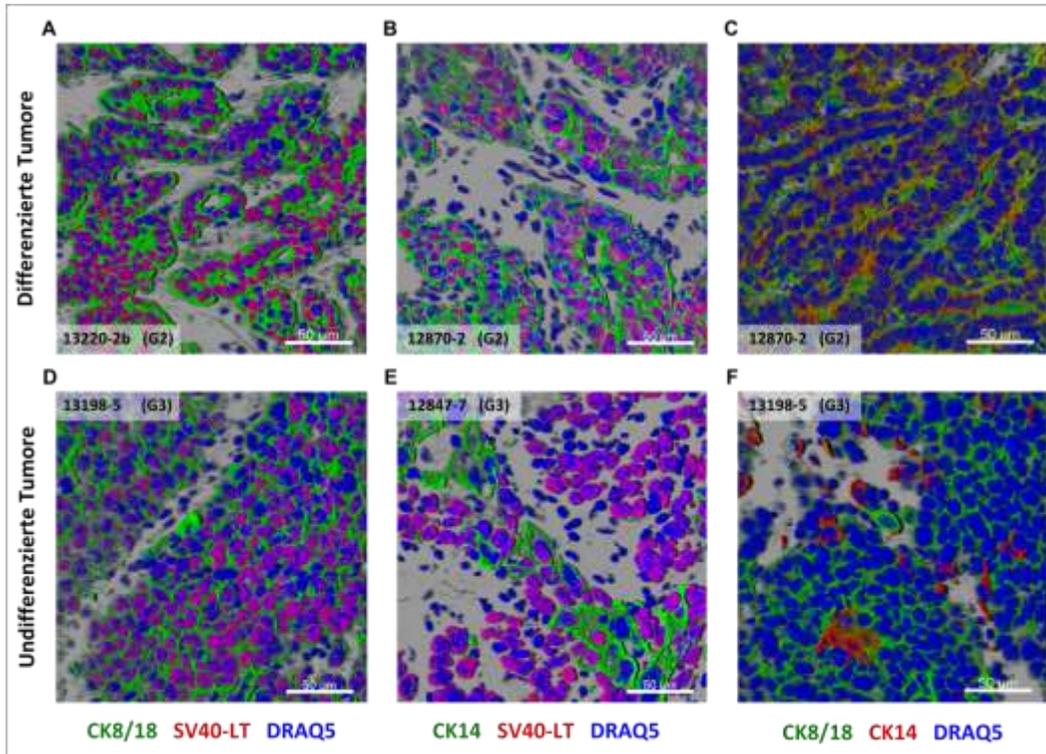


Abbildung 14: Darstellung von CK8/18 und CK14 in WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von CK14 und CK8/18 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Färbungen in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Die Antikörper wurden in folgenden Kombinationen auf 8 μm dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet: CK8/18 mit SV40-LT (A und D), CK14 mit SV40-LT (B und E) und CK8/18 mit CK14 (C und F). Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Alle mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 μm .

Wie CK8/18 lässt sich auch CK14 ubiquitär in den Zellen der differenzierten Tumore nachweisen. Dagegen zeigen in undifferenzierten Tumoren nur wenige Tumorzellen eine CK14-Expression (Abbildung 14B, Abbildung 14C, Abbildung 14E und Abbildung 14F). Die Co-Färbung von CK8/18 mit CK14 konnte diese Beobachtungen bestätigen (Abbildung 14C und Abbildung 14F). Dabei korrelierte die Stärke der CK14-Expression negativ mit der Expression von CK8/18.

WAP-T-NP8 Tumore zeigen eine Mikroheterogenität hinsichtlich der CK8/18- und CK14-Expression, wobei sich die Expressionsmuster differenzierter und undifferenzierter Tumore unterscheiden: Zellen in G1-G2 Tumoren exprimieren gleichzeitig luminale und basale Marker; G3-G4 Tumorzellen exprimieren hauptsächlich die luminalen Cytokeratine CK8/18 und seltener CK14. Die Beobachtung, dass die Expressionsintensität von CK8/18 und CK14 negativ korreliert, weist darauf hin, dass sich die

Tumorzellen möglicherweise in unterschiedlichen Differenzierungsstadien befinden. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die WAP-T-NP8 Tumore hinsichtlich weiterer Cytokeratine untersucht.

IV.1.1.2 Cytokeratin 6

Abbildung 15 zeigt repräsentative Aufnahmen von Co-Färbungen von Tumorschnitten für CK6 mit CK8/18 oder LT. Hierbei wurde festgestellt, dass in undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumoren eine kleine Zellpopulation CK6 positiv ist. Diese Zellen sind sowohl positiv für CK8/18 als auch für LT, wobei die CK6 positiven Zellen eine schwächere LT-Expression als die übrigen Tumorzellen zeigen. Interessanterweise konnte CK6 in differenzierten Tumoren nicht detektiert werden.

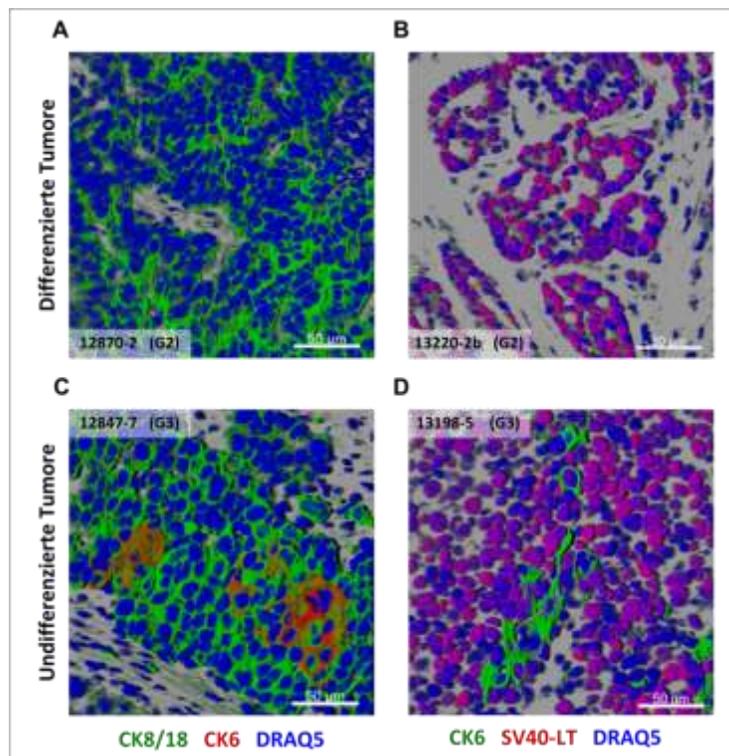


Abbildung 15: Darstellung von CK6 in WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von CK6 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Färbungen in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Die Antikörper wurden in folgenden Kombinationen auf 8 µm dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet: CK8/18 mit CK6 (A und C) und CK6 mit SV40-LT (B und D). Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa®- bzw. DyLight®-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5® gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Alle mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 µm.

Wie bereits erwähnt wird Cytokeratin 6 in der Literatur als Marker für Vorläuferzellen der embryonalen Brustdrüse beschrieben. Die differentielle Expression von CK6 in den undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumoren zeigt erneut eine starke Heterogenität der Tumorzellen und unterstützt dabei die Theorie, dass

die Tumormasse aus Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad, von unreif bis nahezu enddifferenziert, besteht.

Die An- bzw. Abwesenheit von CK6 und die verschiedenen CK14-Expressionsmuster sind Eigenschaften, welche differenzierte von undifferenzierten Tumoren unterscheiden und weisen darauf hin, dass beide Tumortypen sich aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entwickeln bzw. ein unterschiedliches Differenzierungspotenzial besitzen.

Um die Beobachtungen hinsichtlich der ausgewählten Cytokeratine in den WAP-T-NP8 Tumoren zu bestätigen, wurde die Expression der entsprechenden mRNA-Transkripte anhand von RNA-Microarrays und quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) untersucht.

IV.1.1.3 RNA-Microarrays von WAP-T-NP8 Tumoren

Um die Mechanismen der Tumorentstehung und -progression besser zu verstehen, wurden als Vorarbeit zahlreiche RNA-Microarray-Expressionsanalysen aus normalen Balb/c Mammagewebe, WAP-T Tumorstufen und WAP-T Tumoren verschiedener Grade durchgeführt (siehe Abs. III.4.11). Die für diese Microarrays verwendeten Tumorproben wurden nach stringenten Kriterien ausgewählt: anhand der H&E-Färbungen von Paraffin-Schnitten wurden die Tumore ausgeschlossen, denen kein eindeutiger Tumorgrad zugeordnet werden konnte oder die einen zu großen nekrotischen Anteil aufwiesen. Somit wurde verhindert, dass RNA gemischter Tumortypen bzw. degradierte RNA analysiert wurden. Für die Analyse wurde die Affymetrix Mouse 430 v2.0 Plattform verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit Hilfe des dChip Programms, wobei folgende Einstellungen verwendet wurden (Abbildung 16):

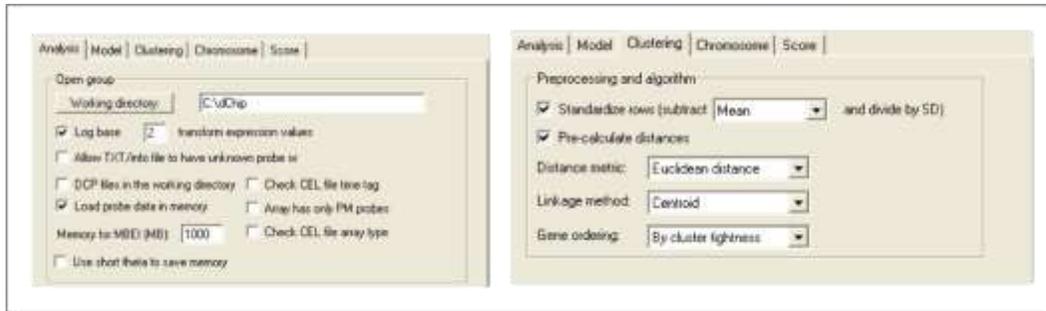


Abbildung 16: Darstellung der in DChip für die Cluster-Analyse vorgenommene Einstellungen

Screenshot der in der DChip Software vorgenommenen Einstellungen: die Microarray-Daten wurden normalisiert und als logarithmische Werte in den Arbeitsspeicher geladen. Einstellungen für die Cluster-Analyse: Probe auf Mittelwert standardisiert; Euclidean Distanzberechnung; *Linkage*-Verfahren: Zentroid; Anordnung der Gene: nach Clusterähnlichkeit.

Zunächst wurden die vorhandenen RNA-Microarray-Daten von WAP-T-NP8 Tumoren verwendet, um die Expression der Cytokeratine zu analysieren. Die in den Immunfluoreszenz-Färbungen untersuchten Cytokeratine wurden für eine Cluster-Analyse ausgewählt und als „Heatmap“ dargestellt (Abbildung 17). Dabei wurde deutlich, dass die Expression der Keratingene *Krt6a* und *Krt14* eine Unterscheidung von differenzierten und undifferenzierten Tumoren ermöglicht. Im Normalfall ist die CK14-mRNA stärker in differenzierten Tumoren repräsentiert, während hingegen in den G3-G4 Tumoren CK6-Transkripte stärker exprimiert werden. Die Tumprobe 12271-2 (G1 Tumor) zeigte eine leicht erhöhte CK6-Expression, wurde aber durch die hohe Menge des CK14-Transkripts der Gruppe der differenzierten Tumore korrekt zugeordnet. Ähnlich zeigte die Probe 12108-5 (G3 Tumor) eine etwas höhere Expression von CK6 und CK14, konnte jedoch ebenfalls korrekt klassifiziert werden. Eine Erklärung für den Phänotyp beider Proben könnte sein, dass trotz der Überprüfung der Tumormorphologie anhand von H&E-Schnitten die RNAs aus Tumorbereichen mit Clustern verschiedener Differenzierungsstadien extrahiert und analysiert wurden. Die Keratine 8 und 18 waren in allen untersuchten Proben sehr stark exprimiert, was mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz übereinstimmt (vergleiche Abbildung 14). Anhand der CK8- und CK18-Expression konnten die Proben allerdings nicht eindeutig zugeordnet werden.

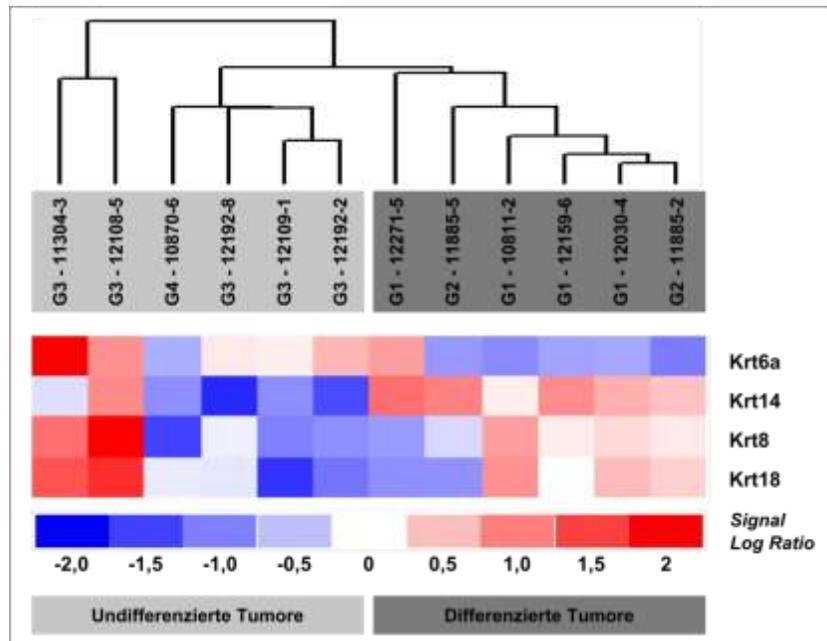


Abbildung 17: Differenzielle Expression der Krt 18, Krt 14 und Krt 6 Gene in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumoren (RNA-Microarray Daten)

Expressionsanalyse als Heatmap dargestellt für Krt6a, Krt8, Krt14 und Krt18 aus RNA-Microarray Daten differenzierter (n=6) und undifferenzierter (n=6) WAP-T-NP8 Tumore: Werte wurden als *Signal Log Ratio* miteinander verglichen und die Tumorprobe einer Cluster-Analyse unterzogen. Die Tumorproben wurden einer RNA-Extraktion mit Trifast-Reagenz unterzogen. Die Microarray Analysen erfolgten auf der Affymetrix Mouse 430 v2.0 Plattform.

IV.1.1.4 Quantitative PCR für die Cytokeratine 6, 14 und 18

Um die Ergebnisse der Expressionsanalyse zu validieren, wurden aus unabhängigen Experimenten mRNAs aus jeweils 5 differenzierten und 8 undifferenzierten Tumoren isoliert. Bei der Auswahl der Proben galten die gleichen Ausschlusskriterien wie bei der RNA-Microarray-Analyse. Definierte Mengen der mRNAs wurden in cDNA umgeschrieben und anschließend für die quantitative PCR eingesetzt (siehe Abs. III.4.9 und III.4.10). Dabei wurden die Mengen an Cytokeratin-Transkripten mittels spezifischer Primer für CK6, CK14 und CK18 relativ zueinander quantifiziert. Alle Proben wurden jeweils auf die Expression des Haushaltsgens *Hprt1* (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase 1) normiert und die Normierung wurde mit *Gapdh* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) als interne Kontrolle überprüft.

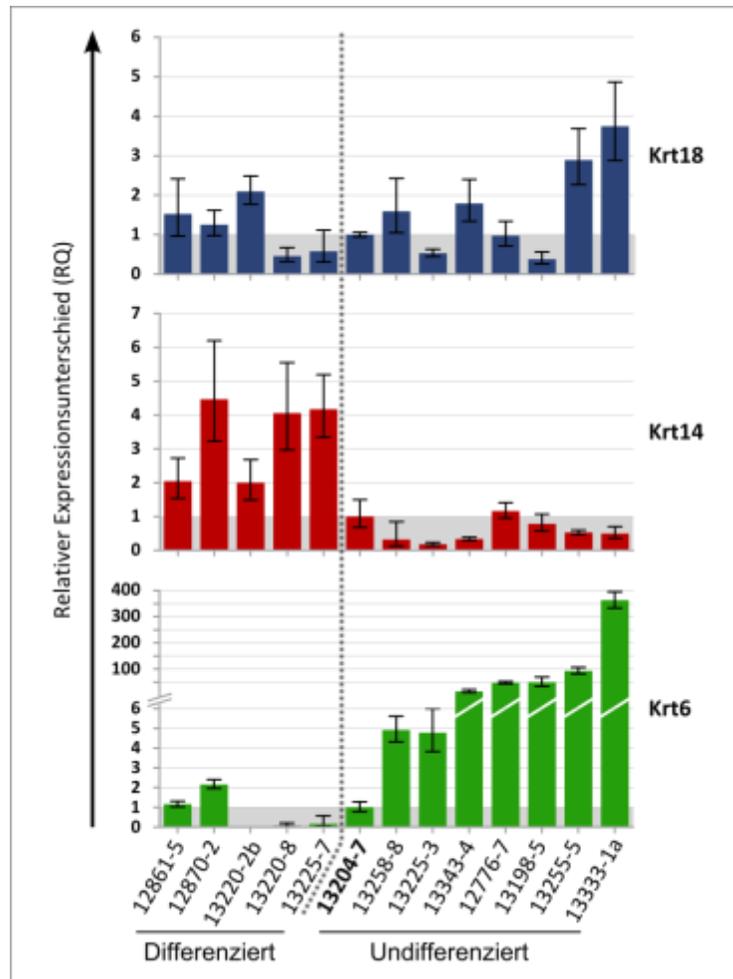


Abbildung 18: Differenzielle Expression der Krt 18, Krt 14 und Krt 6 Gene in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumoren (Quantitative PCR Daten)

Relative Quantifizierung der *Krt18*, *Krt14* und *Krt6* Expression in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumoren. Die RNA von differenzierten (n=5) und undifferenzierten (n=8) Tumorproben wurde mit Trifast (Peglab, Erlangen) extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR untersucht. Die Analysen erfolgten in einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) und wurden mit der Software SDS v1.4 ausgewertet. Jede Messung wurde als Dreieransatz durchgeführt (ca. 5 ng cDNA pro Messung). Die Expressionswerte der Proben wurden auf *Hprt1* normiert; *Gapdh*, ein zweites Haushaltsgen diente als interne Kontrolle. Die relativen Expressionsunterschiede (RQ) werden als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte dargestellt, wobei jeweils die Probe #13204-7 als Kalibrator diente (Ct: *cycle threshold*). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

Wie bereits durch die Analysen der Expressions-Arrays gezeigt, weisen die in Abbildung 18 dargestellten differenzierten WAP-T-Tumore eine signifikant höhere CK14-Expression (Faktor 2 bis 4,5) und eine wesentlich geringere CK6-Expression (Faktor ≤ 2) im Vergleich zu undifferenzierten WAP-T-Tumoren auf. Die undifferenzierte Tumorprobe 13204-7 war hier die einzige Probe die keine stark erhöhte Expression des CK6-Transkripts zeigte. Bezüglich des *Krt18*-Gens konnte erneut kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen differenzierten und undifferenzierten Tumorproben festgestellt werden.

Sowohl die Microarray- als auch die qPCR-Analyse bestätigten die Beobachtungen der Immunfluoreszenz-Analysen: differenzierte WAP-T Tumore unterscheiden sich von undifferenzierten WAP-T Tumoren hinsichtlich einer sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene verstärkten Expression von CK14 und einer reduzierten Expression von CK6. Hervorzuheben ist hierbei die Beobachtung, dass die Tumore nicht aus einer homogenen Zellpopulation sondern aus Tumorzellen mit unterschiedlichen *lineage*-Markern bestehen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass WAP-T Tumorgewebe eine intrinsische Heterogenität bezüglich verschiedener Differenzierungsmarker aufweisen, die in normalen Geweben spezifisch in unterschiedlichen, gut definierten Zelltypen von exprimiert werden. Basierend auf der Eigenschaft von Vorläuferzellen, in unterschiedliche Zell-*lineages* differenzieren zu können (Differenzierungspotential), geben diese Ergebnisse einen deutlichen Hinweis auf die Anwesenheit von Tumorstammzellen in WAP-T Tumoren.

Eine weitere und wichtige Eigenschaft von Tumorstammzellen ist die Fähigkeit als Tumor initiiierende Zelle zu fungieren. Ein nächster Schritt dieser Arbeit bestand deshalb darin, WAP-T Tumorzellen hinsichtlich ihres Potentials zu untersuchen, nach Transplantation in gesunde Empfängermäuse einen Tumor auszubilden. Ein Hauptaspekt galt dabei der Fragestellung, ob sich distinkte Zellpopulationen innerhalb eines Tumors durch verschiedene Tumorinitiierungseigenschaften auszeichnen. Um diese Fragestellung beantworten zu können wurde zunächst die Methode der Tumorzelltransplantation etabliert.

IV.1.2 Etablierung des Tumorzell-Transplantationsverfahrens

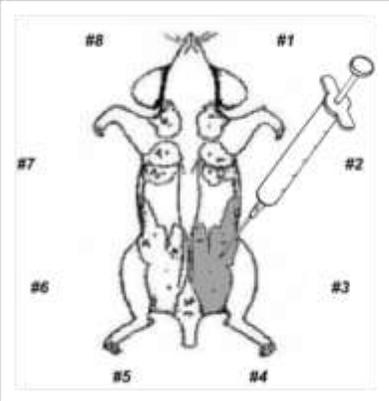
IV.1.2.1 Untersuchung der Tumor-initiiierenden Eigenschaften der WAP-T Tumorzellen

WAP-T Primärtumore wurden als Ausgangsmaterial zum Gewinn von Tumorzellen verwendet. Die Induktion der Mammakarzinome erfolgte durch Verpaarung von transgenen Weibchen im Alter von acht Wochen. Nach 4 bis 8 Monaten konnten die Tumore entnommen werden. Die Beschreibung des Primärtumorzell-Dissoziationsverfahrens und der Transplantation ist im Abschnitt III.3.2.1 und III.1.5 zu finden. Um die Wachstumsfähigkeit der WAP-T-NP8 Tumorzellen nach orthotopischer Transplantation zu untersuchen, wurden verschiedene Versuchsansätze getestet.

Die ursprüngliche Planung der Experimente sah vor, die Tumorinitiierungseigenschaften von WAP-T-NP8 Tumorzellen in Wildtyp BALB/c Empfängertieren zu untersuchen. Als erster Schritt der Optimierung des Transplantationsverfahrens wurden $1,5 \times 10^6$ dissoziierte Primärtumorzellen in die Brustdrüse #3 von

jungfräulichen BALB/c Weibchen (n=10) transplantiert (Abbildung 19). Jedoch wurde beobachtet, dass die Injektion lediglich in 30% der Fälle zum Tumorwachstum führte (Abbildung 20). Dieses unerwartete Ergebnis kann entweder durch ein schwaches Ansiedlungs- und Anwachspotential der Primärtumorzellen oder eine Transplantatabstoßung erklärt werden. Um die Frage einer Immunantwort gegen durch das Transgen kodierte Proteine zu prüfen, wurden in einem nächsten Schritt nicht induzierte (jungfräuliche) WAP-T Mäuse mit WAP-T-NP8 Tumorzellen transplantiert. Um die Spezifität einer möglichen Immunantwort nach Transplantation zu untersuchen, wurden Empfängertiere dreier unterschiedlicher Mauslinien ausgewählt: WAP-T1, WAP-T-NP8 und WAP-T-NP6 (Tabelle 15). Während WAP-T1 Mäuse für ein LT-Wildtyp kodieren, exprimieren WAP-T-NP8 und -NP6 Mäuse eine Variante von LT-Antigen, welche mit einem Epitop aus dem Nukleokapsidprotein des Lympozytären Choriomeningitis Virus (LCMV NP-Epitop) fusioniert ist. Die NP-Peptidsequenz dient hierbei als stark immunogenes Epitop (Schulz, Aichele et al. 1989; Schulz, Zinkernagel et al. 1991; Moskophidis and Zinkernagel 1995). WAP-T-NP8 und -NP6 Mäuse unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Kopien-Anzahl des Transgens an verschiedenen Stellen im Genom was unter anderem zu unterschiedlichen Expressionsprofilen nach Induktion führt (siehe Abs I.5) (Schulze-Garg, Lohler et al. 2000). Der Vergleich zwischen Tumorwachstum in transgenen und nicht-transgenen Empfängertieren sollte einen Hinweis auf eine auf LT bezogene Immunantwort liefern, während der Vergleich der WAP-T1 mit WAP-T-NP8 bzw. -NP6 Empfängertiere die Beteiligung des NP-Epitops im Erkennungsprozess klären sollte.

Tabelle 15: Darstellung der für die Transplantationen angewendeten Primärtumore und der entsprechenden Empfängertiere



Spendertiere	Empfängertiere			
	BALB/c n=10	WAP-T1 n=3	WAP-T-NP8 n=3	WAP-T-NP6 n=6
12360-8	X	-	X	X X
12369-8	X	-	X	X
12370-2	X	-	-	-
12371-8	X	-	X	X
12382-1	X	-	-	-
12392-5	X	X	-	X
12393-4	X	X	-	X
12451-8	X X	X	-	X

Abbildung 19: Darstellung der Brustdrüsennummerierung der Maus und des orthotopischen Transplantationsorts

Abbildung 20 fasst zusammen mit welchem Erfolg Tumore in den unterschiedlichen Mauslinien initiiert wurden. Das Tumorwachstum nach Transplantation bei den WAP-T Empfängertieren lag unabhängig von der transplantierten Mauslinie bei 100%. Die Tatsache, dass Tumore mit einer geringeren Frequenz in

BALB/c Wildtyp Tieren wachsen, lässt vermuten, dass eine spezifische Immunantwort gegen Zellen, die das Transgen exprimieren, stattfindet. Da kein Unterschied im Tumorwachstum zwischen transplantierten WAP-T1 und WAP-T-NP6 / -NP8 detektiert wurde, konnte des Weiteren gezeigt werden, dass in diesem Fall das LCMV-NP Epitop keine vorrangige Rolle in dem Erkennungsprozess der Tumorzellen für die Immunzellen spielte. Die Frage, ob die Erkennung und Eliminierung der transplantierten Zellen über eine direkte oder indirekte Detektion der SV40 Proteine stattfindet, konnte durch diese Experimente nicht beantwortet werden.

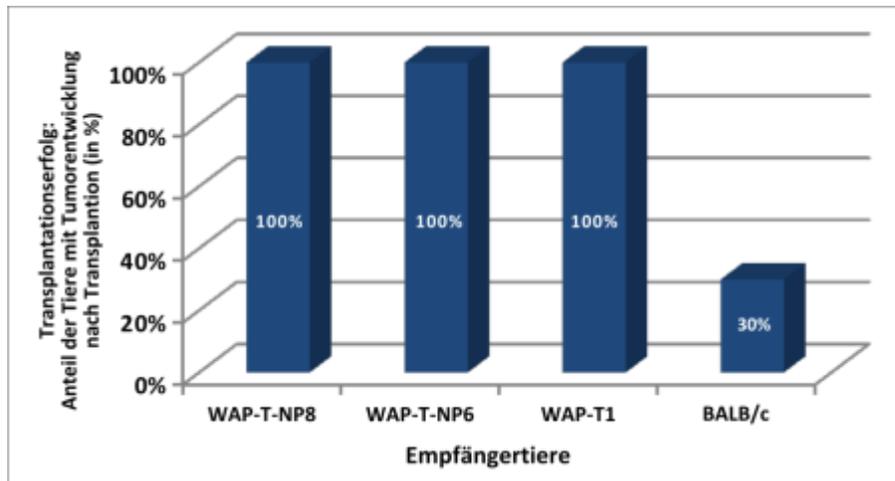


Abbildung 20: Darstellung des Transplantationserfolgs von WAP-T-NP8 Primärtumorzellen in syngenem BALB/c, WAP-T1, WAP-T-NP6 und WAP-T-NP8 Empfängertieren

Prozentual dargestellte Ergebnisse der Transplantationen von dissoziierten Primärzellen aus WAP-T-NP8 Tumoren (n=8) in jungfräulichen BALB/c (n=10), WAP-T1 (n=3), WAP-T-NP6 (n=6) und WAP-T-NP8 Weibchen (n=3). Die Dissoziation der Primärtumorzellen erfolgte durch Kollagenase-Verdau; die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Färbung geprüft. Für die Transplantation wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen in 20 μ l Quantum-Matrigel (1:1) resuspendiert und in die Mammagewebe #3 der Empfängertiere injiziert. Transplantierte Tiere wurden zweimal wöchentlich abgetastet und gemessen für eine Beobachtungszeit von maximal 9 Monaten.

IV.1.2.2 Kontrolle der Transplantationen in WAP-T Mäuse

Da die WAP-T1, WAP-T-NP8 und WAP-T-NP6 Empfängertiere die frühe SV40 Genregion als Transgen enthalten, stellte sich die Frage, ob die durch die Tumorzelltransplantation entstehende Wunde und/oder die darauffolgende Infiltration von Immunzellen am Injektionsort zur Aktivierung des Transgens in den Brustdrüsen-Epithelzellen der Empfängertiere führen kann. In diesem Fall könnten die in transplantierten Tieren entstehenden Tumore aus eigenen, durch SV40-LT-Expression transformierten Zellen entstehen. Um diese Möglichkeit ausschließen zu können wurden zwei jungfräuliche WAP-T-NP8 Mäuse mit jeweils 30 μ l Quantum-Matrigel (1:1) ohne Tumorzellen in den Drüsen #3 und #6 transplantiert. Die Tiere wurden am Tag 7 bzw. am Tag 14 nach Transplantation seziert und analysiert. Hierbei wurden die Brustdrüsen #2 und #3 mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend mittels immunhistochemischer Verfahren auf SV40-LT gefärbt um eine Aktivierung des Transgens auf Proteinebene detektieren zu können (Abbildung 21C). Die Gewebe #6 und #7 wurden in flüssigem

Stickstoff tiefgefroren. Später wurde mRNA aus diesen Proben aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und in einer PCR auf SV40 LT analysiert (Abbildung 21B). Die Gewebe #2 und #7 dienten jeweils als Negativkontrollen. In beiden Untersuchungen konnte sowohl 7 als auch 14 Tage nach Injektion von Quantum-Matrigel keine Aktivierung des Transgens nachgewiesen werden. Eine Aktivierung des WAP-Promotors, initiiert durch das Transplantationsverfahren, konnte damit ausgeschlossen werden.

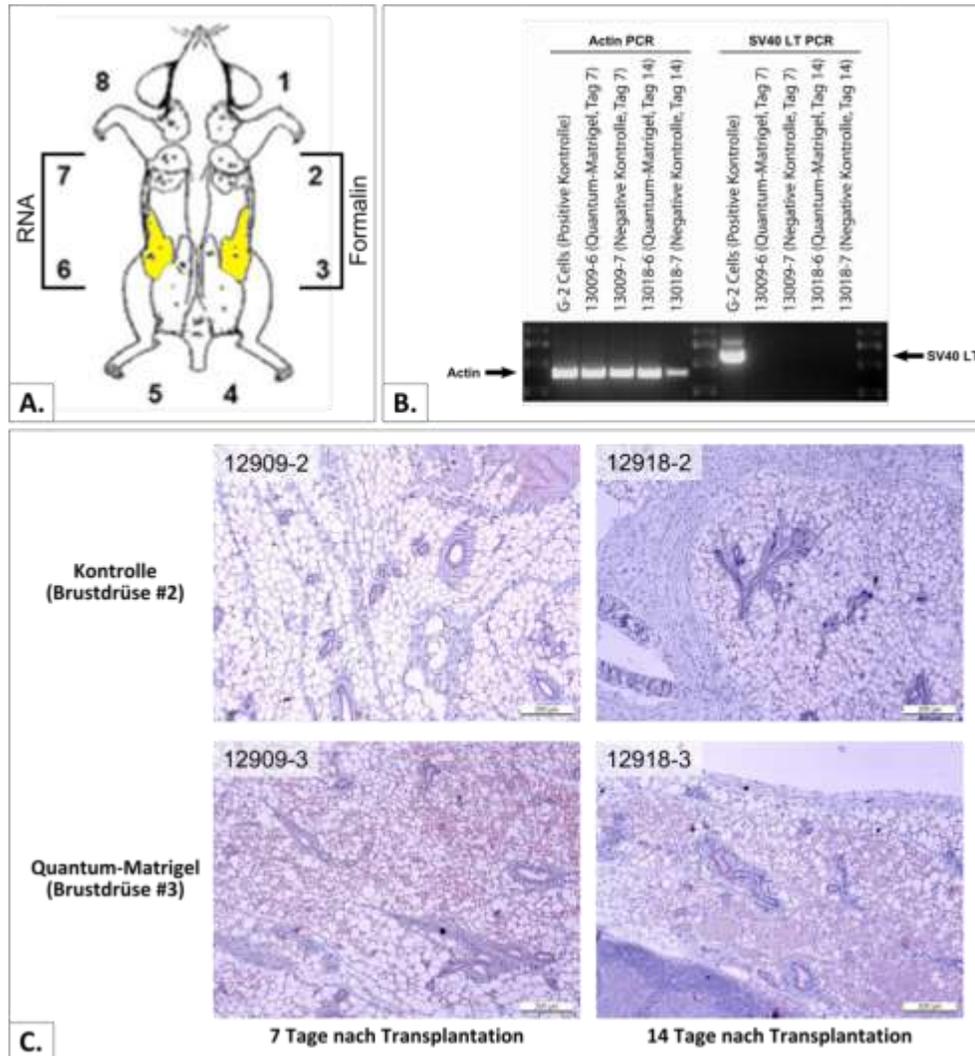


Abbildung 21: Kontrolle zu den Transplantationsexperimenten

A: Transplantation der Mammagewebe #3 und #6 von WAP-T-NP8 Empfängertieren (n=2) mit jeweils 30 µl Quantum-Matrigel (1:1). Die 2 Kontrolltiere wurden 7 Tage bzw. 14 Tage nach Transplantation sezirt und die Gewebe #2, #3, #6 und #7 präpariert. **B:** Nachweis des SV40 LT Transkripts mittels PCR: die RNAs wurden aus den Geweben #6 und #7 mit Trifast (Peqlab, Erlangen) extrahiert, in cDNA umgeschrieben und PCRs auf SV40 LT und Aktin unterzogen. Die aus einem WAP-T x WAP-mutp53-Tumor etablierte G-2 Zelllinie diente als Positivkontrolle, die Drüse #7 als Negativkontrolle. **C:** Nachweis von SV40 LT durch Immunhistochemie: die Gewebe #2 und #3 der jeweiligen Mäuse wurden mit 4% Phosphat-gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. 4 µm dicke Schnitte wurden jeweils immunhistochemischen Färbungen für SV40 LT unterzogen. Die Gewebe #2 dienten als Negativkontrolle. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 10x Objektiv eines Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer ProgRes C12 CCD-Kamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) versehen war. Maßstab: 200 µm.

IV.1.2.3 Lineage-Depletion der primären Tumorzellen

Nachdem eine Aktivierung des Transgens durch das Transplantationsverfahren ausgeschlossen werden konnte, stellte sich als nächstes die Frage, ob eventuell durch die Co-Transplantation von Immunzellen des Spendertieres mit Tumorzellen eine Immunantwort ausgelöst wird. Dazu wurden weitere Transplantationsexperimente durchgeführt. Mögliche Immun- und Blutzellen, die zusammen mit den Tumorzellen extrahiert wurden, konnten durch eine antikörperbasierende lineage-Depletion entfernt werden (siehe Abs. III.3.2.2). Zell- und extrazelluläre Trümmer wurden fast vollständig in der Säule zurückgehalten. Diese Methode ermöglichte es somit eine reinere Tumorzellsuspension zu bekommen und Nebeneffekte durch eine unspezifische Immunantwort zu minimieren. Fünf Primärtumore wurden als Ausgangsmaterial verwendet und jeweils 10^5 Zellen in jungfräuliche BALB/c und WAP-T Weibchen transplantiert. Tabelle 16 fasst den Transplantationsplan zusammen; in Abbildung 22 ist die Tumorinitiierung in den jeweiligen Empfängertieren dargestellt.

Tabelle 16: Darstellung der für die Transplantationen von Lin⁻ Zellen verwendeten Primärtumore und der entsprechenden Empfängertiere

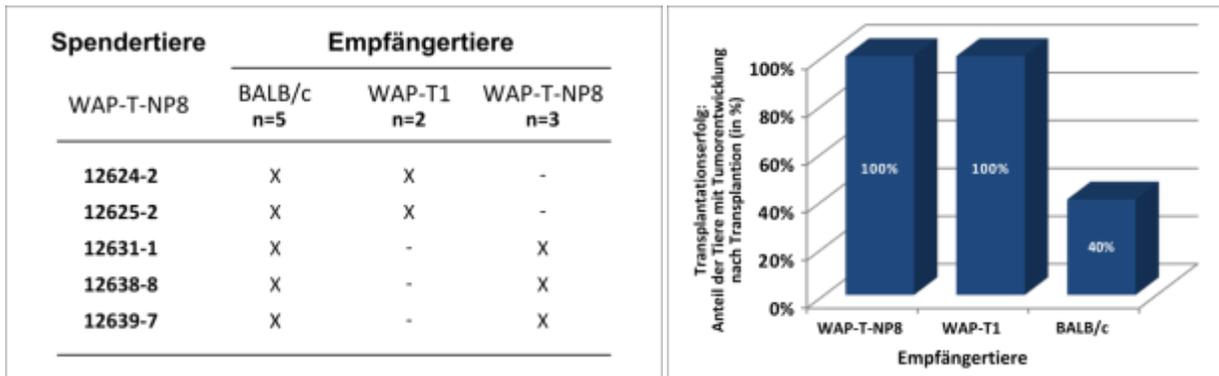


Abbildung 22: Darstellung des Transplantationserfolgs von Lin⁻ WAP-T-NP8 Primärtumorzellen in syngenen BALB/c, WAP-T1, und WAP-T-NP8 Empfängertieren

Prozentual dargestellte Ergebnisse der Transplantationen von dissoziierten lin⁻ Tumorzellen aus WAP-T-NP8 Tumoren (n=5) in jungfräuliche BALB/c (n=5), WAP-T1 (n=2) und WAP-T-NP8 Weibchen (n=3). Die Dissoziation der Primärtumorzellen erfolgte durch Kollagenase-Verdau; die Primärzellen wurden einer lineage-Depletion unterzogen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach); die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Färbung geprüft. Für die Transplantation wurden jeweils 10^5 Zellen in 20 µl Quantum-Matrigel (1:1) resuspendiert und in das Mammagewebe #3 der Empfängertiere injiziert. Transplantierte Tiere wurden zweimal wöchentlich für eine Beobachtungszeit von maximal 9 Monaten abgetastet und die Tumorgröße gemessen.

Lineage negative (Lin⁻) Tumorzellen initiierten zu 40% Tumore nach Transplantation in BALB/c Tieren, während erneut 100% der WAP-T Empfängertiere Tumore entwickelten (Abbildung 22).

Zusammengefasst konnte somit in diesen Transplantationsexperimenten kein signifikanter Unterschied in der Tumorinitiierung zwischen Zellen vor und nach lineage-Depletion gemessen werden. Dies weist darauf hin, dass Immunzellen des Spendertiers keine wichtige Rolle in der Abwehr der Tumorzellen in

BALB/c Wildtyp Mäusen spielen. Es kann deshalb vermutet werden, dass in BALB/c Mäusen eine Immunreaktion gegen transplantierte WAP-T-NP8 Tumorzellen stattfindet.

Wegen des schlechteren Wachstums der primären Tumorzellen in BALB/c Weibchen wurden in den folgenden Versuchen ausschließlich transgene Empfängertiere (WAP-T) eingesetzt.

IV.1.3 Bestimmung der Frequenz der Tumor-initiierenden Zellen in WAP-T Tumoren

Auf der Suche nach Tumorstammzellen in WAP-T Mäusen stellte sich als Nächstes die Frage, mit welcher Frequenz Tumor-initiierende Zellen in WAP-T Tumoren vorkommen. Dazu wurden unterschiedliche Zellzahlen primärer Tumorzellen in jungfräuliche WAP-T-NP8 Weibchen transplantiert. Dabei wurden Lin⁻ Tumorzellen eingesetzt, da das *lineage*-Depletion-Verfahren zu einer allgemein reineren Zellsuspension führte. Die Qualität der Primärzellsuspension ist insbesondere bei der Transplantation einer geringen Zellanzahl und bei den für einen späteren Zeitpunkt geplanten Durchflusszytometrie-Experimenten von Bedeutung.

2 differenzierte und 4 undifferenzierte Primärtumore dienten als Ausgangsmaterial für die Transplantation von jeweils 10^4 und 10^3 Zellen als Einzelexperiment und 10^2 und 10^1 Zellen als Replikate. Die Zellen wurden in Quantum-Matrigel resuspendiert und orthotopisch in WAP-T-NP8 Empfängertieren injiziert. Tabelle 17 fasst das Transplantationsschema sowie den Transplantationserfolg zusammen. Manche Empfängertiere entwickelten nach längerer Beobachtungszeit distante Tumore, die nicht als Mammakarzinome klassifiziert wurden und deren Ursprung nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Diese Tumore wurden für die folgende Untersuchung nicht berücksichtigt.

Sowohl differenzierte als auch undifferenzierte Tumorzellen konnten in allen Untersuchungen mit 10^4 und 10^3 transplantierten Zellen einen Tumor initiieren. Ab 10^2 Zellen nahm die Effizienz der Transplantation ab. Nach Injektion von 100 primären Tumorzellen entwickelten 7 von 12 Tieren (58%) ein Mammakarzinom, wobei die Tumorentwicklung bei 6 von 8 (75%) der Ansätze aus undifferenzierten Primärtumoren erfolgreich war und lediglich bei 1 von 4 (25%) Ansätzen der differenzierten Tumorzellen Tumore wuchsen. Mit 10 Zellen konnten nur undifferenzierte Tumorzellen einen Tumor bei 3 von 8 (38%) Ansätzen erzeugen. In Abbildung 23 sind diese Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 17: Tabellarische Darstellung des Transplantationserfolgs von WAP-T-NP8 Primärtumorzellen

Transplantation von Primärtumorzellen in syngene Empfängertiere nach serieller Dilution. Ein Empfängertier der Kohorte #1 (10^3 Zellen) wurde wegen schlechtem Allgemeinzustand vorzeitig getötet und wurde aus diesem Grund ausgeschlossen.

		Ausgangstumore											
		Kohorte #1		Kohorte #2		Kohorte #3		Kohorte #4		Kohorte #5		Kohorte #6	
		13197-2	Grad 2	13220-2b	Grad 2	13198-5	Grad 3	13204-7	Grad 3	13205-4	Grad 3	13225-3	Grad 3
Transplantierte Zellanzahl	10^4 Zellen	JA		JA		JA		JA		JA		JA	
	10^3 Zellen	Fällt aus		JA									
	10^2 Zellen	NEIN		NEIN		JA		JA		NEIN		JA	
	10^1 Zellen	NEIN		NEIN		JA		NEIN		NEIN		NEIN	

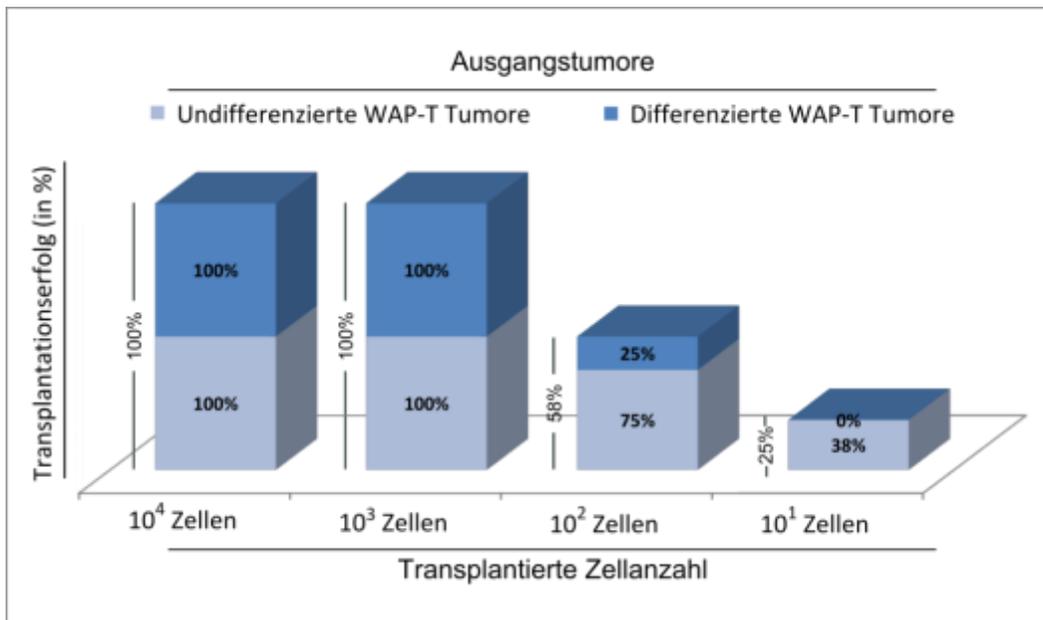


Abbildung 23: Darstellung des Transplantationserfolgs von differenzierten bzw. undifferenzierten WAP-T-NP8 Primärtumorzellen in Abhängigkeit von der Anzahl transplantierter Zellen.

Prozentual dargestellte Ergebnisse der Transplantationen einer seriellen Dilution (10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 Zellen) von lin^- dissoziierten Primärzellen aus WAP-T-NP8 Tumoren (n=6) in jungfräuliche WAP-T-NP8 Weibchen (n=36). Die dunkelblauen und hellblauen Balkensegmente stellen jeweils den Transplantationserfolg von differenzierten und undifferenzierten Tumoren für die angegebene Zellzahl dar. Die Dissoziation der Primärtumorzellen erfolgte durch Kollagenase-Verdau; die Primärzellen wurden einer lineage-Depletion unterzogen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach); die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Färbung geprüft. Für die Transplantation wurden die Zellen anschließend in 20 μ l Quantum-Matrigel (1:1) resuspendiert und in die Mammagewebe #3 der Empfängertiere injiziert. Transplantierte Tiere wurden zweimal wöchentlich für eine Beobachtungszeit von maximal 9 Monaten abgetastet und die Tumorgroße gemessen.

Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass in WAP-T Tumoren mindestens eine von 1000 Zellen in der Lage ist einen Tumor zu initiieren. Des Weiteren weisen die Transplantationsversuche mit geringerer Zellanzahl darauf hin, dass undifferenzierte Tumore im Vergleich zu differenzierten Tumoren möglicherweise mehr Zellen mit Tumor-initiiierenden Eigenschaften enthalten. In einigen Fällen scheinen diese Zellen mehr als 10% aller Tumorzellen zu repräsentieren.

Um die nach Transplantation entstandenen Tumore näher zu charakterisieren, wurden Paraffinschnitte H&E gefärbt und anhand der Morphologie einem Grading zugeordnet. Die Färbungen zeigten, dass transplantierte Tumore die Morphologie der primären Tumore widerspiegeln. Zellen aus undifferenzierten Tumoren generierten nur undifferenzierte Tumore, während differenzierte Zellen vorwiegend differenzierte Tumore hervorbrachten (Abbildung 24). In einem Einzelfall wurde aus einem differenzierten Mammakarzinom ein undifferenzierter Tumor initiiert (Kohorte #1). Dies lässt sich dadurch erklären, dass WAP-T Primärtumore nicht ausschließlich monoklonal sind, sondern häufig mehrere Teile verschiedener Ursprünge und Phänotypen enthalten. Ein Tumor, der als differenziert gradet wurde, kann einen kleineren undifferenzierten Bereich enthalten. Da G3-G4 Zellen ein höheres Tumorigenitätspotential besitzen, besteht außerdem die Möglichkeit, dass sich diese nach Transplantation gegenüber differenzierten Tumorzellen durchgesetzt haben. Tabelle 18 fasst zusammen, welchen Grad die durch Transplantation initiierten Tumore aufwiesen.

Zusammengefasst weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass schon wenige WAP-T-NP8 Tumorzellen in der Lage sind, den Phänotyp des Primärtumors zu reproduzieren.

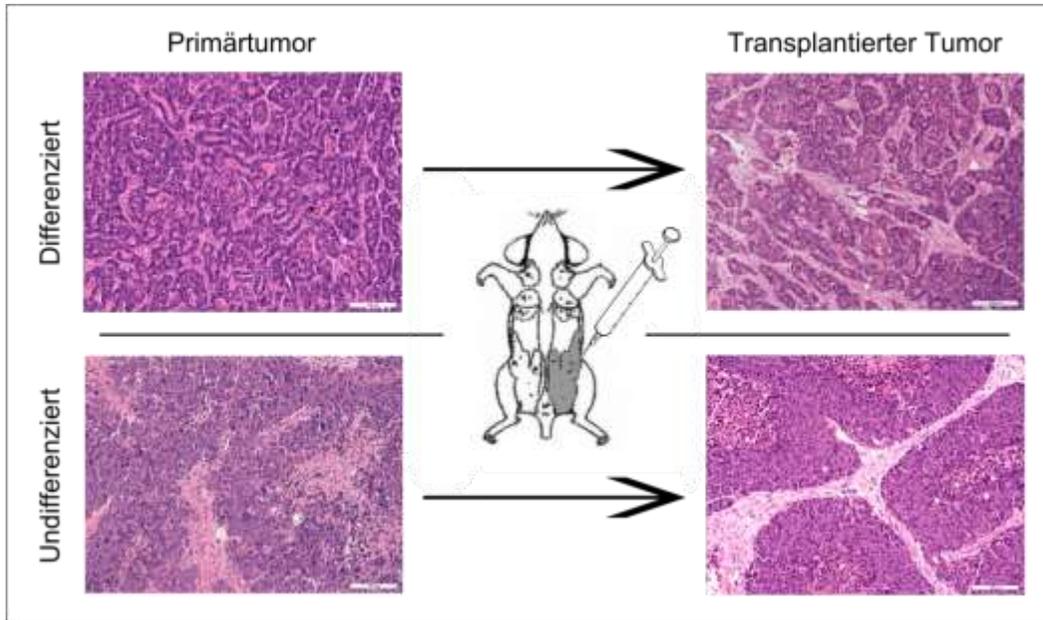


Abbildung 24: Morphologie primärer und transplantierter WAP-T-NP8 Tumoren

Darstellung von mit H&E gefärbten, 4 µm dicken Paraffinschnitten aus WAP-T-NP8 Tumoren. Die obere Zeile stellt mikroskopische Aufnahmen eines differenzierten Primärtumors (links) und eines nach Transplantation entstandenen Tumors dar. Undifferenzierte primäre (links) und nach Transplantation entstandene (rechts) Tumore werden in der unteren Zeile gezeigt. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 20x Objektiv eines Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer ProgRes C12 CCD-Kamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) versehen war. Maßstab: 100 µm.

Tabelle 18: Tabellarische Darstellung des Grads der nach Transplantation gewachsenen Tumore

Transplantation von Primärtumorzellen in syngene Empfängertiere nach serieller Dilution

		Ausgangstumore											
		Kohorte #1		Kohorte #2		Kohorte #3		Kohorte #4		Kohorte #5		Kohorte #6	
		13197-2	Grad 2	13220-2b	Grad 2	13198-5	Grad 3	13204-7	Grad 3	13205-4	Grad 3	13225-3	Grad 3
Transplantierte Zellanzahl	10 ⁴ Zellen		<u>G3</u>	G2	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	
	10 ³ Zellen	-	-	G2	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	
	10 ² Zellen	-	-	G2	G3	G3	G3	G3	-	G3	G3	G3	
	10 ¹ Zellen	-	-	-	G3	G3	G3	-	-	-	-	-	

Zusammen mit der Heterogenität der *lineage*-Markerverteilung (Abs. IV.1.1.1 und IV.1.1.2) und dem Tumorinitiierungspotential (Abs. IV.1.3) ist die Phänotyprekapitulierung eine dritte, für Tumorstammzellen beschriebene Eigenschaft und weist erneut darauf hin, dass WAP-T Tumore Zellen mit Vorläufereigenschaften enthalten.

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob sich die Tumorstammzellen der WAP-T Tumore mithilfe von in der Literatur beschriebenen Markern isolieren lassen. Da die Untersuchung von Tumorstammzeleigenschaften in WAP-T Primärtumorzellen aufgrund der langen Entwicklungsdauer und der limitierten Anzahl von verfügbaren endogenen Tumoren sowie des komplizierten und zeitintensiven Primärzell-Dissoziierungsverfahren ein schwieriges und langwieriges Vorhaben ist, wurden bereits etablierte Mammakarzinomzelllinien aus WAP-T Tumoren verwendet, die ebenso wie endogene WAP-T Tumore in parallelen Experimenten untersucht werden sollten. Voraussetzung für das Einbeziehen einer Zelllinie in den folgenden Experimenten war dabei, dass die verwendeten Zellen die Eigenschaften der Primärtumore, wie z. B. Heterogenität der Expression von *lineage*-Markern oder tumorinizierende Eigenschaften in syngenesischen Mäusen, widerspiegeln.

IV.1.4 Charakterisierung und Relevanz der G-2 Zelllinie für das WAP-T Mausmodell

G-2 Zellen wurden aus einem undifferenzierten bi-transgenen Mammakarzinom der WAP-T1 x WAP-H22 Mauslinie etabliert, die zusätzlich zur frühen Genregion von SV40 ein mutiertes p53-Gen ($\text{mutp53}^{\text{R270H}}$) unter Kontrolle des WAP-Promotors aufweist (Heinlein, Krepulat et al. 2008; Wegwitz, Kluth et al. 2010). Eine H&E-Färbung des Primärtumors wird in Abbildung 25: Charakterisierung der G-2 Zelllinie dargestellt. (Für Details zur Etablierung der Zelllinie siehe Wegwitz, Kluth et al. 2010). Zur Charakterisierung wurden G-2 Zellen auf Deckgläser ausgesät und nach drei Tagen Kultivierung Immunfluoreszenzfärbungen unterzogen (III.2.2.5). Hierbei wurde die Expression von SV40 LT, sowie die Expression der *lineage*-Marker Cytokeratin 18 und 14 analysiert. Die Ergebnisse dieses ersten *in vitro* Charakterisierungsschritts werden in der Abbildung 25 dargestellt. G-2 Zellen in der Kultur weisen eine pflastersteinartige Morphologie auf, die typisch für Epithelzellen *in vitro* ist (Abbildung 25B). Wichtig für die Vergleichbarkeit der Zellen mit WAP-T Tumoren ist die Expression des Transgens, der frühen SV40 Genregion. Die Färbungen zeigten, dass G-2 Zellen zwar eine heterogene, aber stabile Expression von SV40 LT aufweisen (Abbildung 25C). Analog zu der Situation im Tumor akkumuliert Wildtyp p53 zusammen mit SV40 -LT in den Zellkernen von G-2 Zellen, was die aktive Stabilisierung und Inhibition des Tumorsuppressors durch Bindung an SV40 LT reflektiert (Abbildung 25E). Weiterhin zeigten die Immunfluoreszenzfärbungen, dass G-2 Zellen, wie undifferenzierte Primärtumore, eine heterogene

Expression der beiden Marker CK14 und CK18 aufweisen (Abbildung 25E, Abbildung 25F). Interessanterweise konnte in beiden Fällen Cytokeratin negative Zellen beobachtet werden. Angesichts der Expression des Transgens und beider Cytokeratine ähneln kultivierte G-2 Zellen den endogenen WAP-T Tumoren (siehe Abs. IV.1.1.1). Durch Klonierungsexperimente konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachtete phänotypische Heterogenität der G-2 Zellen auf einen multiklonalen Ursprung dieser Zellen zurückzuführen ist. Diese Heterogenität ist demnach eine intrinsische Eigenschaft von G-2 Zellen.

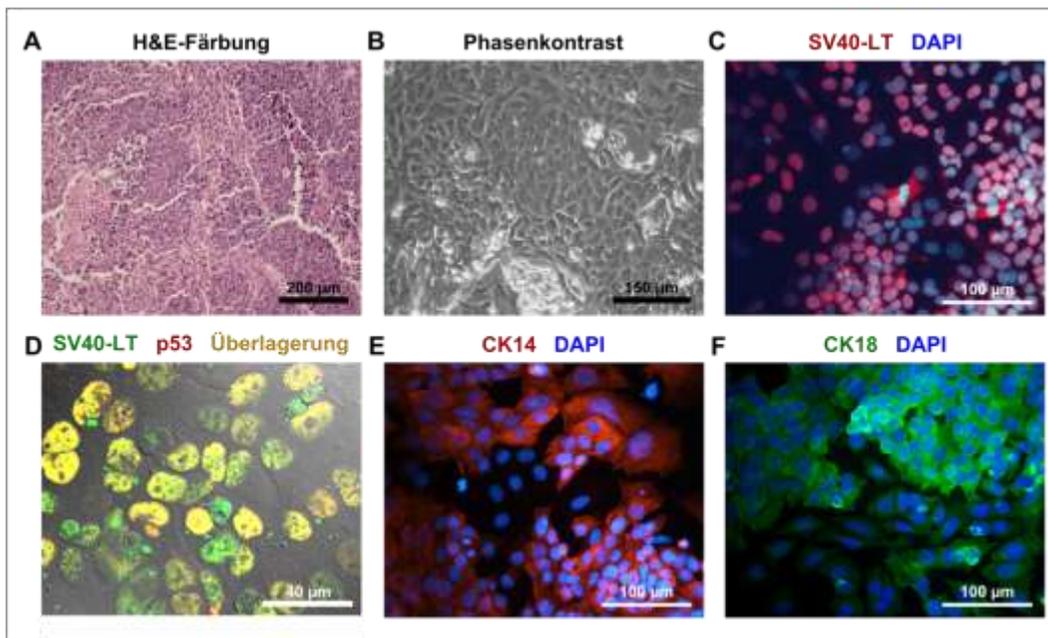


Abbildung 25: Charakterisierung der G-2 Zelllinie

A: Darstellung eines H&E gefärbten, 4 µm dicken Paraffinschnitts aus dem G-2 Ursprungstumor #10650-1 (Mauslinie WAP-T1 x WAP-H22). Die Aufnahme erfolgte mit dem 16x Luftobjektiv eines Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer ProgRes C12 CCD-Kamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) versehen war. **B:** Phasenkontrastaufnahme von G-2 Zellen (Passage 9) nach 3 Tagen in der Kultur. **C-G:** Immunfluoreszenzfärbungen von G-2 Zellen (3 Tage auf Deckgläsern kultiviert): SV40-LT in Rot (**C**); SV40-LT in Grün und p53 in Rot (**D**); CK14 in Rot (**E**); CK18 in Grün (**F**). Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert und mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa®- bzw. DyLight®-gekoppelte sekundäre Antikörper. Die Aufnahmen **B**, **C**, **E** und **F** wurden mit einem Leica DMI6000B Mikroskops (10x Luftobjektiv bzw. 20x Ölobjektiv, Leica, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt, während die Aufnahme **D** mit dem 63x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gemacht wurden. Die Zellkerne wurden in **C**, **E** und **F** mit DAPI angefärbt. Maßstäbe: **A:** 200 µm, **B:** 150 µm, **C**, **E** und **F:** 100 µm, **D:** 40µm.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum für die Analyse von Stammzeleigenschaften der G-2 Zellen ist das Potential, Tumore nach Transplantation in syngenem Mäusen zu initiieren. Um diese Eigenschaft zu untersuchen, wurden wie im Abs IV.1.2 beschrieben, G-2 Zellen in verschiedenen Mengen (10^6 bis 10^1 Zellen) orthotopisch in der Brustdrüse #3 von WAP-T-NP8 Empfängertieren transplantiert (Abbildung 19). Die Tabelle 19 zeigt die Anzahl der transplantierten Tiere sowie die Erfolgsquote der

Tumorinitiierung. Es stellte sich heraus, dass die Transplantation von nur 10 G-2 Zellen eine über 80%-ige (10 von 12 Transplantationen) Tumorwachstumserfolgsquote aufweist. G-2 Zellen enthalten also eine hohe Anzahl tumorinitiierender Zellen und unterscheiden sich damit nicht von undifferenzierten endogenen WAP-T Tumoren (Abbildung 23). Wie erwartet, erhöhten sich die Latenz zwischen Transplantation und detektierbaren Tumorwachstum sowie die Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten je geringer die transplantierte Zellanzahl wurde.

Tabelle 19: Tumorinitiierende Eigenschaften der G-2 Zelllinie in WAP-T-NP8 Empfängertieren

injizierte Zellanzahl	Tumore / Injektionen	Latenz bis zum Tumorwachstum (in Tagen ± Standardfehler des Mittelwerts)
10⁶	6/6	7.3 ± 0.4
10³	6/6	16.3 ± 6.3
10²	5/6	23.8 ± 10.9
10¹	10/12	44.8 ± 24.2

Für eine gute Vergleichbarkeit mit endogenen WAP-T Tumoren sind die Charakteristika von G-2 transplantierten Tumoren entscheidend. So wurden die durch Transplantation von G-2 Zellen induzierten Tumore bezüglich Morphologie und Cytokeratin-Expression untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass transplantierte G-2 Tumore eine Morphologie aufweisen, die der Morphologie von undifferenzierten WAP-T Tumore sehr ähnlich ist (Abbildung 26A-Abbildung 26C). Zusätzlich weisen Cytokeratine in G-2 Tumoren ein vergleichbares Expressionsmuster zu WAP-T Tumoren auf, d.h. eine ubiquitäre Expression von CK8/18 mit einzelnen, aber nicht selten vorkommenden CK14 positiven Tumorzellen. Wie für endogene Tumore wurden Co-Färbungen von CK8/18 und CK14 mit SV40-LT durchgeführt, um den Tumorursprung dieser Zellen zu bestätigen (Abbildung 26E, Abbildung 26F im Vergleich zur Abbildung 14E/Abbildung 14F). Ebenso wie im WAP-T Tumor kann eine inverse Korrelation zwischen der Expressionsintensität von CK14 und von CK8/18 in den Zellen von G-2 Tumoren beobachtet werden (Abbildung 26F im Vergleich zur Abbildung 14F).

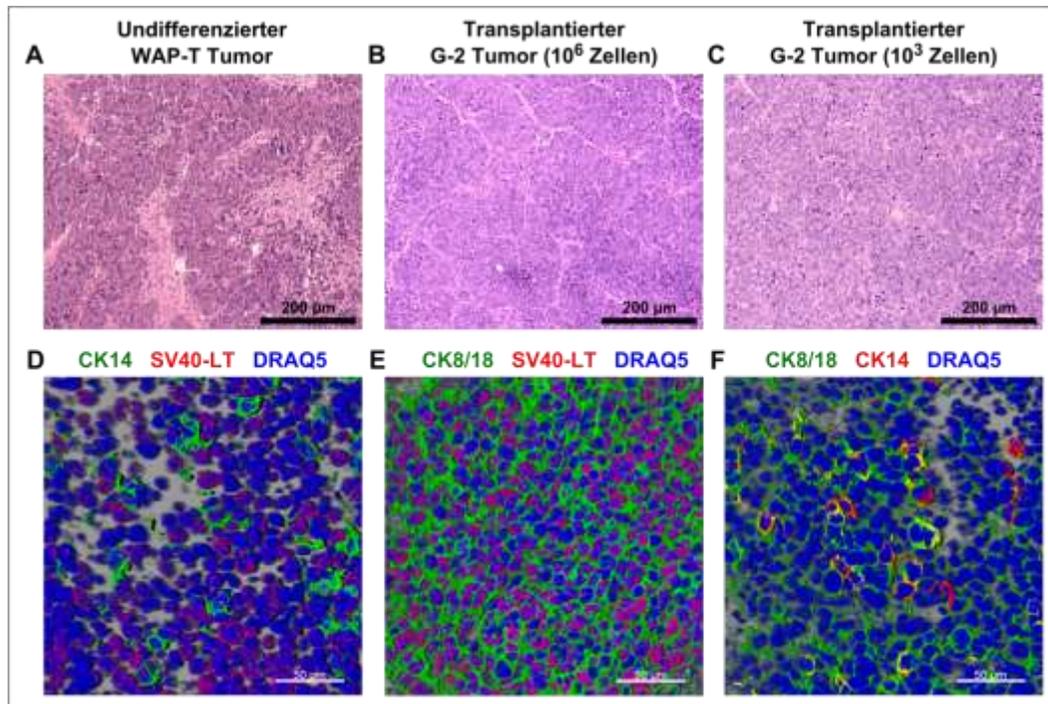


Abbildung 26: Charakterisierung von Tumoren aus transplantierten G-2 Zellen

A-C: Exemplarische H&E Färbungen von 4 µm dicken Paraffinschnitten aus einem undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumor (**A**) und zwei transplantierten G-2 Tumoren aus 10^6 Zellen (**B**) bzw. 10^3 Zellen (**C**) in WAP-T-NP8 Empfängertieren. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 20x Luftobjektiv eines Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer ProgRes C12 CCD-Kamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) versehen war. **D-F:** Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen auf 8 µm dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte von G-2 Tumoren (10^3 Zellen transplantiert). Die Antikörper wurden in folgenden Kombinationen angewendet: CK14 mit SV40-LT (**D**), CK8/18 mit SV40-LT (**E**) und CK8/18 mit CK14 (**F**). Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gemacht. Alle mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstäbe: **A, B** und **C**: 200 µm; **D, E** und **F**: 50 µm.

Zusammenfassend konnte durch diese Charakterisierung festgestellt werden, dass G-2 Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* endogenen undifferenzierten WAP-T Mammakarzinomen hinsichtlich Morphologie und *lineage*-Marker Expression sehr ähneln. G-2 Zellen sind somit ein relevantes Modell für die Untersuchung der Fragestellung, ob WAP-T Tumorstammzellen sich mit in der Literatur beschriebenen Markern isolieren lassen. Zudem wurde beobachtet, dass selbst nach enzymatischer Dissoziation, Antikörpermarkierung und Sorten mittels durchflusszytometrischen Verfahren G-2 Zellen eine sehr gute Vitalität aufweisen. Diese Eigenschaften machen G-2 Zellen durchaus geeignet für Subpopulationsanalysen. Aus diesem Grund wurden G-2 Zellen den gleichen Analysen wie WAP-T Tumore unterzogen.

IV.1.5 Zellpopulationen mit Tumorstammzelleigenschaften in WAP-T Tumoren

Wie in der Einleitung beschrieben, können Stamm- und Vorläuferzellen der normalen murinen Brustdrüse mithilfe verschiedener Oberflächenmarker angereichert werden. Antikörper gegen Integrin $\alpha 6$ (CD49f), Intergrin $\beta 1$ (CD29), Integrin $\beta 3$ (CD61) und „Heat Stable Antigen“ (HSA, auch bekannt als CD24) wurden für diesen Zweck in verschiedenen Kombinationen erfolgreich angewendet. Charakteristische Merkmale von Vorläufer- und Stammzellen waren hierbei folgende Expressionsprofile: CD24⁺/CD49f⁺, CD24⁺/CD29^{high} oder CD24⁺/CD61⁺ (Shackleton, Vaillant et al. 2006; Stingl, Eirew et al. 2006; Cho, Wang et al. 2008; Vaillant, Asselin-Labat et al. 2008). Auch Tumorstammzellen konnten je nach Mammakarzinom-Mausmodell (siehe Abs. I.4.3) durch Anwendung einer dieser Kombinationen angereichert werden (Shackleton, Vaillant et al. 2006; Cho, Wang et al. 2008). Ein weiterer Marker, der in der normalen Brustdrüse und in Tumoren mit Vorläufereigenschaften in Zusammenhang gebracht wird, ist Sca 1 (Stem Cell Antigen 1) (Welm, Tepera et al. 2002; Grange, Lanzardo et al. 2008).

Die hohe Anzahl der oben beschriebenen Phänotypen für Stammzellen und Tumorstammzellen der murinen Brustdrüse erschwert die Entscheidung, welche Antikörperkombination sich am besten für die Isolierung von Tumorstammzellen aus WAP-T Tumoren eignet. Die Anwendung funktioneller Eigenschaften von Vorläuferzellen als Marker für deren Anreicherung stellt eine elegante Alternative zu den klassischen Oberflächenmarker-Kombinationen dar. In den letzten Jahren wurde in diesem Zusammenhang immer häufiger die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (Aldh) als funktioneller Stamm- und Tumorstammzellmarker beschrieben (Ginestier, Hur et al. 2007; Douville, Beaulieu et al. 2008). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Aldh-Aktivität in den Zellen von WAP-T Mammakarzinomen untersucht und ein Zusammenhang mit Tumorstammzelleigenschaften überprüft.

IV.1.5.1 Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität in WAP-T Tumoren

Um die Aktivität der Aldh im WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell zu untersuchen, wurde das Aldefluor®-Detektionskit angewendet. Das Prinzip basiert auf der Umwandlung eines ungeladenen fluoreszierenden Substrates (BODIPY-Aminoacetaldehyde, BAAA) in ein geladenes Produkt (BODIPY-Aminoacetate, BAA) durch die Aldh. Geladen verliert das Produkt die Fähigkeit durch die Plasmamembran zu diffundieren, akkumuliert somit in Zellen mit hoher Aldh-Aktivität und erhöht dementsprechend deren Fluoreszenz. In dieser Arbeit werden stark fluoreszierende und schwach bzw. nicht fluoreszierende Zellen jeweils als Aldh^{bright} (Aldh^{br}) und Aldh^{low} bezeichnet.

Zunächst wurde untersucht, ob WAP-T-NP8 Tumore eine Aldh^{br}-Zellpopulation enthalten. Hierfür wurden drei undifferenzierte WAP-T-NP8 Tumore verwendet. Die Primärzellen wurden wie für

Transplantationszwecke unter sterilen Bedingungen dissoziiert, Lin⁺ Zellen wurden entfernt (*lineage*-Depletion, Abs. III.3.2.2) und Lin⁻ Tumorzellen wurden mit Aldefluor[®] gefärbt. Die Negativkontrolle für die Einstellungen der *Sorting-Gates* erfolgte durch Zugabe von Diethylaminobenzaldehyde (DEAB), ein Inhibitor der Aldh-Aktivität (Abs. III.3.3.1). Alle drei untersuchten Tumoren enthielten eine Aldh^{br}-Tumorzellpopulation. Allerdings stellte diese Population je nach Tumor 6% bis 14% aller Zellen dar und zeigte somit deutliche Schwankungen. Die Aldh^{low}-Zellpopulation schwankte ebenfalls und bildete 50% bis 65% der Tumormasse (Abbildung 28A). Um die Expressionsprofile und Wachstumseigenschaften der Aldh^{low}- und Aldh^{br}-Tumorzellen weiter untersuchen zu können, wurden für die jeweiligen Tumore beide Populationen mittels FACS getrennt (siehe Abs. III.3.3.3). Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass die Aldh^{low}- und Aldh^{br}-*Sorting-Gates* nicht überlappen (siehe Histogramm in Abbildung 28A).

Es stellte sich die Frage, ob die erhöhte Aktivität einer spezifischen Aldehyd-Dehydrogenase für die Aldefluor[®]-Färbung verantwortlich ist, und ob der Aldh^{br}-Phänotyp mit CSC-Eigenschaften in den WAP-T Tumorzellen korreliert. Die Superfamilie der Aldehyd-Dehydrogenase besteht aus 11 Subfamilien und einer Vielzahl von Isotypen, die zelltypspezifisch unterschiedlich exprimiert werden (Sophos and Vasiliou 2003; Vasiliou 2009). In der Maus (*Mus musculus*) sind 20 verschiedene Aldh-Gene bekannt. Die fünf Isotypen Aldh1a1, Aldh1a2, Aldh1a3, Aldh1a7 und Aldh8a1 sind im Metabolismus der Retinsäure involviert und spielen dadurch eine entscheidende Rolle in der Regulation des Gleichgewichts zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung von Vorläuferzellen (Evans 1988; Duester 2008; Mark, Ghyselinck et al. 2009). Andere Aldh-Isotypen sind in diversen Prozessen wie z.B. in der Nukleinsäure-Biosynthese (Aldh111, Aldh112), in der Animosäure-Biosynthese (Aldh18a1) oder in Entgiftungsmechanismen (Aldh2, Aldh3a1, Aldh4a1, Aldh6a1 Aldh7a1 usw.) aktiv beteiligt (Vasiliou 2009). Somit sind nahezu alle Aldh-Isotypen auch in für Tumorzellen wichtigen biologischen Prozessen involviert.

Anhand der RNA-Expressionsarraydaten, die schon für die Analyse der Cytokeratinexpression im IV.1.1.3 angewendet wurden, wurde die Anwesenheit der unterschiedlichen Isotypen in WAP-T-NP8 Tumoren eingeschätzt. Hierfür standen Daten aus sieben differenzierten, acht undifferenzierten und drei transplantierten Tumoren aus G-2 Zellen (im Abschnitt IV.1.4 ausführlich beschrieben) zur Verfügung. Die Analyse der Expressionsarraydaten zeigte, dass zahlreiche Aldh-Isotypen in WAP-T Tumoren exprimiert werden: die RNA-Transkripte der Aldh1a3, 111, 2, 3a2, 5a1, 7a1, 9a1, 16a1 und 18a1 konnten in basalen bis hohe Mengen detektiert werden, während die Isotypen 3b1 und 3b2 schwach, aber detektierbar exprimiert waren (Abbildung 27). Außerdem wurde beobachtet, dass Transkripte der Isotypen 1a1, 1a2, 1a7, 1b1, 3a1, 4a1 und 8a1 in WAP-T-NP8 Tumoren kaum vorhanden bis abwesend sind. Die Aldh3a1

wird als negativer Regulator des Zellzyklus beschrieben, was erklären könnte, warum kein Transkript dieses Gens in den schnell replizierenden WAP-T Tumorzellen nachweisbar ist (Pappa, Brown et al. 2005). Außerdem ist ersichtlich, dass sich differenzierte und undifferenzierte WAP-T-NP8 Mammakarzinome sowie G-2 transplantierte Tumore in der Expression von Aldh-Isotypen kaum unterscheiden.

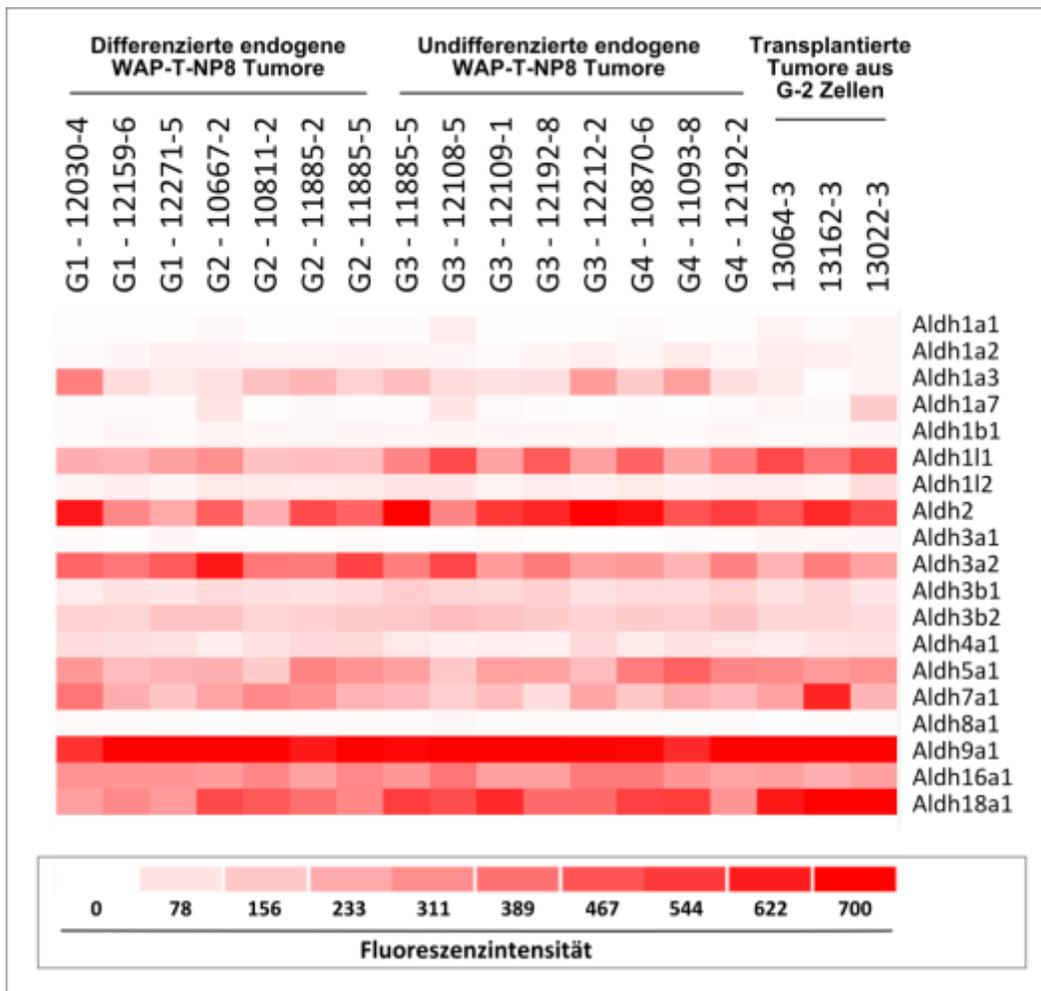


Abbildung 27: Expression der verschiedenen Aldh-Isotypen in WAP-T-NP8 Tumoren und in transplantierten G-2 Tumoren (RNA-Microarray Daten)

Darstellung der Expression verschiedener Aldh-Isotypen als Heatmap. Die Expressionswerte wurden aus RNA-Microarray Daten differenzierter (n=7) und undifferenzierter (n=8) WAP-T-NP8 Tumore sowie transplantiierter Tumore aus G-2 Zellen, einer Zelllinie, die aus einem WAP-T x WAP-mutp53-Tumor etabliert wurde, (n=3) extrahiert. Die Ergebnisse werden in roher Fluoreszenzintensitätseinheit angezeigt. Die Tumorproben wurden einer RNA-Extraktion mit Trifast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) unterzogen. Die Microarray Analysen erfolgten auf der Affymetrix Mouse 430 v2.0 Plattform und wurden mit der DChip Software ausgewertet.

Anhand dieser Ergebnisse wurden PCR-Primer für die in WAP-T Tumoren exprimierten Aldh-Isotypen konzipiert. Die Isotypen 1a1, 1a7 und 8a1 wurden trotz sehr geringer Transkriptmenge in den

RNA-Microarrays (Abbildung 27) wegen ihrer beschriebenen Retinaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität mit einbezogen. Aldh1b1 und -3a1 wurden ausgeschlossen. Diese Primer (gelistet in Tabelle 20) wurden in späteren Expressionsanalysen eingesetzt.

Für die Expressionsanalyse wurde jeweils ein Teil der Aldh^{low}- und Aldh^{br}-Tumorzellpopulationen zur mRNA-Aufreinigung, cDNA-Synthese und anschließend zur quantitativen PCR verwendet. Die Expressionsstärke von 18 Aldh-Isotypen wurde in den Aldh^{br} und Aldh^{low} Populationen aus WAP-T-NP8 Tumorzellen bestimmt und verglichen. Hierbei sollte ermittelt werden, welche Dehydrogenase für den Aldh^{br}-Phänotyp verantwortlich ist. Die analysierten Gene sind in Tabelle 20 aufgelistet. In diesem Experiment wurde *Hprt1* als Haushaltsgen zur Normierung der Ergebnisse angewendet. Die Expression von *Gapdh* diente als endogene Kontrolle, indem geprüft wurde, ob die Expression des Transkripts nach Normierung nicht schwankte. Jede Untersuchung wurde in Dreifach-Ansätzen durchgeführt. Bei der Auswertung dieses Experiments wurden ausschließlich Unterschiede mit einem relativen Expressionsunterschied (RQ) ≥ 2 in den drei Replikaten als signifikant betrachtet.

Tabelle 20: Liste der in die Aldh-Expressionsanalysen untersuchten Gene

Aldh1a1	Aldh1a2	Aldh1a3	Aldh1a7
Aldh1l1	Aldh1a2	Aldh2	Aldh3a2
Aldh3b1	Aldh3b2	Aldh4a1	Aldh5a1
Aldh6a1	Aldh7a1	Aldh8a1	Aldh9a1
Aldh16a1	Aldh18a1	Hprt1 (Endo)	Gapdh (Endo)

Für jeden getesteten Aldh-Isotyp in den WAP-T-NP8 Tumorzellpopulationen konnte ein Produkt detektiert werden (Abbildung 28C). Hierbei waren zwei Aldehyd-Dehydrogenasen signifikant differenziell reguliert. Aldh1a2 wurde in Aldh^{br}-Zellen zwischen 3,5-fach und 22-fach stärker als in Aldh^{low}-Tumorzellen exprimiert; das Aldh1l1-Transkript war in Aldh^{br}-Zellen zwischen 2- und 4-fach überrepräsentiert. Die Aldh1a3 war in Aldh^{br}-Zellen zwar etwas höher exprimiert als in den Aldh^{low} Zellen (1,2fach bis 1,9fach), jedoch in keinem signifikanten Maß. Ähnlich war Aldh1a1 in 2 von 3 Fällen stärker exprimiert (1,4 fach, 2,1 fach und 4,6 fach überrepräsentiert). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die erhöhte Aldh-Aktivität in den Aldh^{br}-Primärtumorzellen sich hauptsächlich aus der Überexpression der Aldh1a2 und Aldh1l1 ergibt. Darüber hinaus sind vermutlich Schwankungen der Expression von anderen Aldh-Isotypen wie z.B. von der für Aldefluor® gut beschriebenen Aldh1a1 oder von der Aldh1a3 für die Variabilität der Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Populationen verantwortlich.

Als Nächstes wurden die Tumorigenitätseigenschaften der getesteten Aldh^{low}- und Aldh^{br}-Primärtumorzellen untersucht. Dafür wurden Zellanzahl und Vitalität der jeweiligen Populationen anhand eines Aliquots mithilfe einer Trypanblau-Färbung bestimmt. Schließlich wurden jeweils 10^4 und 10^2 Aldh^{br}- bzw. Aldh^{low}-Zellen in 20 μ l Quantum-Matrigel resuspendiert und in die Brustdrüse #3 jungfräulicher WAP-T-NP8 Empfängertiere injiziert. Die transplantierten Mäuse wurden zweimal wöchentlich für einen Zeitraum von bis zu 9 Monaten beobachtet. Abbildung 28B fasst die Ergebnisse des Experiments zusammen. Im Fall des Mammakarzinoms 13031-2 war nur die Aldh^{br}-Zellpopulation in der Lage, mit 10^4 Zellen einen Tumor zu initiieren. Bei 10^2 transplantierten Zellen wurde kein Mammakarzinom generiert. Bei der Tumorprobe 13070-5 konnten Aldh^{low}-Zellen sowohl mit 10^4 als auch mit 10^2 Zellen einen Tumor generieren. Jedoch war es nicht möglich mit 10^2 Aldh^{br}-Zellen einen Tumor zu initiieren. Unabhängig von der Aldh-Aktivität verursachten 10^4 , nicht aber 10^2 Tumorzellen der Probe 13069-7b einen Tumor. Interessanterweise war die Erfolgsquote der Tumorigenität in diesen Experimenten wesentlich geringer als bei den Transplantationen von seriell verdünnten Zellen (siehe Abs IV.1.3). Eine mögliche Begründung wäre, dass zusätzlich zur Dissoziation und *Lineage*-Depletion, welche bereits Stressfaktoren für die Tumorzellen darstellen, die Aldefluor®-Färbung und insbesondere die Zellsortierung die Überlebensrate der Tumorzellen stark vermindern. Hinsichtlich der divergierenden Ergebnisse der Transplantationsexperimente kann zudem die Aktivität der Aldh nicht als eindeutiger Marker für Tumorstammzellen oder tumorigenitäre Zellen in den endogenen WAP-T Mammakarzinomen verwendet werden.

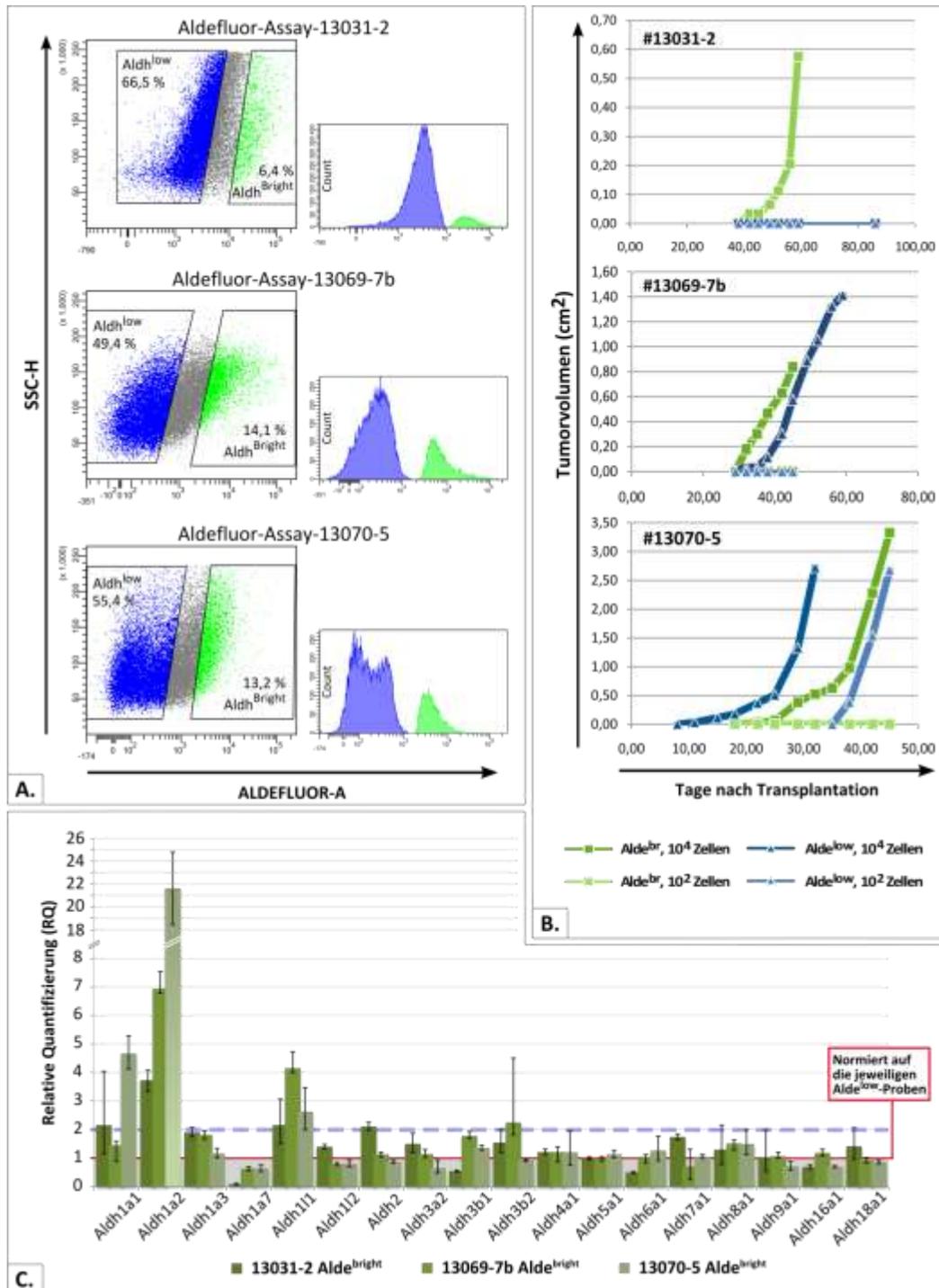


Abbildung 28: Eigenschaften der Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Zellpopulationen aus WAP-T-NP8 Tumoren bezüglich Tumorinitiation und Expression von Aldh-Isotypen

A: Darstellung der Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Zellpopulationen von WAP-T-NP8 Primärtumoren (n=3) als Dotplot und Histogramm. Die Dissoziation der Primärtumorzellen erfolgte durch Kollagenase-Verdau; die Primärzellen wurden einer lineage-Depletion unterzogen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland); anschließend wurden die Zellen mit dem Aldefluor® Kit (**Stemcell Technologies, Köln, Deutschland**) gefärbt und die Aldh^{br} und Aldh^{low} Zellpopulationen mittels BD FACS-Aria (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) voneinander getrennt. Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Färbung geprüft. **B:** Wachstumskurven von Tumoren aus Aldh^{br}/Aldh^{low}

transplantierten Primärtumorzellen; für jeden Tumor wurden 10^4 und 10^2 Zellen der jeweiligen Populationen in 20 μ l Quantum-Matrigel (1:1) resuspendiert und in die Mammagewebe #3 der Empfängertiere injiziert. Transplantierte Tiere wurden zweimal wöchentlich abgetastet und der Tumordurchmesser wurde für eine Beobachtungszeit von maximal 9 Monaten bestimmt. **C:** Relativer Expressionsunterschied verschiedener Aldh-Isotypen in den Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Zellpopulationen von undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumoren (n=3). Die RNAs wurden mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR untersucht. Die Analysen erfolgten in einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) und wurden mit der Software SDS v1.4 ausgewertet. Jede Messung wurde als Dreieransatz durchgeführt (ca. 5ng cDNA pro Messung). Die Expressionswerte der Proben wurden auf Hprt1 normiert; Gapdh, ein zweites Haushaltsgen, lief als interne Kontrolle. Die Expressionsunterschiede werden als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte dargestellt wobei jeweils die Aldh^{low}-Zellpopulation als Kalibrator diente (Ct: *cycle threshold*). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

IV.1.5.2 Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität in G-2 Tumorzellen

Um die Limitationen des Arbeitens mit primären Zellen zu umgehen, wurde alternativ G-2 Mammakarzinomzellen für die Untersuchung der Aldh-Aktivität als Tumorstammzellmarker eingesetzt. G-2 Zellen haben den Vorteil gegenüber primären WAP-T Tumorzellen, dass sie eine gute Vitalität nach Aldefluor®-Färbung und Durchflusszytometrieverfahren aufweisen, was sie zu einem geeigneten Werkzeug für die Untersuchung dieser Fragestellung macht.

Zunächst wurde die relative Expression verschiedener Aldh-Isotypen in G-2 Zellpopulationen bestimmt. Hierfür wurden G-2 Zellen in drei unabhängigen Replikaten (Passage 24, 40 und 50) mittels Aldefluor®-Assay gefärbt und die zwei Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Zellpopulationen wurden durch FACS isoliert. G-2 Zellen zeigten je nach Replikat eine Aldh^{br}-Population von 25 bis 35% und eine Aldh^{low}-Population, die zwischen 13 und 30% variierte (Abbildung 29A). Die mRNAs dieser Proben wurden aufgereinigt und in cDNA konvertiert. Anschließend wurde die Transkriptmenge der jeweiligen Probe durch quantitativen PCR bestimmt. Dabei wurden dieselben Gene wie im vorangegangenen Versuch untersucht (Tabelle 20). Die Abbildung 29C fasst die Expression von Aldh-Isotypen in G-2 Zellen zusammen. Es konnte keine signifikante Produktamplifikation für die Aldh1a2, -3b2 und -8a1 detektiert werden (kein Signal unter 35 Zyklen). Daher wurden diese 3 Isoformen im Histogramm nicht dargestellt. Bei 14 der 15 untersuchten Aldehyd-Dehydrogenase-Isoformen zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Alde^{br} und Alde^{low} G-2 Zellpopulationen. Allerdings konnte eine reproduzierbare 3,5 fach erhöhte Expression der Aldh1a3 in den Zellen der Alde^{br}-Population nachgewiesen werden. Die Expression von Aldh1a1, Aldh2 und Aldh3a2 war schwach, jedoch nicht signifikant erhöht (jeweils um 0,7 bis 1,8 fach, 1,3 bis 1,9 fach und 1,4 bis 2 fach). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass Aldh1a3 möglicherweise für die erhöhte Aldh-Aktivität der Alde^{br} G-2 Zellen in der Zellkultur verantwortlich ist und dass andere Aldehyd-Dehydrogenasen zu Schwankungen oder Verstärkungen des Signals führen können. Die komplette Abwesenheit der Aldh1a2 in G-2 Zellen stellt einen wesentlichen Unterschied zu den Primärtumorzellen dar, bei denen dieser Isotyp am stärksten differenziell reguliert ist.

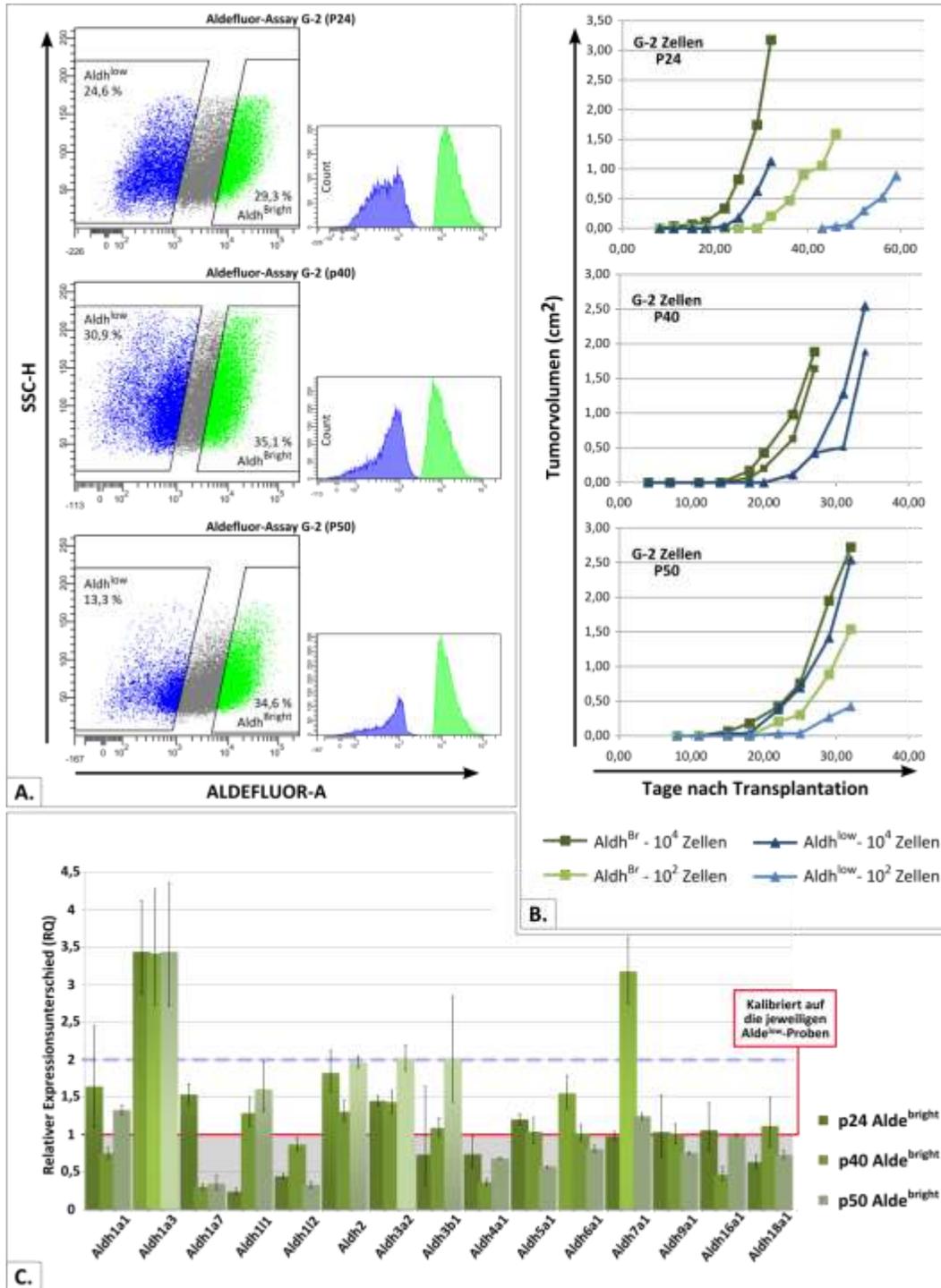


Abbildung 29: Eigenschaften der Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Zellpopulationen aus G-2 Zellpopulationen bezüglich Tumorinitierung und Expression von Aldh-Isotypen

A: Darstellung der Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Populationen drei verschiedener Passagen (p24, p40 und p50) von G-2 Zellen als Dotplot und Histogramm. Die Zellen wurden mit dem Aldefluor Kit (Stemcell Technologies, Köln, Deutschland) gefärbt; die Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Zellpopulationen wurden mithilfe des BD FACS-Aria (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) voneinander getrennt. Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Färbung geprüft. **B:** Wachstumskurven von Tumoren aus Aldh^{br} und Aldh^{low} transplantierten G-2 Zellen (p24, p40 und p50); für jede G-2 Passage wurden 10⁴ und 10² Zellen der jeweiligen Populationen in 20 µl Quantum-Matrigel (1:1) resuspendiert und

in die Mammagewebe #3 der Empfängertiere injiziert. Transplantierte Tiere wurden zweimal wöchentlich abgetastet und gemessen für eine Beobachtungszeit von maximal 9 Monaten. C: RNAs aus den Aldh^{br}- und Aldh^{low}-Populationen der drei G-2 Passagen (p24, p40, p50) wurden mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR untersucht. Die Analysen erfolgten in einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) und wurden mit der Software SDS v1.4 ausgewertet. Jede Messung wurde als Dreieransatz durchgeführt (ca. 5 ng cDNA pro Messung). Die Expressionswerte der Proben wurden auf Hprt1 normiert; Gapdh, ein zweites Haushaltsgen, lief als interne Kontrolle. Die Expressionsunterschiede werden als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte dargestellt wobei jeweils die Aldh^{low}-Zellpopulation als Kalibrator diente (Ct: *cycle threshold*). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

Als Nächstes wurden die Tumorinitiierungseigenschaften der G-2 Aldh^{low}- und Aldh^{br}-Zellpopulationen der drei Passagen p24, p40 und p50 in WAP-T-NP8 Empfängertieren untersucht. Die Zellvitalität der durch FACS isolierten Zellen wurde durch Trypanblau Färbung bestimmt. Anschließend wurden 10^4 und 10^2 Zellen der jeweiligen Population in das Mammagewebe #3 von syngenem WAP-T Mäusen transplantiert. Abbildung 29B fasst die Ergebnisse des Tumorwachstums zusammen. In allen Experimenten erfolgte die Initiierung der Mammakarzinome durch Aldh^{br} G-2 Zellen schneller als durch Aldh^{low} G-2 Zellen. Dieser Effekt ließ sich verstärkt nach der Transplantation von 10^2 Zellen beobachten. Allerdings führten alle Transplantationen unabhängig von der Anzahl der transplantierten Zellen der jeweiligen Population (10^4 oder 10^2) zum Tumorwachstum. Angesichts dieser Ergebnisse können sowohl Aldh^{br}- als auch Aldh^{low}-Tumorzellen selbst bei geringer Zellanzahl als tumorinitiierende Zelle dienen. Somit war Aldefluor[®] erneut kein eindeutiger Marker für Tumor-initiiierende Zellen im WAP-T Mausmodell. Weiterhin konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass das Aldefluor[®]-Reagenz je nach Zelltyp bzw. Wachstumsbedingungen die Aktivität verschiedener Aldehyd-Dehydrogenasen (Aldh1a2, Aldh1a3 und Aldh1l1) aufdecken kann. Somit könnte sich die für Mamma-CSC beschriebene Spezifität von Aldefluor[®] als unzuverlässig erweisen.

Angesichts dieser Ergebnisse wurde anschließend entschieden, die Relevanz von einzelnen Oberflächenmarkern als CSC-Marker für WAP-T Tumore zu untersuchen. Hierfür wurden einerseits Immunfärbungen an Kryoschnitten und andererseits Durchflusszytometrie-Analysen durchgeführt.

IV.1.6 Analyse von WAP-T Tumoren auf CSC-assoziierte Oberflächenmarker: Immundefärbungen und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungs-Analysen

Wie bereits im Abschnitt I.4.3 und IV.1.5 beschrieben, wurden die Oberflächenmarker-Kombinationen CD24⁺/CD49f⁺, CD24⁺/CD29^{high} oder CD24⁺/CD61⁺ in verschiedenen Mammakarzinom-Mausmodellen als CSC-Marker erfolgreich angewendet. Um die Relevanz der einzelnen Marker für das WAP-T Mausmodell zu prüfen, wurden zunächst Kryoschnitte von drei differenzierten und drei undifferenzierten Tumoren (Abbildung 13) mit Antikörpern spezifisch für CD24, CD29, CD49f, CD61 und Sca1 gefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend mithilfe eines Laserkonfokal-Mikroskops durchgeführt. Ergänzend wurden parallel vereinzelte Lin⁻ Tumorzellen aus WAP-T Mammakarzinomen mit den entsprechenden farbstoffgekoppelten Antikörpern markiert und mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) analysiert (siehe Abs. III.3.3.3).

IV.1.6.1 CD24 (*Heat stable antigen*)

Die Expression von *Heat stable antigen* (CD24) ist auf allen WAP-T Tumorzellen zu detektieren. Während Variationen der Expressionsstärke zwischen den einzelnen Zellen differenzierter Tumore zu beobachten sind, weisen undifferenzierte Tumorzellen eine homogene Verteilung dieses Markers auf (Abbildung 30B). Die Stromastreifen, welche die Tumoren durchqueren, sind CD24 negativ.

Anhand der FACS-Analysen konnte bestätigt werden, dass unabhängig vom Tumorgrad nahezu alle Tumorzellen ($\leq 95\%$) CD24 exprimieren (in Abbildung 30A exemplarisch dargestellt und in Abbildung 30C zusammengefasst). Die wenigen CD24 negativen Zellen sind vermutlich einer Kontamination der Tumorzellsuspension durch Stromazellen zuzuordnen.

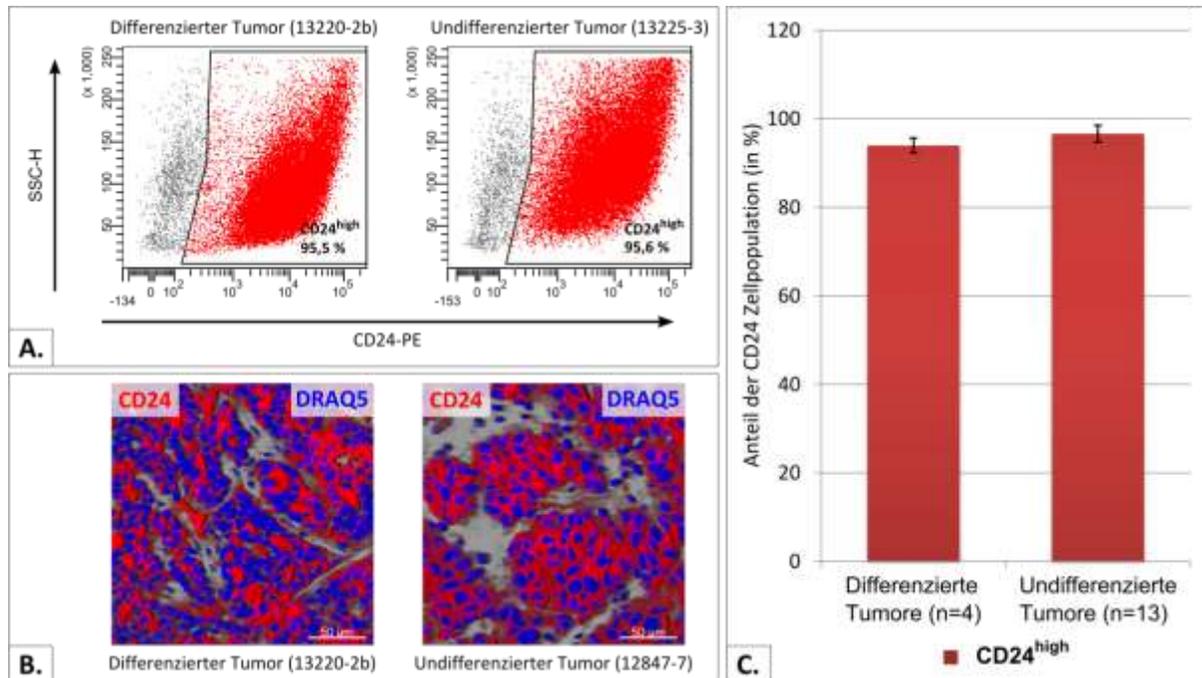


Abbildung 30: Darstellung von CD24 in WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von CD24 wurde mittels FACS-Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Dissoziierte Primärzellen aus 4 differenzierten und 13 undifferenzierten Tumoren wurden mit einem PE gekoppelten anti-CD24-Antikörper gefärbt und im BD FACS-Canto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Aufnahmen und Auswertungen wurden mit der FACS-Diva v6.1.3 Software durchgeführt. Die Ergebnisse sind exemplarisch dargestellt (A) und zusammengefasst (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts) (C). Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung (B): ein nicht gekoppelter anti-CD24 Antikörper wurde auf 8 μ m dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 μ m.

IV.1.6.2 CD49f (Integrin α 6)

Integrin α 6 (CD49f) wird ubiquitär auf WAP-T Tumorzellen detektiert (Abbildung 31B). Die Intensität der CD49f-Expression ist in differenzierten und undifferenzierten Tumoren vergleichbar, wobei größere Variationen in undifferenzierten Tumoren vorkommen. Interessanterweise zeigen differenzierte WAP-T Tumorzellen eine stärkere CD49f-Färbung ihrer basalen Membran und weisen somit eine Polarität auf. Undifferenzierte Tumorzellen hingegen zeigen keine polare Expression von CD49f. Stromazellen sind nahezu negativ für CD49f.

In den FACS-Analysen werden durchschnittlich 55% der differenzierten Tumorzellen als CD49f^{high} detektiert, während undifferenzierte Tumore zu 65% CD49f^{high} Zellen enthalten (Abbildung 31A und Abbildung 31C). Die Abweichungen der Ergebnisse zwischen Immunfärbungen auf Kryoschnitten und

FACS-Analysen sind möglicherweise auf die Zelldissoziierungsmethode zurückzuführen. Denkbar wäre, dass die durch den Antikörper zu erkennenden Epithope beschädigt (Empfindlichkeit gegenüber Trypsinverdau) bzw. unzureichend aufgedeckt wurden, was zu einem schwächeren Signal in der FACS-Analyse führt.

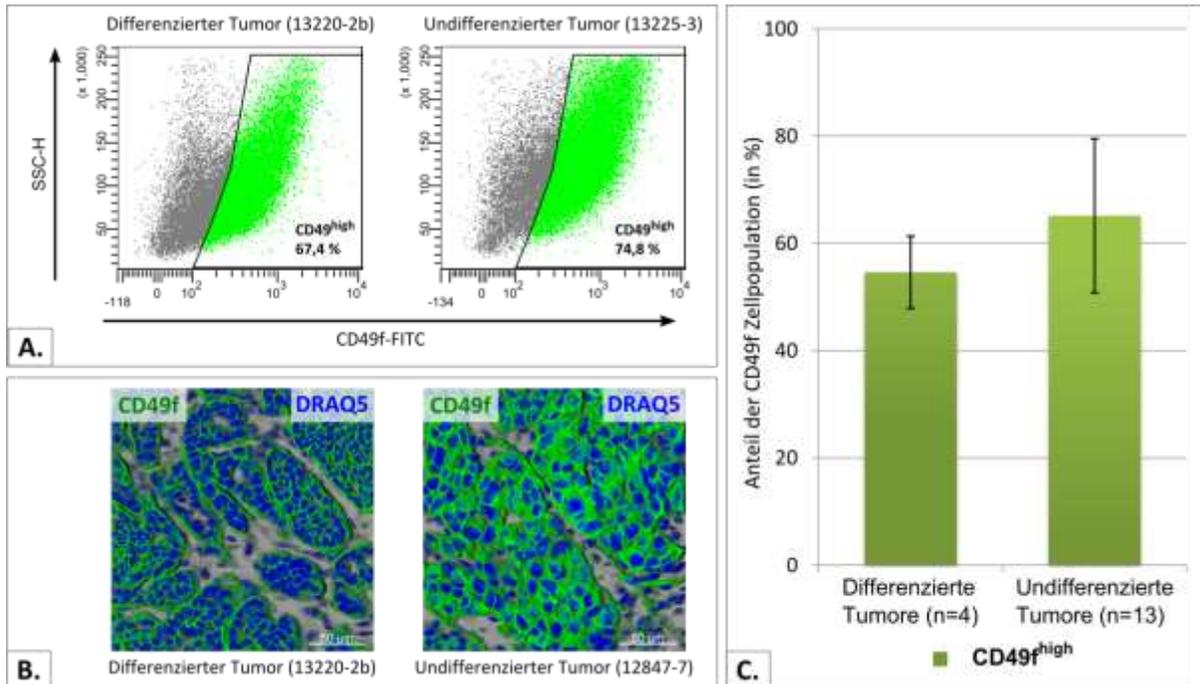


Abbildung 31: Darstellung von CD49f in WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von CD49f wurde mittels FACS-Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Dissoziierte Primärzellen aus 4 differenzierten und 13 undifferenzierten Tumoren wurden mit einem FITC gekoppelten anti-CD49f-Antikörper gefärbt und im BD FACS-Canto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Aufnahmen und Auswertungen wurden mit der FACS-Diva v6.1.3 Software durchgeführt. Die Ergebnisse sind exemplarisch dargestellt (A) und zusammengefasst (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts) (C). Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung (B): ein nicht gekoppelter anti-CD49f Antikörper wurde auf 8 μ m dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 μ m.

IV.1.6.3 CD29 (Integrin β 1)

Integrin β 1 (CD29) wird schwach bis mittelmäßig auf allen Tumorzellen detektiert (Abbildung 32B). Die Zellen des Stromakompiments weisen eine deutlich stärkere CD29-Expression als Tumorzellen auf.

Die FACS-Analysen zeigen durchschnittlich 68% bzw. 78% CD29^{high}-Zellen in jeweils differenzierten und undifferenzierten Tumoren. Ähnlich wie für CD49f sind die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der

Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie möglicherweise auf den Einfluss der Zelldissoziierungsmethode auf die Detektion zurückzuführen (Abbildung 32A und Abbildung 32C).

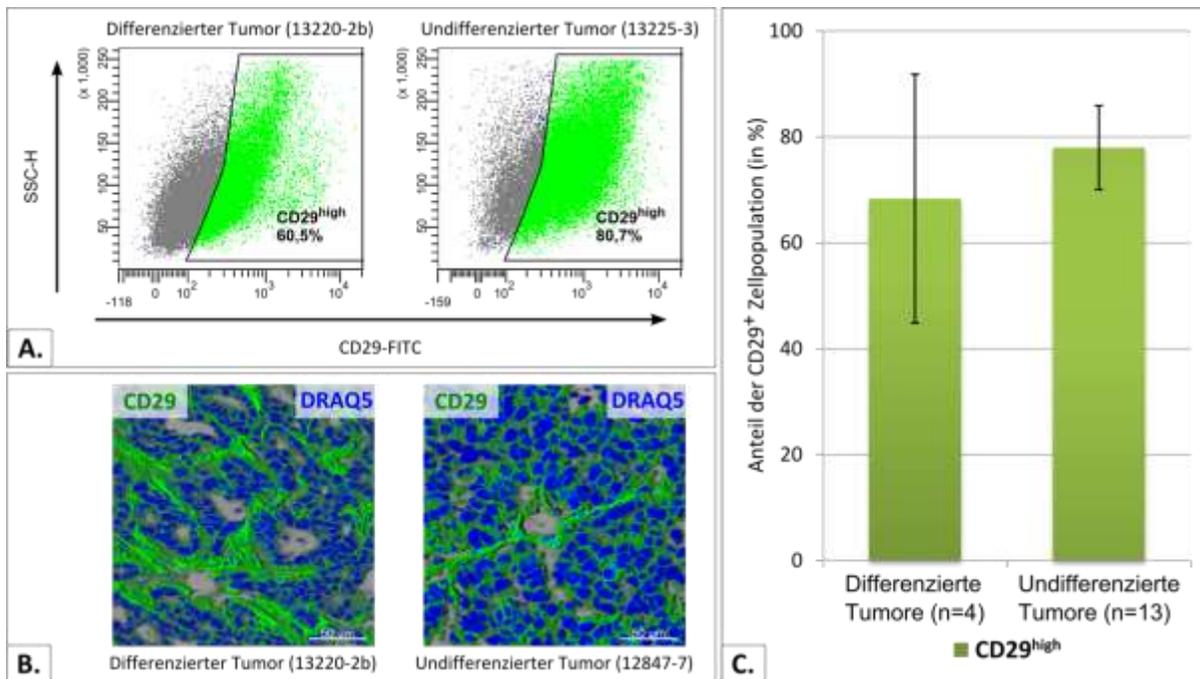


Abbildung 32: Darstellung von CD29 in WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von CD29 wurde mittels FACS-Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Dissoziierte Primärzellen aus 4 differenzierten und 13 undifferenzierten Tumoren wurden mit einem FITC gekoppelten anti-CD29-Antikörper gefärbt und im BD FACS-Canto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Aufnahmen und Auswertungen wurden mit der FACS-Diva v6.1.3 Software durchgeführt. Die Ergebnisse sind exemplarisch dargestellt (A) und zusammengefasst (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts) (C). Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung (B): ein nicht gekoppelter anti-CD29 Antikörper wurde auf 8 μ m dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 μ m.

IV.1.6.4 CD61 (Integrin β 3)

Die Immunfärbungen von Integrin β 3 (CD61) in WAP-T Tumoren zeigten unabhängig vom Differenzierungsgrad nur ein sehr schwaches Signal. CD61 war stärker auf Stromazellen als auf Tumorzellen exprimiert (Abbildung 33B).

Die Ergebnisse der FACS-Analysen zeigen durchschnittlich 32% bzw. 42% CD61^{high}-Zellen in jeweils differenzierten und undifferenzierten Tumoren. Allerdings schwankt der Anteil der CD61^{high}-Tumorzellen zwischen den einzelnen Läsionen hier deutlich stärker als bei den drei zuvor analysierten Markern (Abbildung 33A und Abbildung 33C).

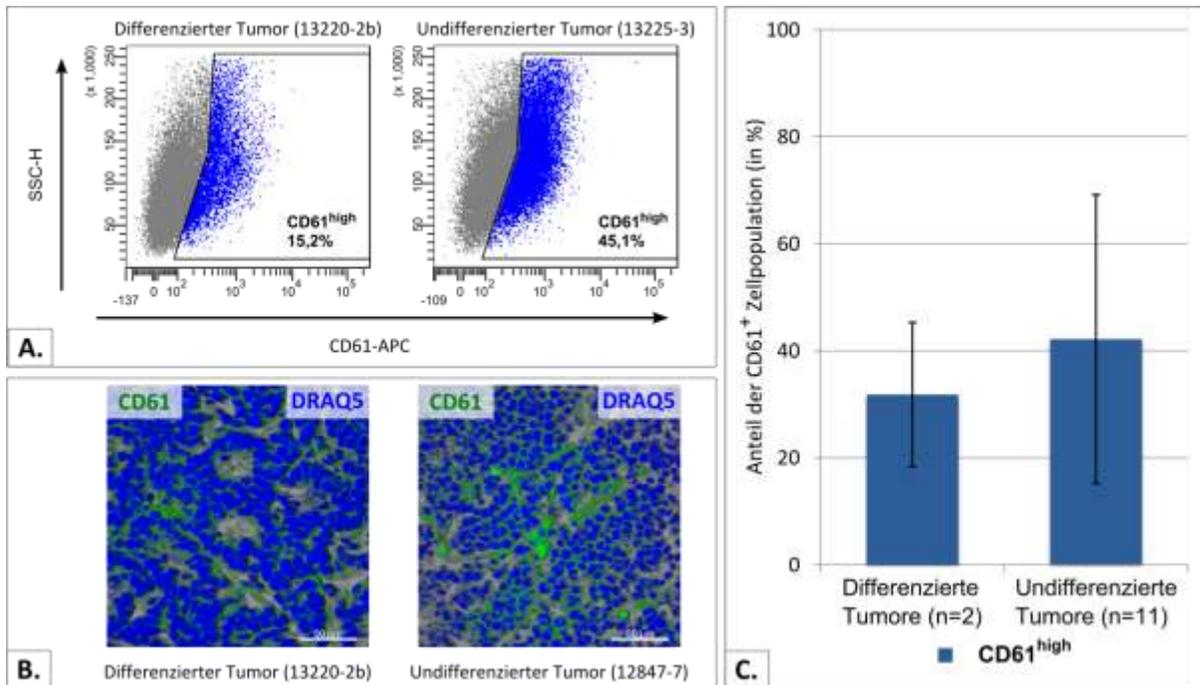


Abbildung 33: Darstellung von CD61 in WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von CD61 wurde mittels FACS-Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Dissoziierte Primärzellen aus 2 differenzierten und 11 undifferenzierten Tumoren wurden mit einem APC gekoppelten anti-CD61-Antikörper gefärbt und im BD FACS-Canto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Aufnahmen und Auswertungen wurden mit der FACS-Diva v6.1.3 Software durchgeführt. Die Ergebnisse sind exemplarisch dargestellt (A) und zusammengefasst (Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts) (C). Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung (B): ein nicht gekoppelter anti-CD61 Antikörper wurde auf 8 µm dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 µm.

IV.1.6.5 Sca1 (*Stem cell antigen 1*)

Differenzierte und undifferenzierte Tumore zeigen deutliche Unterschiede bezüglich der Expression von Sca1. Während in differenzierten Tumoren hauptsächlich Stromazellen und sehr wenige Tumorzellen stark Sca1-positiv sind, findet man in undifferenzierten Tumoren „Inseln“ von stark Sca1-positiven Tumorzellen, während der Rest der Tumormasse nur schwach Sca1-positiv oder Sca1-negativ ist (beispielhaft in Abbildung 34B dargestellt).

Die FACS-Analysen korrelieren dabei mit den Immunfluoreszenz-Analysen und zeigen eine deutlich geringere Anzahl von Sca1^{high}-Zellen in differenzierten (10%) vs. undifferenzierten (40%) Tumoren (Abbildung 34A und Abbildung 34C).

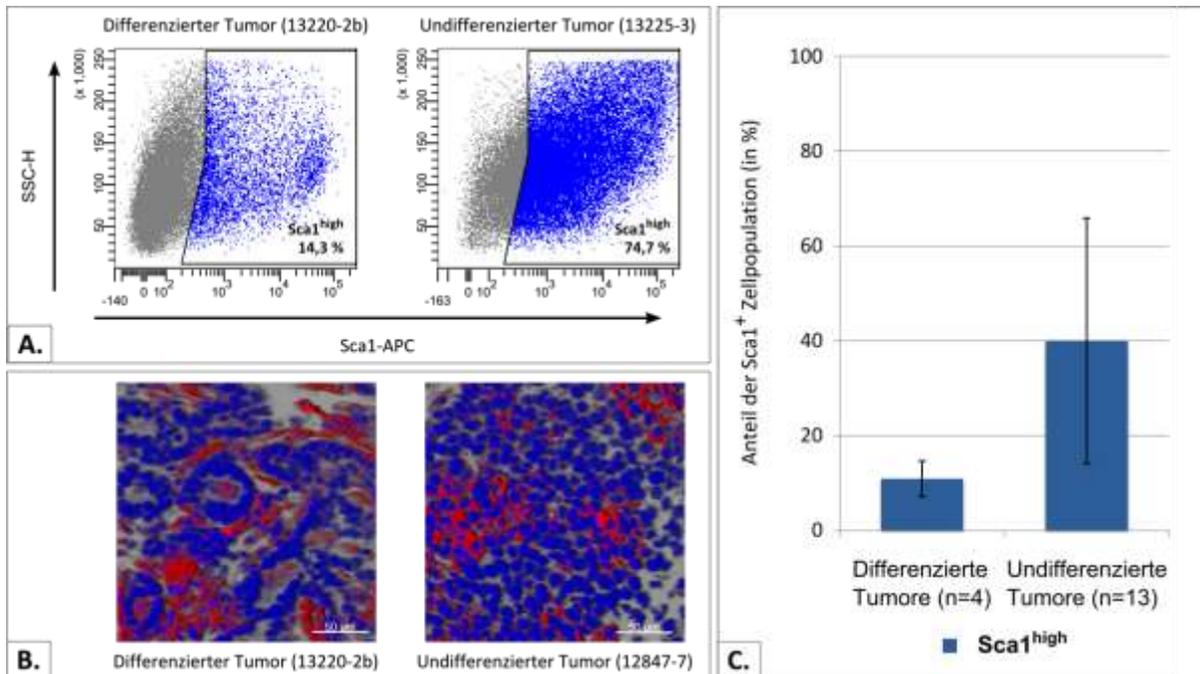


Abbildung 34: Darstellung von Sca1 in WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von Sca1 wurde mittels FACS-Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Dissoziierte Primärzellen aus 4 differenzierten und 13 undifferenzierten Tumoren wurden mit einem APC gekoppelten anti-Sca1-Antikörper gefärbt und im BD FACS-Canto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Aufnahmen und Auswertungen wurden mit der FACS-Diva v6.1.3 Software durchgeführt. Die Ergebnisse sind exemplarisch dargestellt (A) und zusammengefasst (Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts) (C). Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung (B): ein nicht gekoppelter anti-Sca1 Antikörper wurde auf 8 µm dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 µm.

Zusammengefasst zeigen die Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen von CD24, CD29, CD49f, CD61, und Sca1, dass jeder einzelne beschriebenen Marker in WAP-T Tumoren exprimiert wird, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung. CD49f und CD29 verhalten sich ähnlich und werden beide auf den meisten WAP-T Tumorzellen exprimiert, während der Marker CD61 schwach und auf weniger als die Hälfte der Tumorzellen exprimiert wird. CD24 wird auf nahezu allen Tumorzellen exprimiert. Da Zellen der Stromastreifen, welche die Tumore durchziehen, CD24 negativ sind, ist davon auszugehen, dass diese Zellen die in FACS-Analysen detektierte kleine CD24-Zellpopulation bilden, und dass alle Tumorzellen CD24 exprimieren. Somit können die in der Literatur beschriebenen CSC-Markerkombinationen CD24⁺/CD29^{high}, CD24⁺/CD49f⁺, CD24⁺/CD61⁺ in WAP-T Tumoren auf die Expression der einzelnen Marker CD29, CD49f und CD61 beschränkt werden. Sca1 hingegen zeigt eine distinkte Verteilung, abhängig vom Tumordifferenzierungsgrad: sehr wenige differenzierte Tumorzellen waren

Sca1^{high}, während undifferenzierte Tumore Sca1 positive Zellinseln zeigten. Angesichts dieser Ergebnisse haben potentiell alle CSC-Markerkombinationen eine Relevanz für die Anreicherung von Tumorstammzellen aus WAP-T Tumoren. Um ein besseres Verständnis der für CSC beschriebenen Marker im WAP-T Mausmodell zu gewinnen, wurde deren Expression in der G-2 Zelllinie untersucht. Durch die Anwendung der G-2 Zellen stand weiterhin eine nahezu unbegrenzte Materialquelle zur Verfügung und es bestand zusätzlich die Möglichkeit, *in vitro* Untersuchungen wie z.B. Subpopulationsanalysen durchführen zu können, was mit primären endogenen WAP-T Tumorzellen nicht möglich ist.

IV.1.6.6 Verteilung einzelner CSC-assoziiertes Oberflächen-Markerkombinationen in Zellpopulationen der G-2 Zelllinie *in vitro*

Aufgrund der aufwendigen und schwierigen Arbeit mit WAP-T Primärtumorzellen, und weil mit primären Zellen keine Folgeuntersuchungen durchgeführt werden können, wurde die Relevanz derselben Oberflächenmarker anhand der G-2 Zelllinie *in vitro* evaluiert. Wie bei der Charakterisierung von endogenen WAP-T Tumoren wurden G-2 Zellen FACS-Analysen unterzogen, um die Expression von CSC-relevanten Oberflächenmarkern zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Analysen werden in Abbildung 35A dargestellt. Nahezu alle G-2 Zellen (99,8%) zeigten eine hohe CD29-Expression. Hinsichtlich der Expression von CD24 und CD49f konnten G-2 Zellen in zwei Hauptpopulationen unterteilt werden: eine CD24^{low}/CD49f^{low} und eine CD24^{high}/CD49f^{high} Population. Zudem zeigten G-2 Zellen eine CD61^{high} Population, die zu über 95% mit der CD24^{high}/CD49f^{high} überlappte. Im Gegensatz wies die große Mehrheit der Sca1 exprimierenden G-2 Zellen den CD24^{low}/CD49f^{low} Phänotyp auf.

Zusammenfassend enthalten G-2 Zellen einerseits eine CD24^{high}/CD49f^{high} Zellpopulation, die alle drei der in der Literatur beschriebenen Markerkombinationen für CSC-Eigenschaften (CD24⁺/CD29^{high}, CD24⁺/CD49f⁺ und CD24⁺/CD61⁺) umfasst und andererseits eine CD24^{low}/CD49f^{low} Population, die Sca1^{high} Zellen umfasst.

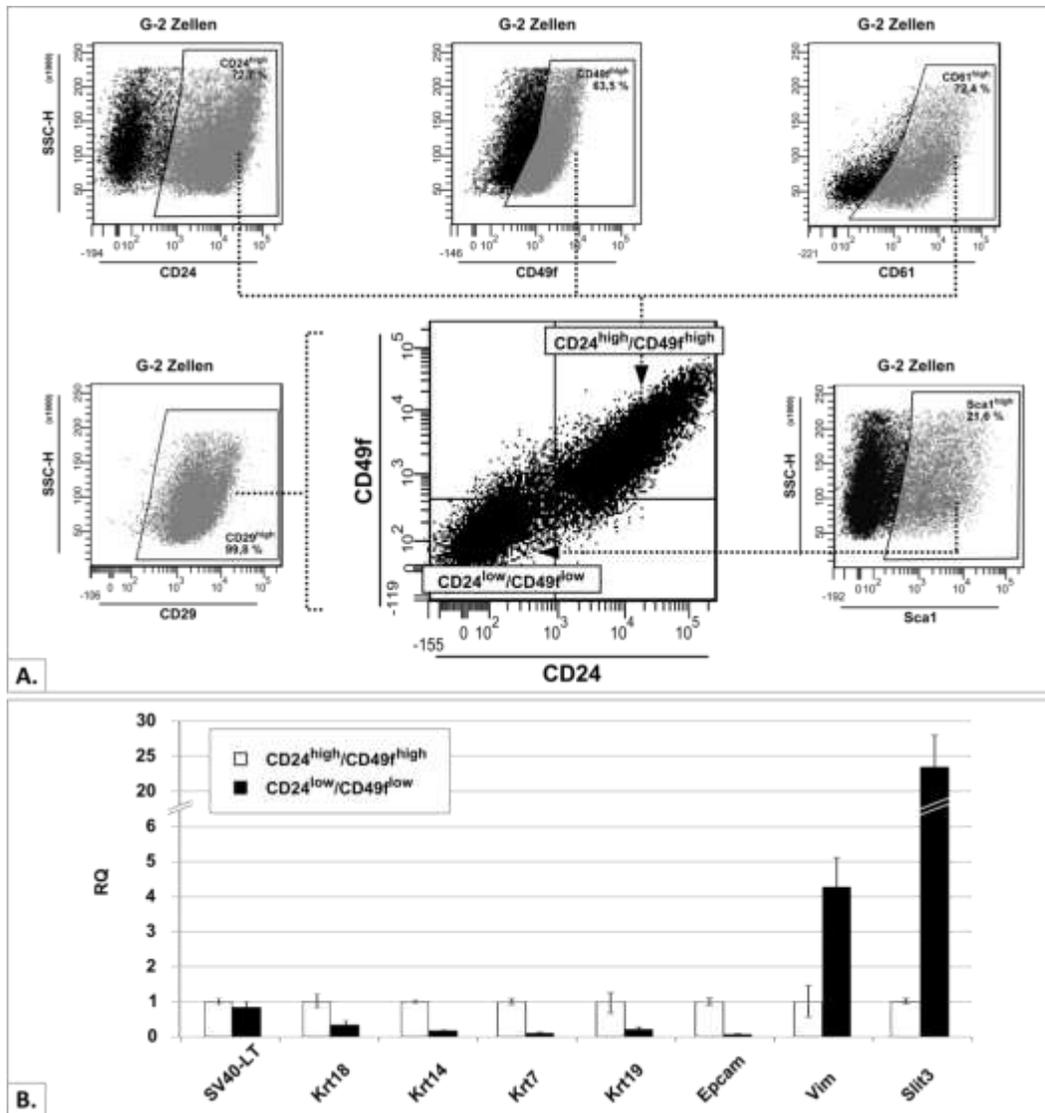


Abbildung 35: Expression und Verteilung von CSC-relevanten Markern in G-2 Zellen.

A: Expression von CD24, CD29, CD49f, CD61 und Sca1 auf G-2 Zellen. Die Zellen wurden mit folgenden Antikörpern, die mit Farbstoff versehen waren, gefärbt: PE-anti-CD24, APC-anti-CD29, FITC-anti-CD49f, APC-anti-CD61 und APC-anti-Sca1. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines BD FACS-Canto (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Expression der einzelnen Marker in den G-2 Zellen wird in den entsprechenden Dotplots dargestellt und deren Verteilung anhand der zwei Hauptzellpopulationen CD24^{low}/CD49f^{low} und CD24^{high}/CD49f^{high} mithilfe gestrichelte Pfeile angegeben. **B:** Relativer Expressionsunterschied von SV40-LT, Epithel-spezifischen (Krt18, Krt14, Krt7, Krt19 und Epcam) und Mesenchym-spezifischen (Vimentin und Slit3) in den zwei G-2 Zellpopulationen CD24^{low}/CD49f^{low} und CD24^{high}/CD49f^{high}. Die RNAs wurden mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR untersucht. Die Analysen erfolgten in einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) und wurden mit der Software SDS v1.4 ausgewertet. Jede Messung wurde als Dreieransatz durchgeführt (ca. 5ng cDNA pro Messung). Die Expressionswerte der Proben wurden auf Hprt1 normiert. Die Expressionsunterschiede werden als 2^{-ΔΔCt} Werte dargestellt wobei jeweils die CD24^{high}/CD49f^{high}-Zellpopulation als Kalibrator diente (Ct: cycle threshold). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

Umfangreiche Charakterisierungsvorarbeiten (u. A. im Abs. IV.1.4 dargestellt) zeigten, dass ähnlich wie bei primären WAP-T Tumoren, G-2 Zellen bezüglich der Expression *lineage*-spezifischer Marker untereinander heterogen sind (Wegwitz, Kluth et al. 2010). Es finden sich in ein und derselben Kultur sowohl Zellen, die epitheliale Marker exprimieren (wie z.B. EpCAM, Keratine und E-Cadherin), als auch Zellen, die mesenchymale Marker aufweisen (wie z.B. Vimentin). Für weitere Charakterisierungszwecke wurden die CD24^{low}/CD49f^{low} und CD24^{high}/CD49f^{high} Zellpopulationen mittels FACS voneinander getrennt und die Expression bestimmter Differenzierungsmarker wurde mittels quantitativer PCR untersucht. Hierbei dienten Krt18, Krt14, Krt7, Krt19 und Epcam als epithelspezifische Marker während Vimentin und Slit3 als mesenchymspezifische Marker verwendet wurden. Parallel wurde die Expression von SV40-LT untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass die CD24^{high}/CD49f^{high}-Zellen eine signifikant höhere Krt18-, Krt14-, Krt7-, Krt19- und Epcam-Expression und somit einen ausgeprägteren Epithelcharakter als CD24^{low}/CD49f^{low} G-2 Zellen aufweisen. Hingegen exprimieren G-2 Zellen des CD24^{low}/CD49f^{low}-Phänotyps die beiden mesenchym-spezifische Marker Vimentin und Slit3 stärker (Abbildung 35B). Bezüglich SV40 LT konnten keine signifikante Expressionsunterschiede gemessen werden. Zusammengefasst weisen G-2 Zellen in der Kultur zwei Zellpopulationen, CD24^{low}/CD49f^{low} und CD24^{high}/CD49f^{high} auf, die jeweils einen ausgeprägten mesenchymalen bzw. epithelialen Phänotyp besitzen.

IV.1.6.7 Metastabilität der G-2 Zellen *in vitro*

In den bisherigen Untersuchungen zeigte die G-2 Zelllinie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine intrinsische Heterogenität bezüglich zellulärer Phänotypen. Es stellte sich somit die Frage, ob eine bestimmte Subpopulation von G-2 Zellen die benötigten Tumorstammzeleigenschaften, d.h. Wachstums-, Selbsterneuerungs- und Differenzierungseigenschaften, für das Erhalten der Zelllinie aufweist und sich dadurch von den anderen Zellpopulationen unterscheidet. Um diese Frage zu beantworten, wurden zuerst G-2 Zellen Repopulationsanalysen unterzogen. Hierbei wurden zuerst G-2 Zellen mit ausgeprägtem mesenchymalen bzw. epithelialen Phänotyp, d.h. CD24^{low}/CD49f^{low} und CD24^{high}/CD49f^{high} Zellen mittels FACS voneinander getrennt und separat für drei bzw. fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die jeweiligen Zellen erneut auf die Expression von CD24 und CD49f untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beide G-2 Zellpopulationen in der Lage waren, zu wachsen und Zellen mit demselben Phänotyp sowie deren Pendanten zu rekapitulieren (Abbildung 36A). Die Repopulation erfolgte bei CD24^{low}/CD49f^{low} Zellen etwas langsamer als bei CD24^{high}/CD49f^{high} Zellen. Auf Grund dieser interessanten Ergebnisse wurden ähnliche Repopulationsanalysen mit den Aldh^{low}- und Aldh^{br}-Subpopulationen der G-2 Zelllinien durchgeführt. Hierbei wurde beobachtet, dass Zellen beider

Phänotypen ebenfalls in der Lage sind, deren Pendant zu repopulieren. Dabei wies eine der Subpopulationen (Aldh^{low}-Population) eine etwas langsamere Kinetik auf (Abbildung 36B). Diese Ergebnisse stimmen mit den Transplantationsexperimenten überein, wo Aldh^{low} und Aldh^{br} G-2 Zellpopulationen mit gleicher Erfolgsquote Tumore in syngenen Mäuse initiierten. Dabei war ebenfalls eine leichte Verzögerung in der Tumorinitiationskinetik der Aldh^{low}-Zellen zu sehen (siehe Abs. IV.1.5.2).

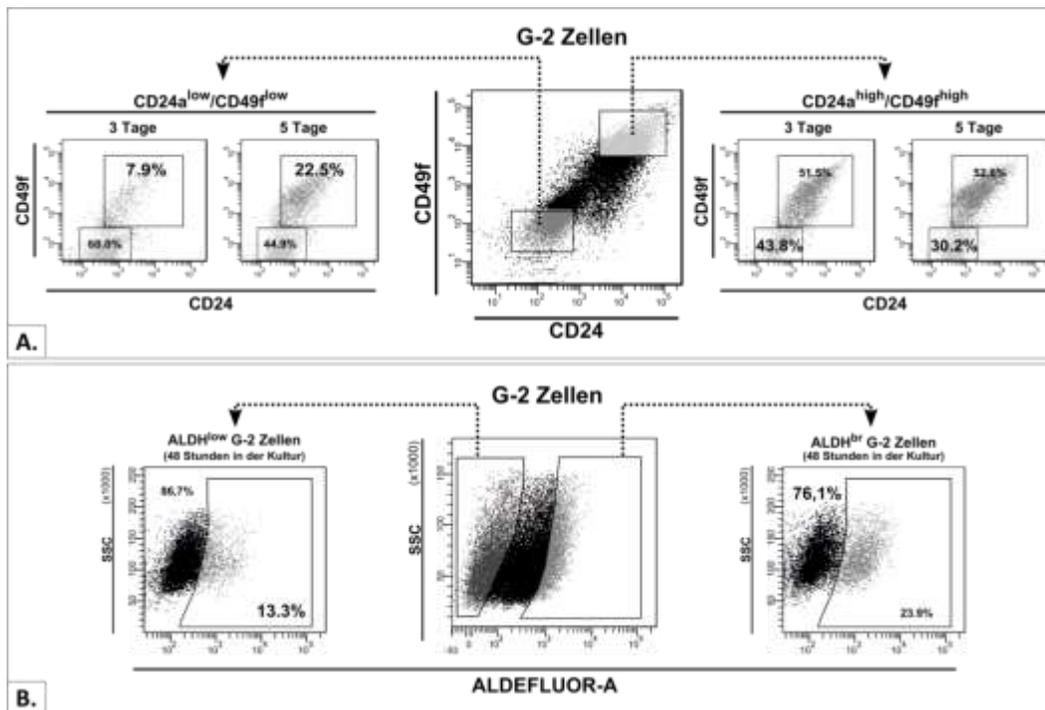


Abbildung 36: : Metastabilität der G-2 Zelllinie

Repopulationsanalyse: CD24^{low}/CD49f^{low} und CD24^{high}/CD49f^{high} (A) bzw. Aldh^{low} und Aldh^{br} (B) G-2 Zellen wurden mithilfe des BD FACS-Aria (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) voneinander getrennt. Jeweils wurden 5x10⁵ Zellen einer Subpopulation in 6 Wells ausgesät und die Zellen wurden weiter kultiviert. Nach 3 und 5 Tagen bzw. nach 48 Stunden wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD24 und CD49f (A) bzw. ihrer Aldh-Aktivität (B) erneut analysiert. Für das FACS-Sorten und die Re-Analyse diente das Aldefluor Kit (Stemcell Technologies, Köln, Deutschland) für die Messung der Aldh-Aktivität.

Die beobachteten Repopulationseigenschaften der CD24^{low}/CD49f^{low} und CD24^{high}/CD49f^{high} Subpopulationen weisen darauf hin, dass sich Zellen der G-2 Mammakarzinomzelllinie in einem metastabilen Zustand zwischen epithelialen und mesenchymalen Phänotyp befinden (Wegwitz, Kluth et al. 2010). Die Mechanismen, die diese Differenzierungsübergänge ermöglichen, werden als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bzw. mesenchymale-epitheliale Transition (MET) bezeichnet und sind überaus wichtige Prozesse der Entwicklungsbiologie (Acloque, Adams et al. 2009; Kalluri 2009; Kalluri and Weinberg 2009). Im Zusammenhang mit Tumoren ist die EMT als Bestandteil der Metastasierungskaskade Voraussetzung für die Aggressivität und Invasivität der Tumorzellen (Thiery

2002). Somit stellte sich als nächstes die Frage, ob die Zellen von endogenen WAP-T Tumoren sich, gleich wie G-2 Zellen, in einem metastabilen Zustand befinden, und ob EMT- bzw. MET-Ereignisse in diesen Tumoren beobachtet werden können.

IV.1.6.8 Erweiterung des Metastabilitätskonzepts auf Tumorzellen *in vivo*: transplantierte G-2 und endogene WAP-T Tumore

Da G-2 Zellen aus einem WAP-T Mammakarzinom gewonnen wurden, lag die Annahme nahe, dass die in G-2 Zellen beobachtete Metastabilität ein allgemeines Kennzeichen von WAP-T Tumorzellen ist, welches ebenfalls endogene Tumore aufweisen. Um diesbezüglich Hinweise zu liefern, wurden G-2 Tumore aus Transplantationen sowie endogene differenzierte und undifferenzierte WAP-T Tumore Immunfluoreszenzfärbungen unterzogen. Dabei dienten Keratin 8/18 und Vimentin als Marker für jeweils epitheliale bzw. mesenchymale Phänotypen. Abbildung 37 stellt eine repräsentative Aufnahme dar. Hierbei wurde festgestellt, dass undifferenzierte WAP-T Tumore sowie G-2 Tumore einige Zellen enthalten, die sowohl Vimentin als auch Krt8/18 exprimieren (Abbildung 37: Darstellung von Vimentin und Keratin 8/18 in G-2 und WAP-T-NP8 Tumoren A und Abbildung 37B). Die gleichzeitige Expression mesenchymaler und epithelialer Marker ist eine Eigenschaft von Zellen, die sich im Übergang zwischen beiden Differenzierungszuständen befinden und weist somit auf EMT- bzw. MET-Ereignisse (Vongwiwatana, Tasanarong et al. 2005; Kokkinos, Wafai et al. 2007; Tomaskovic-Crook, Thompson et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnten solche Zellen in differenzierten WAP-T Tumoren nicht gefunden werden (Abbildung 37C). Um sicherzustellen, dass diese Zellen tatsächlich Tumorzellen sind, wurden Co-Färbungen für Vimentin und das Transgen SV40-LT durchgeführt. Dabei konnte in undifferenzierten WAP-T Tumoren sowie G-2 Tumoren bestätigt werden, dass einige Vimentin-positive Zellen das Transgen ebenfalls exprimierten (Abbildung 38A und Abbildung 38B). Erneut zeigten differenzierte WAP-T Tumore keine Hinweise auf EMT (Abbildung 38C).

Die Charakterisierung der G-2 Zellen hinsichtlich der in der Literatur für Tumorstammzellen beschriebenen Marker konnte zeigen, dass G-2 Zellen in der Zellkultur einen plastischen Phänotyp aufweisen, der Prozesse der EMT und MET umfasst. Zudem weisen *in vivo* einige Zellen in undifferenzierten WAP-T Tumoren, analog zu Tumoren aus transplantierten G-2 Zellen, gleichzeitig epitheliale und mesenchymale Marker auf (Wegwitz, Kluth et al. 2010). Zusammen mit der Tatsache, dass G-2 Zellen aus einem WAP-T Mammakarzinom etabliert wurden, lassen diese Beobachtungen vermuten, dass undifferenzierte endogene WAP-T Tumore ebenso wie G-2 Tumore Zellen in einem metastabilen, zwischen epithelial und mesenchymal wechselnden Zustand enthalten. Interessanterweise zeigten die Immunfluoreszenzfärbungen für Vimentin und Cytokeratin 8/18 (Abbildung 37), dass eine

große Mehrheit von Tumorzellen in G-2 und WAP-T Tumoren einen epithelien Phänotyp aufweisen und nur wenige Zellen den mesenchymalen Marker enthalten. Dies ist ein bemerkenswerter Unterschied zu G-2 Zellen in der Kultur, die ungefähr zur Hälfte aus Zellen mit mesenchymalen Merkmalen bestehen (Abbildung 35). So scheint die Wachstumsumgebung eine entscheidende Rolle in der Balance zwischen mesenchymalen und epithelialen Phänotyp der einzelnen Tumorzellpopulationen zu spielen. Diese Annahme konnte durch ergänzende Experimente bestätigt werden. So wurden G-2 Zellen mit verschiedenen Konfluenzen hinsichtlich der Expression von CD49f, CD24 und Sca1 analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Anteil des mesenchymalen Phänotyps mit der Konfluenzerhöhung abnimmt. Außerdem zeigten Ko-Kulturrexperimente, dass die Konversion von Zellen mesenchymalen Phänotyps zu Zellen epithelialen Phänotyps erheblich beschleunigt wird, wenn sie mit deren Pendanten zusammen kultiviert werden (Wegwitz, Kluth et al. 2010).

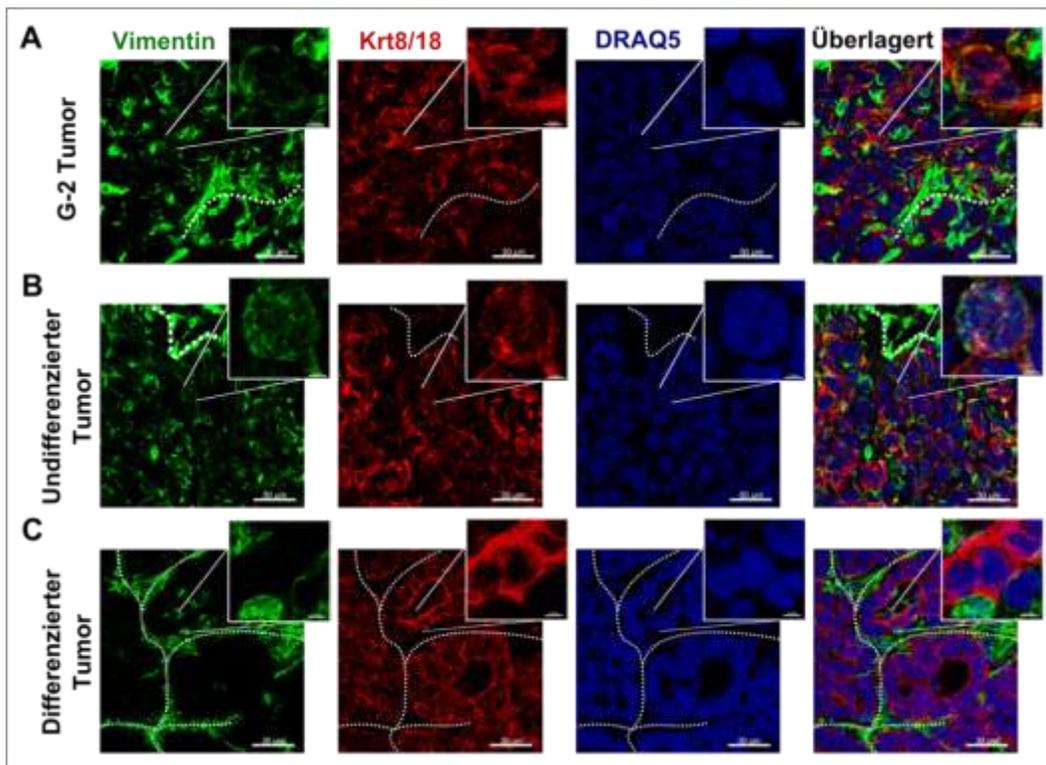


Abbildung 37: Darstellung von Vimentin und Keratin 8/18 in G-2 und WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von Vimentin (grün) und Keratin 8/18 (rot) wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Färbungen in G-2 transplantierten Tumoren (A), undifferenzierten (B) und differenzierten (C) WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Die Antikörper wurden auf 8 µm dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa[®]- bzw. DyLight[®]-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5[®] gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Alle mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Die weißen gestrichelten Linien stellen die Lokalisierung von Stromastreifen dar. Maßstab: Hauptaufnahmen - 30 µm; Vergrößerungen - 3 µm.

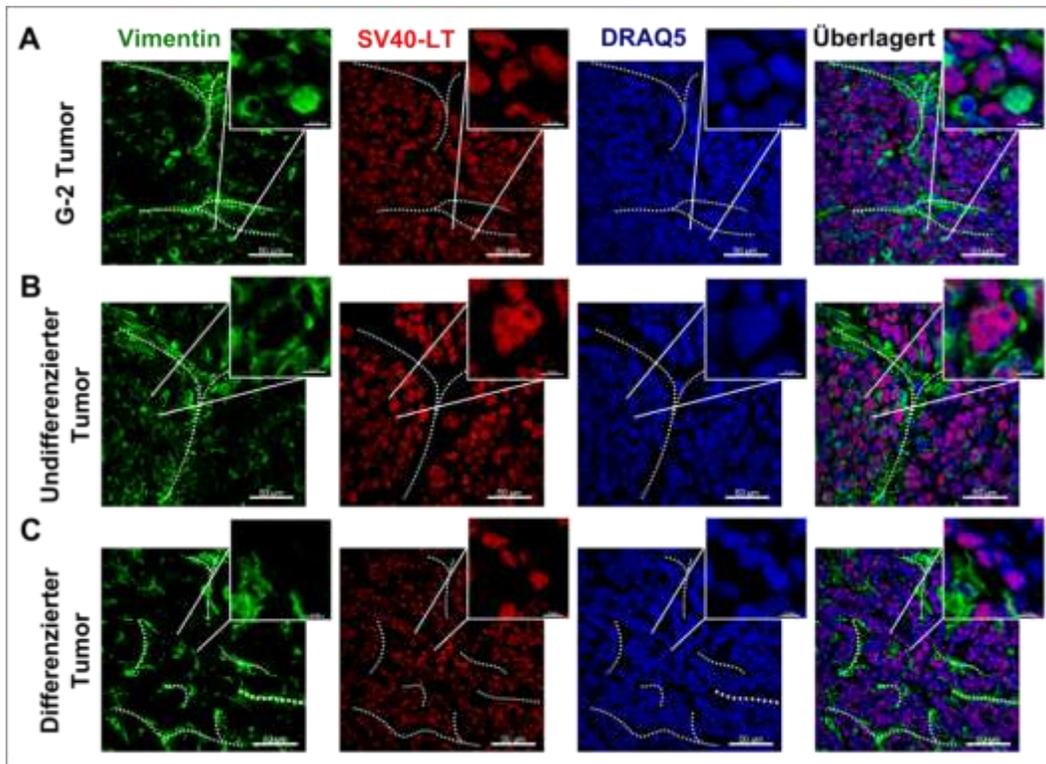


Abbildung 38: Darstellung von Vimentin und SV40 LT in G-2 und WAP-T-NP8 Tumoren

Die Expression und Lokalisation von Vimentin (grün) und SV40 LT (rot) wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen in G-2 transplantierten Tumoren (A), undifferenzierten (B) und differenzierten (C) WAP-T-NP8 Mammakarzinomen untersucht. Die Antikörper wurden auf 8 µm dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa®- bzw. DyLight®-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5® gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Alle mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Die weißen gestrichelten Linien stellen die Lokalisierung von Stromastreifen dar. Maßstab: Hauptaufnahmen - 30 µm; Vergrößerungen - 3 µm.

Die Analyse von tumorstammzellrelevanten Oberflächenmarkern in G-2 Zellen brachte neue Erkenntnisse für die Suche von Tumorstammzellen in den WAP-T Tumoren. Hierbei zeigte sich, dass die für CSCs im Mammakarzinom beschriebenen Markerkombinationen in der G-2 Zellkultur vorhanden sind und dass die jeweiligen Populationen in der Lage sind, ihre Pendanten durch EMT- bzw. MET-Prozesse wiederherzustellen. Weiterhin weisen die Ergebnisse darauf hin, dass endogene WAP-T Tumore wie G-2 Zellen Metastabilität aufweisen. Angesichts dieser Fakten scheinen WAP-T Tumorstammzellen je nach Bedingung unterschiedliche Phänotypen aufweisen zu können, was die Relevanz der Isolierung von CSCs durch Oberflächenmarker erheblich beeinträchtigt. Diese neuen Erkenntnisse führen weiterhin zu der Frage, ob das Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Differenzierungszuständen der WAP-T Tumorzellen durch Modulation von Oberflächenmarkern zu beeinflussen ist und ob dies zur Veränderung der metastatischen Eigenschaften von WAP-T Zellen führen kann. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass

individuelle G-2 Zellpopulationen spezifische Transkriptionsfaktoren wie Twist2 und Sox10, die in der Literatur als potentielle Effektoren der EMT beschrieben wurden, differenziell exprimieren (Ansieau, Bastid et al. 2008). Durch RNA-Interferenz Methoden konnte die Expression von Sox10 in G-2 Zellen unterdrückt werden, was zu einer Erhöhung der Expression von Twist2 und zur Verschiebung des Gleichgewichts zwischen epithelialem und mesenchymalem Phänotyp zu Gunsten des Letzteren führte (Wegwitz, Kluth et al. 2010). Diese Ergebnisse lieferten einen zusätzlichen Beweis für das Auftreten von EMT und MET in den G-2 Zellen und zeigten, dass das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Subpopulationen der Zelllinie durch Modulation bestimmter Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden kann.

Dadurch, dass EMT und MET eine Rolle in Mechanismen der Metastasierung von Karzinomzellen spielen, stellen Moleküle, die in der Modulation dieser Prozesse involviert sind, interessante Eingriffspunkte für mögliche Therapien zu Reduktion der Tumoraggressivität und -malignität dar. Nachdem bewiesen wurde, dass die Metastabilität von G-2 Zellen durch Modulation von Transkriptionsfaktoren *in vitro* beeinflusst werden kann, stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage für weiterführende Experimente, ob die Depletion bestimmter Adhensionsmoleküle anhand vorhandener Mausmodelle zu einem ähnlichen Phänomen *in vivo* führen kann.

IV.2 Die duale Rolle von CEACAM1 in der WAP-T

Mammakarzinogenese

Exzessive Proliferation von Epithelzellen und eine intensive Angiogenese sind zwei Hauptmerkmale der Initiation und frühen Entwicklung von epithelialen Primärtumoren (Weidner 1998; Weidner 2004; Ferrara and Kerbel 2005; Fantozzi and Christofori 2006; Kalluri and Weinberg 2009). Die darauffolgende Fähigkeit, invasiv zu wachsen stellt die nächste Entwicklungsstufe eines malignen Karzinoms dar und ermöglicht das Durchqueren der Basalmembran. Da bei diesem Prozess die Zellpolarität verloren geht und die Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre Matrix (ECM)-Verbindungen unterbrochen werden, ist die EMT eine Voraussetzung für die Akquisition invasiver und metastatischer Eigenschaften. Die EMT wird oft im Zusammenhang mit einem Schutz gegen Apoptose und Seneszenz der Tumorzellen beobachtet und erleichtert damit zusätzlich die anschließende Zelldisseminierung (Ansieau, Bastid et al. 2008; Weinberg 2008). Nach Erreichen des Ansiedlungsortes in einem distanten Organ führen disseminierte Tumorzellen eine MET durch und akquirieren somit wieder den Phänotyp des Primärtumors.

In dieser Arbeit wurde sowohl EMT als auch MET in kultivierten G-2 Zellen *in vitro* beobachtet. *In vivo* konnten Hinweise für diese Prozesse in G-2 transplantierten Tumoren und in undifferenzierten endogenen WAP-T Tumoren gefunden werden. Während der Progression von Mammakarzinomen wird ein Verlust von Adhäsionsmolekülen häufig in Zusammenhang mit einem Verlust der Tumorzellpolarität sowie mit einer verstärkten Tumorzellinvasivität beobachtet und korreliert mit EMT-Ereignissen. CEACAM1 ist ein stark glykosyliertes Adhäsionsprotein, das an der Oberfläche mehrerer Zelltypen wie myeloiden Zellen, bestimmten Endothelzellen und Drüsenepithelzellen (u. a. der Brustdrüse) exprimiert wird. Eine reduzierte Expression von CEACAM1 wird in Krebszellen der entsprechenden Tumore (Kolonkarzinom, Leberkarzinom, Blasenkarzinom, Nierenkarzinom und Mammakarzinom) häufig beobachtet und korreliert mit einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Invasivität der Krankheit (Nollau, Prall et al. 1997; Nollau, Scheller et al. 1997; Riethdorf, Lisboa et al. 1997; Bamberger, Riethdorf et al. 1998; Oliveira-Ferrer, Tilki et al. 2004; Tilki, Irmak et al. 2006). Aus diesem Grund wird CEACAM1 häufig als Tumorsuppressor bezeichnet.

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften von CEACAM1 stellt dieses Adhäsionsmolekül einen interessanten Kandidaten für die Veränderung des Tumorzellverhaltens dar. CEACAM1 wird sowohl in Mamma- als auch in Tumorgewebe von WAP-T Mäusen exprimiert. Die Modulation von CEACAM1 in den Tumorzellen bzw. in deren Tumormikroumgebung könnte Veränderungen des EMT-Zustands und somit der Aggressivität der Tumore verursachen. In einem von der DFG unterstützten Forschungsprogramms (SPP1190) wurde in Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Eppendorf, (Direktor: Prof. C. Wagener) die Rolle von CEACAM1 während der Tumorentwicklung in WAP-T Mäusen untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt auf dem Aspekt, CEACAM1 als Modulator der EMT- und MET-Ereignisse in WAP-T Tumorzellen zu erforschen. Für diese Zwecke wurden bitransgene Tiere durch Kreuzung von WAP-T-NP8 Mäusen mit CEACAM1 defizienten Mäusen (*Ceacam1*^{-/-}) generiert (Horst, Ito et al. 2006; Leung, Turbide et al. 2006; Leung, Turbide et al. 2008). Bitransgenen Mäuse wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) gezüchtet und anschließend im Tierstall des Heinrich-Pette-Instituts für die Beobachtungszeit bis zum Sezieren der Mäuse bzw. für Transplantationsexperimente gehalten.

Die verschiedenen Aufgaben des Projekts wurden mit unterschiedlicher Schwerpunktsetzung kooperativ bearbeitet. Die Arbeitsgruppe von Prof. Wagener (Daniela Gerstel und Dr. Andrea Horst) beschäftigte sich mit dem Vergleich und der Analyse primärer endogener Tumore aus WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Mäusen, während unsere Arbeitsgruppe (i) die Expression von CEACAM1 vor und während der Tumorentstehung analysierte und (ii) anhand von Transplantationsexperimenten

untersuchte, ob die An- bzw. Abwesenheit von CEACAM1 in WAP-T Mammakarzinomen oder in deren Mikroumgebung einen Einfluss auf das Metastasierungspotential der Tumore ausüben kann.

IV.2.1 Lokalisierung von CEACAM1 in der normalen Brustdrüse von WAP-T Mäusen und während der Tumorentwicklung

Als Voraussetzung zum Verständnis einer möglichen Rolle von CEACAM1 in der Tumorprogression des WAP-T Mausmodells wurden zunächst die Expressionsmuster von CEACAM1 in der normalen murinen Brustdrüse und in unterschiedlichen Stadien der Tumorentwicklung untersucht (Abbildung 39B). Gewebe folgender Entwicklungsstadien wurden für diese Untersuchungen ausgewählt: Mammagewebe jungfräulicher Weibchen (16 Wochen alt), laktierende Brustdrüsen (14 Tage nach Verpaarung), Brustdrüsen in verschiedene Stadien der Involution (30, 60 und 120 Tage nach Absetzen) und Tumorgewebe (differenziert und undifferenziert). Dabei wurden jeweils die Mammagewebe #1 bis #4 in Kryomatrix und die der #5 bis #8 in Paraffin eingebettet (Abbildung 39A). Für jeden Zeitpunkt wurden zwei WAP-T-NP8 und ein BALB/c Weibchen analysiert, wobei das BALB/c Tier jeweils als Referenz für die normale Situation diente (Abbildung 39B).

Die in Kryomatrix eingebetteten Mammae wurden anschließend für Co-Immunfluoreszenzfärbungen auf CD31 und CEACAM1 aufgearbeitet (Abbildung 40A). Parallel wurden Tumorgewebe von differenzierten und undifferenzierten Tumoren mit den gleichen Antikörperkombinationen gefärbt (Abbildung 40B). Da CEACAM1 sowohl auf Epithelzellen als auch auf Endothelzellen der Brustdrüse exprimiert wird, diente CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, PEACAM1) als Blutgefäßmarker zur Diskriminierung beider Zelltypen bei diesen Untersuchungen (Horst, Ito et al. 2006).

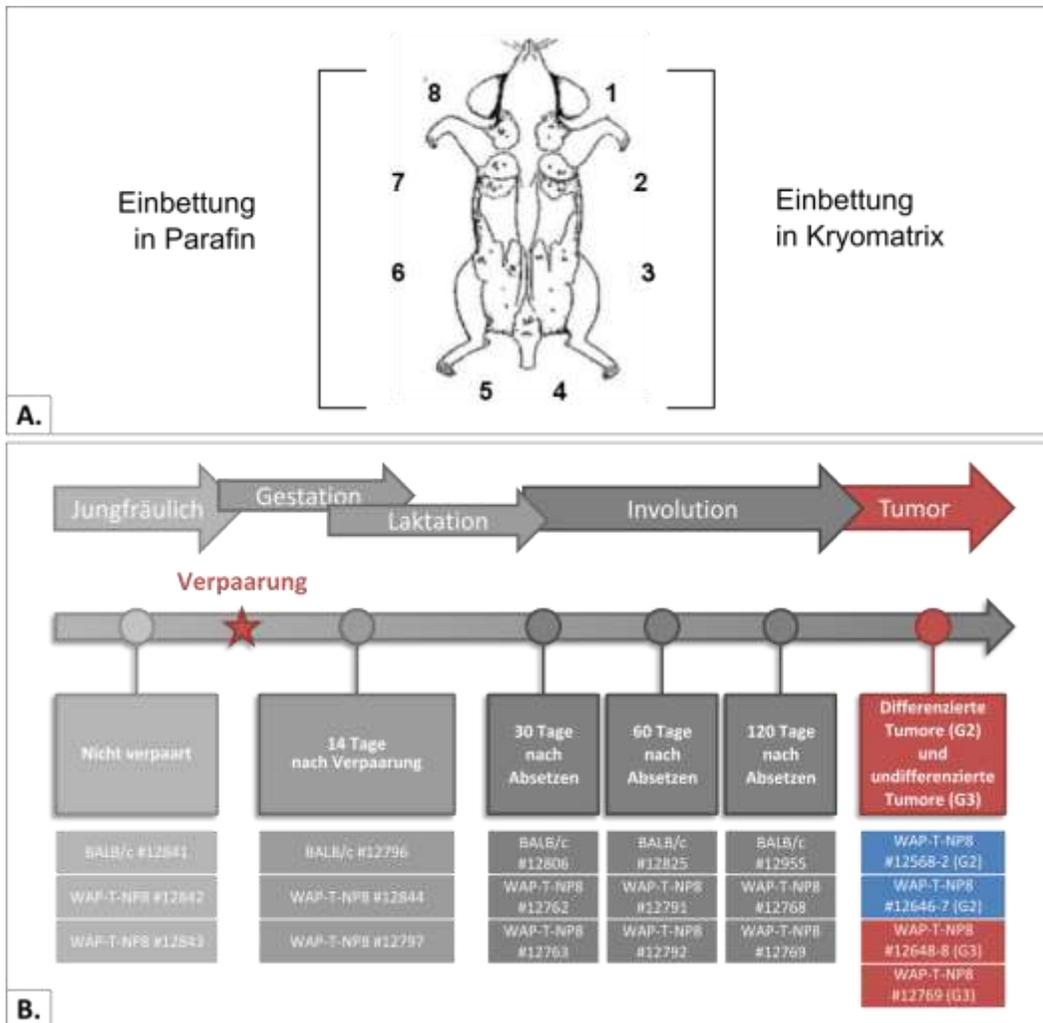


Abbildung 39: Untersuchte Proben für die Charakterisierung der CEACAM1-Expression in normalen Brustdrüsen, Tumorstufen und Mammakarzinomen

A: Darstellung der für die Untersuchungen präparierten Gewebe: die Brustdrüsen #1 bis #4 wurden in Kryomatrix und #5 bis #8 in Paraffin eingebettet. **B:** Darstellung der verschiedenen untersuchten Entwicklungsstadien der Brustdrüse: Gewebe jungfräulicher Weibchen (16 Wochen alt), laktierende Drüse (14 Tage nach Verpaarung), Drüse während der Involution (30, 60 und 120 Tage nach Absetzen) und Tumorgewebe wurden in die Studie eingeschlossen. Das normale Gewebe wurde für jedes Stadium aus BALB/c (n=1) und WAP-T-NP8 Weibchen (n=2) gewonnen. Die Tumorgewebe stammten aus differenzierten (n=2) und undifferenzierten (n=2) WAP-T-NP8 Läsionen.

Immunofluoreszenzfärbungen der Mammagewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigten keine qualitativen Unterschiede zwischen BALB/c und WAP-T-NP8 Tieren. CEACAM1 ist sowohl auf Endothelzellen als auch auf Epithelzellen zu detektieren (Abbildung 40A). Die Epithelzellen der Brustdrüse zeigen eine ubiquitäre CEACAM1 Expression, wobei eine graduelle Zunahme der Färbung von der Basal- zur Luminalmembran zu beobachten ist, was die Polarität der Zellen reflektiert. Ebenso sind die Gefäße des Fettgewebes zum größten Teil positiv für CEACAM1. Allerdings kann eine Abnahme der CEACAM1-Expression aus Gefäßen in der unmittelbaren Nähe vom Drüseneithel beobachtet werden.

Angesichts der epithelialen Natur der WAP-T Mammakarzinome lässt diese Beobachtung vermuten, dass auch die Gefäße in diesen Tumoren einen CEACAM1-negativen Phänotyp aufweisen werden.

In WAP-T Mammakarzinomen wird CEACAM1 auf nahezu allen Tumorzellen exprimiert (Abbildung 40B). Dabei weisen differenzierte Tumorzellen eine ähnliche Polarität wie im normalen Gewebe auf. Auf der Oberfläche undifferenzierter Tumorzellen ist CEACAM1 hingegen gleichmäßig verteilt. Auf Blutgefäßen sowohl differenzierter als auch undifferenzierter Tumore ist CEACAM1 nicht detektierbar. Diese Beobachtung stimmt mit der von normalem Gewebe überein.

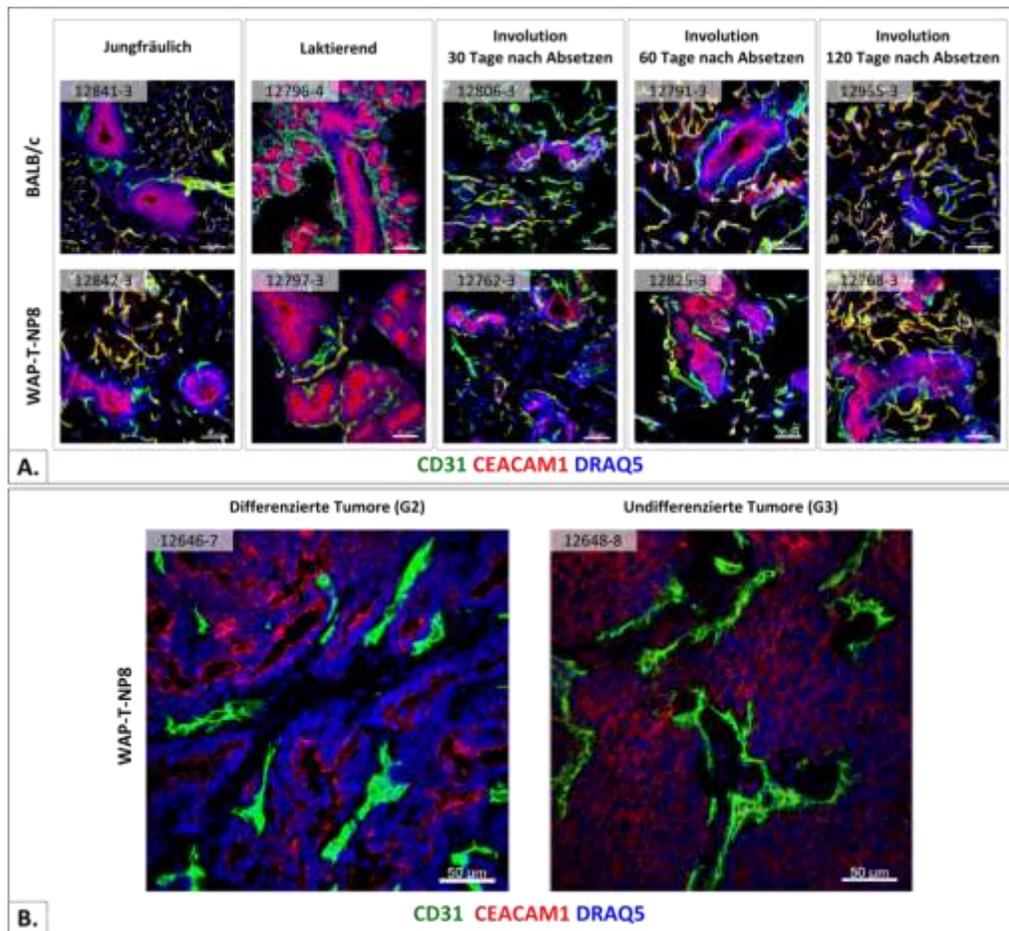


Abbildung 40: Darstellung der Expression und Lokalisierung von CEACAM1 und CD31 in der Brustdrüse von WAP-T-NP8 und BALB/c Mäusen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und in Tumoren

A: Expression und Lokalisation von CD31 und CEACAM1 mittels indirekter Immunfluoreszenz-Färbungen in Mammagewebe von WAP-T-NP8 und BALB/c Weibchen folgender Entwicklungsstadien: Gewebe jungfräulicher Weibchen (16 Wochen alt), laktierende Drüse (14 Tage nach Verpaarung) und Drüse während der Involution (30, 60 und 120 Tage nach Absetzen). **B:** Entsprechende Färbungen für CD31 und CEACAM1 auf WAP-T-NP8 Tumorgewebe. Die Antikörper wurden auf 15 µm (Mammagewebe) oder 8 µm (Tumorgewebe) dicke, mit 4% PFA fixierte und mit 1% Triton X-100 permeabilisierte Kryoschnitte angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa®- bzw. DyLight®-gekoppelte sekundäre Antikörper. Zellkerne wurden mit DRAQ5® gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem 40x Objektiv eines Laser-Konfokalmikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Alle mikroskopischen Darstellungen sind das Ergebnis der Rekonstruktion von z-Stapel-Aufnahmen mithilfe des Imaris v5.0.1 Programms (Bitplane, Zürich, Schweiz). Maßstab: 50 µm.

IV.2.2 Vergleichende Analyse endogener WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumore

Da WAP-T Tumorzellen CEACAM1 exprimieren, wurden anschließend Vergleichsanalysen von endogenen WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} mit WAP-T-NP8 Tumoren durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob der Verlust von CEACAM1 in WAP-T Tumoren eine Verschiebung des EMT/MET-Gleichgewichts bewirkt und somit einer erhöhten Invasivität der Tumorzellen dienen kann. Dabei untersuchten unsere UKE-Kooperationspartner Tumorwachstum, Tumorinzidenz und Anzahl von Lungenmetastasen von jeweils 9 WAP-T-NP8 und 9 WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumortieren. WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumore wachsen mit ähnlicher Latenz nach Induktion und ähnlicher Kinetik. Die Tumorinzidenz ist ebenfalls vergleichbar in *Ceacam1*^{wt} und *Ceacam1*^{-/-} Tumortieren. Durch serielle Schnitte der Lungen wurden die Tumortiere auf Metastasen untersucht. Basierend auf morphologischen Kriterien oder der Expression des Transgens, dienten H&E- und SV40-LT-Färbungen der Suche nach Metastasen. In 67% der *Ceacam1*^{-/-} Tumortiere (n=9) konnten Lungenmetastasen entdeckt werden. Insgesamt wurden 71 Lungenmetastasen gezählt; davon waren 64% T-Antigen positiv. Zum Vergleich wurden exemplarisch drei WAP-T-NP8 Tumortiere analysiert. Dabei konnte keine Lungenmetastase gefunden werden (Abbildung 41). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Auswertung der Lungenmetastasenhäufigkeit einer Kohorte mit 132 WAP-T-NP8 Tumortieren, die eine Frequenz von ca. 6% Lungenmetastasen bei WAP-T-NP8 Tieren zeigte. Somit zeigten WAP-T Tumore mit *Ceacam1*^{-/-} Hintergrund eine stark erhöhte Metastasierungsrate, was einen ersten Hinweis auf EMT-Ereignisse darstellt.

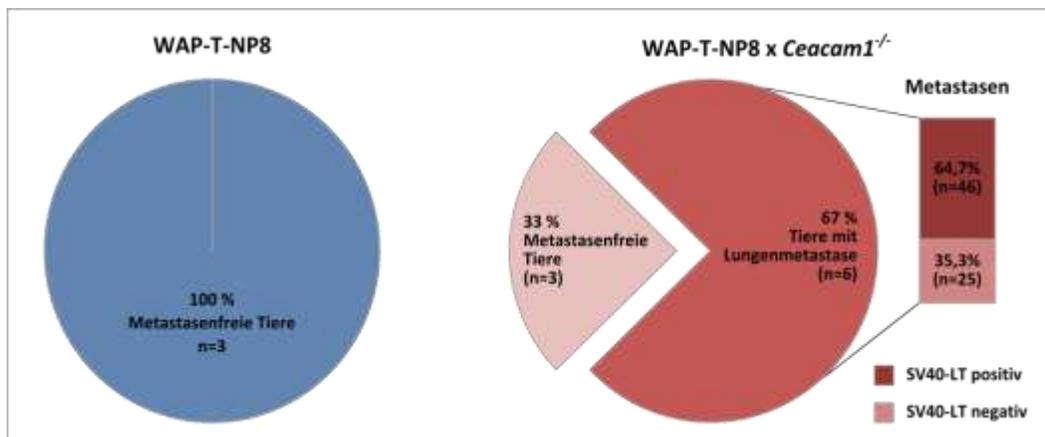


Abbildung 41: Metastasierung in WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren

Darstellung der prozentualen Lungenmetastasierungsrate in induzierten WAP-T-NP8 (n=3, links) und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tieren (n= 9, rechts). Die Ergebnisse immunhistologischer Untersuchungen für SV40 LT auf 6 µm dicken Paraffinschnitten der Lungenmetastasen (n=71) werden prozentual dargestellt. Diese Daten wurden von Daniela Gerstel und Dr. Andrea Horst im Rahmen der Kooperation produziert.

Um weitere Hinweise auf ein verstärktes EMT-Potential in WAP-T x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren zu liefern, wurden die WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumorproben RNA-Microarray Expressionsanalysen unterzogen. Diese Untersuchungen wurden auf der Affymetrix Mouse 430 v2.0 Plattform durchgeführt. Tabelle 21 fasst die Liste der Gene zusammen, die in den *Ceacam1*^{-/-} Tumoren im Vergleich zu den *Ceacam1*^{wt} Tumoren entweder mindestens zweifach hochreguliert oder mindestens dreifach herunterreguliert sind. Die 7 am stärksten negativ regulierten Ausgaben stehen für das CEACAM1-Transkript und bestätigen das Ausschalten des Gens in diesem Mausmodell. Mit einem 42,2-fachen Expressionsunterschied ist *Rsp9* (kodierend für das ribosomale Protein S9, RSP9) das am stärksten hochregulierte Gen. RSP9 ist in der Regulation der Zellproliferation involviert und wird für eine korrekte Zellteilung benötigt. Im Zusammenhang mit Mammakarzinomen wurde zudem eine Deregulation der RSP9-Expression bei saudi-arabischen Frauen beobachtet (Crnogorac-Jurcevic, Efthimiou et al. 2001; Bin Amer, Maqbool et al. 2008; Lindstrom and Zhang 2008). Ein weiteres stark hochreguliertes Gen kodiert für *Dermokine (Dmkn)*, ein sezerniertes Protein, das in neuen Epithelien und in invasiven Prostatakarzinomen exprimiert wird (Tagi, Matsui et al. 2010). Die biologische Funktion von Dmkn ist bislang noch unbekannt. Interessanterweise gehört *Clusterin (Clu)* mit einer 2,4- bis 2,5-fach verstärkten Expression zu den 20 Genen, die in *Ceacam1*^{-/-} Tumoren am stärksten hochreguliert sind. Es ist bekannt, dass Clusterin in biologischen Prozessen der Karzinogenese, der Tumorprogression und der Metastasierung involviert ist (Shannan, Seifert et al. 2006; Flanagan, Whyte et al. 2010). Zu den hochregulierten Genen gehört weiterhin *Fgf1 (Fibroblast Growth Factor 1)*. FGF1 wird in der Literatur als begünstigender Faktor der Metastasierung und Aktivator der Expression bestimmter Matrix Metalloproteinase (MMPs), wie z.B. MMP9 beschrieben (Lungu, Covalada et al. 2008). Weiterhin kann eine stärkere Expression von CEACAM10 in den *Ceacam1*^{-/-} Tumoren beobachtet werden. CEACAM10 besitzt eine große Homologie zu CEACAM1 und wird möglicherweise als Kompensation zum Verlust von CEACAM1 hochreguliert. Ein weiteres Gen, das in *Ceacam1*^{-/-} Tumoren hochreguliert wird, ist *Accs1 (acyl-CoA synthetase short-chain family member 1)*. *Accs1* wird in der Literatur in Zusammenhang mit dem Überleben von Leberkarzinomzellen beschrieben (Yun, Bang et al. 2009). Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der Verlust von CEACAM1 in den WAP-T Tumorzellen zur verstärkten Expression von Genen führt, die Invasion und Metastasierung begünstigen können.

In der Liste der negativ regulierten Gene (Tabelle 21) sind nur wenige Kandidaten vorhanden, die als Regulatoren der Invasion bzw. der Metastasierung von Tumorzellen beschrieben sind. Das Gen *Brd4* kodiert für das Bromodomain Protein 4 und wird in *Ceacam1*^{-/-}-Tumoren 3,3-fach herunterreguliert. Die Expression von *Brd4* in murinen Mammakarzinomzellen inhibiert sowohl Invasions- als auch

Mobilitätseigenschaften, reduziert die Expression von Matrix Metalloproteinasen, und korreliert mit dem Überleben und somit mit einer guten Prognose bei Brustkrebspatientinnen (Crawford, Alsarraj et al. 2008). Das *poly(A) binding protein cytoplasmic 1 (Pabpc1)* korreliert ebenso mit einer guten Prognose bei Patienten mit Speiseröhrenkarzinom und wird in *Ceacam1*^{-/-}-Tumoren 3,4-fach weniger exprimiert (Takashima, Ishiguro et al. 2006). Das *Matrin3*-Gen (*Matr3*) gehört zur DNA-Reparatur-Maschinerie. Bei DNA-Schäden wie z.B. Doppelstrangbrüchen führt die Expression von *Matr3* zur Inhibition des Zellzyklus (Salton, Lerenthal et al. 2010). Die negative Regulation von *Matr3* korreliert mit der erhöhten Aggressivität der *Ceacam1*^{-/-}-Tumorzellen.

Als Zusammenfassung der Microarrayanalyse weisen WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-}-Tumore ein aggressiveres und ein mit erhöhten Invasions- und Metastasierungseigenschaften assoziiertes Expressionsprofil. Gene wie *Rsp9*, *Dmkn*, *Clu*, *Fgf1* und *Accs1*, die mit einer verstärkten Aggressivität des Tumors einhergehen, waren in den *Ceacam1*^{-/-}-Tumoren überexprimiert, während Inhibitoren der Zellteilung und Invasivität von Tumorzellen wie *Brd4*, *Pabpc1* und *Matr3* herunterreguliert waren. Unter dem Aspekt einer Verschiebung des EMT/MET-Gleichgewichts von Tumorzellen in den WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-}-Tumoren konnten allerdings in den Microarrayanalysen nur wenige Hinweise beobachtet werden. Weder Marker spezifisch für Epithelzellen, noch Marker spezifisch für mesenchymale Zellen befanden sich unter den 40 Genen, die am stärksten zwischen undifferenzierten WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren differenziell reguliert sind. Hingegen wurde FGF1 als Effektor von EMT-Prozessen beschrieben (Billottet, Tuefferd et al. 2008). Unter anderem wird in der Literatur berichtet, dass die Expression von FGF1 die Aktivierung von MMP9 bewirken kann, was zum Abbau von extrazellulärer Matrix und somit erhöhter Motilität führt. Ebenso im Zusammenhang mit EMT ist Clusterin, als reguliertes Gen des TGF-β1-Signalweges (*transforming growth factor beta 1*), ein durchaus interessanter Befund aus diesen Analysen (Andarawewa, Erickson et al. 2007; Lenferink, Cantin et al. 2010). Angesichts dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die durch den Verlust von CEACAM1 verstärkte Metastasierungsrate mittels einer zumindest nicht vollständigen EMT verursacht wird, was erklären würde, warum Intermediärfilamente in den komparativen Analysen nicht sichtbar differenziell reguliert werden. Um dieser Annahme näher zu kommen, wurden als nächstes Immunmarkierungen für ausgewählte Marker, die den aggressiveren Phänotypen der RNA-Expressionsprofile untermauern würden, durchgeführt.

Tabelle 21: Ergebnisse von RNA-Microarrays aus WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren

Die Tabelle stellt die 20 hoch- (links) und herunterregulierten (rechts) Gene mit p-Werten ≤ 0,01 in dem Vergleich WAP-T-NP8 (n=6) vs. WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumore (n=6) dar. Diese Daten wurden von Daniela Gerstel und Dr. Andrea Horst am UKE im Rahmen der Kooperation produziert.

Probe Set ID	Gene	Fold change	Probe Set ID	Gene	Fold change
1434624_x_at	Rps9	43.0	1452532_x_at	Ceacam1	-10.2
1428781_at	Dmkn	7.0	1427711_a_at	Ceacam1	-9.4
1448573_a_at	Ceacam10	5.9	1425538_x_at	Ceacam1	-8.3
1423136_at	Fgf1	3.6	1422123_s_at	Ceacam1 /// Ceacam2	-7.4
1416617_at	Acss1	2.7	1427630_x_at	Ceacam1	-7.0
1428614_at	Ldhd	2.7	1450494_x_at	Ceacam1	-6.9
1451191_at	Crabp2	2.6	1425675_s_at	Ceacam1	-5.8
1450869_at	Fgf1	2.6	1437422_at	Sema5a	-4.5
1447112_s_at	Cryl1	2.6	1450781_at	Hmga2	-4.3
1419456_at	Dcxr	2.6	1450079_at	Nrk	-4.3
1454849_x_at	Clu	2.5	1423522_at	Npm3	-3.9
1418626_a_at	Clu	2.5	1423331_a_at	Pvrl3	-3.8
1433525_at	Ednra	2.4	1433509_s_at	Reep1	-3.8
1437689_x_at	Clu	2.4	1424800_at	Enah	-3.5
1426293_at	Zfp790	2.4	1453840_at	Pabpc1	-3.4
1419097_a_at	Stom	2.4	1424922_a_at	Brd4	-3.3
1437458_x_at	Clu	2.4	1448673_at	Pvrl3	-3.3
1438910_a_at	Stom	2.3	1415903_at	Slc38a1	-3.2
1428737_s_at	Gramd3	2.3	1441272_at	Matr3	-3.1
1417089_a_at	Ckmt1	2.3	1454904_at	Mtm1	-3.1

Der Abbau der extrazellulären Matrix wird in zahlreichen Veröffentlichungen als ein EMT-assoziiertes Mechanismus, der die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen begünstigt, beschrieben (Almholt, Green et al. 2007; Martin, Carter et al. 2008; Rizki, Weaver et al. 2008). Basierend auf der in den RNA-Microarrays von *Ceacam1*^{-/-} Tumoren stärkeren Expression von FGF1 wurden Tumore aus WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tieren immunhistochemisch einerseits auf Kollagen IV und andererseits auf MMP9 (Matrix Metalloproteinase 9) gefärbt. Hierbei diente Kollagen IV als Marker der extrazellulären Matrix und MMP9 als spezifisches Enzym für den Verdau von Kollagen IV. Repräsentative Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 42A dargestellt. Es zeigte sich, dass WAP-T-NP8 Tumore ein scharf begrenztes, intaktes Kollagen IV Netz aufweisen. In diesen Tumoren konnte keine deutliche MMP9-Färbung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumore Anzeichen einer Degradation der extrazellulären Matrix. Die Stromastreifen dieser Tumore wiesen unscharfe, diffuse Kollagen IV Färbungen und ein starkes MMP9-Signal auf. So korreliert die stärkere Expression von *Fgf1*, beobachtet in den RNA-Expressionsanalysen (Tabelle 21), mit der intensiven MMP9-Färbung der WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumore. Bezüglich der extrazellulären Matrix und Enzymen, die für deren Abbau verantwortlich sind, hatte also der Verlust von CEACAM1 in WAP-T Tumoren eine stärkere Ausbildung des Invasivitäts- und EMT-Phänotyps zufolge.

Ein anderer bekannter Signalweg, der EMT- und MET-Prozesse moduliert, ist der *Wnt-pathway*. Besonders interessant dabei ist die Eigenschaft von CEACAM1, über seine intrazelluläre Domäne β -Catenin, einen der Haupteffektoren des Wnt-Signalweges, an der Plasmamembran zu binden (Leung, Turbide et al. 2008). Durch diese Sequestrierung kann β -Catenin nicht in den Zellkern translokalisieren. Als Folge werden die Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges nicht aktiviert und dadurch eine EMT verhindert (Thiery and Sleeman 2006; Kalluri 2009). Deshalb erschien eine Färbung von β -Catenin durchaus relevant, um weitere Hinweise für EMT-Ereignisse zu sammeln. Die IHC-Färbungen (Abbildung 42B) bestätigten die Vermutung und zeigten, dass in Anwesenheit von CEACAM1 in WAP-T Tumoren β -Catenin an der Plasmamembran von Tumorzellen lokalisiert ist, während es in *Ceacam1*^{-/-}-Tumoren im Kern lokalisiert ist. Eine Modulation des Wnt-Signalweges und somit von EMT-Ereignissen durch Verlust von CEACAM1 ist anzunehmen.

Ebenfalls ein Merkmal von EMT-Ereignissen ist der sequentielle Abbau von Zell-Zell-Adhäsionskomplexen wie *tight junctions* (Thiery and Sleeman 2006; Andarawewa, Erickson et al. 2007). Ein bekannter Bestandteil dieser Komplexe, ZO-1 (*zonula occludens 1*), wird in der frühen Phase des EMT-Prozesses abgebaut (Lindley and Briegel 2010). Aus diesem Grund wurde die Verteilung von ZO-1 mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren analysiert (Abbildung 42C). Dabei konnte beobachtet werden, dass WAP-T Tumore eine klare ZO-1-Färbung, die wie erwartet an der Schnittstelle von Zell-Zell-Kontakten lokalisiert war, aufweisen. Hingegen konnte keine eindeutige Färbung von ZO-1 in WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren gefunden werden.

Als Zusammenfassung der verschiedene EMT-Marker Färbungen konnte hier gezeigt werden, dass der Verlust von CEACAM1 in WAP-T Tumoren einen verstärkten EMT-Phänotyp verursacht, obwohl keine Unterschiede in der Expression von Intermediärfilamenten gefunden worden waren.

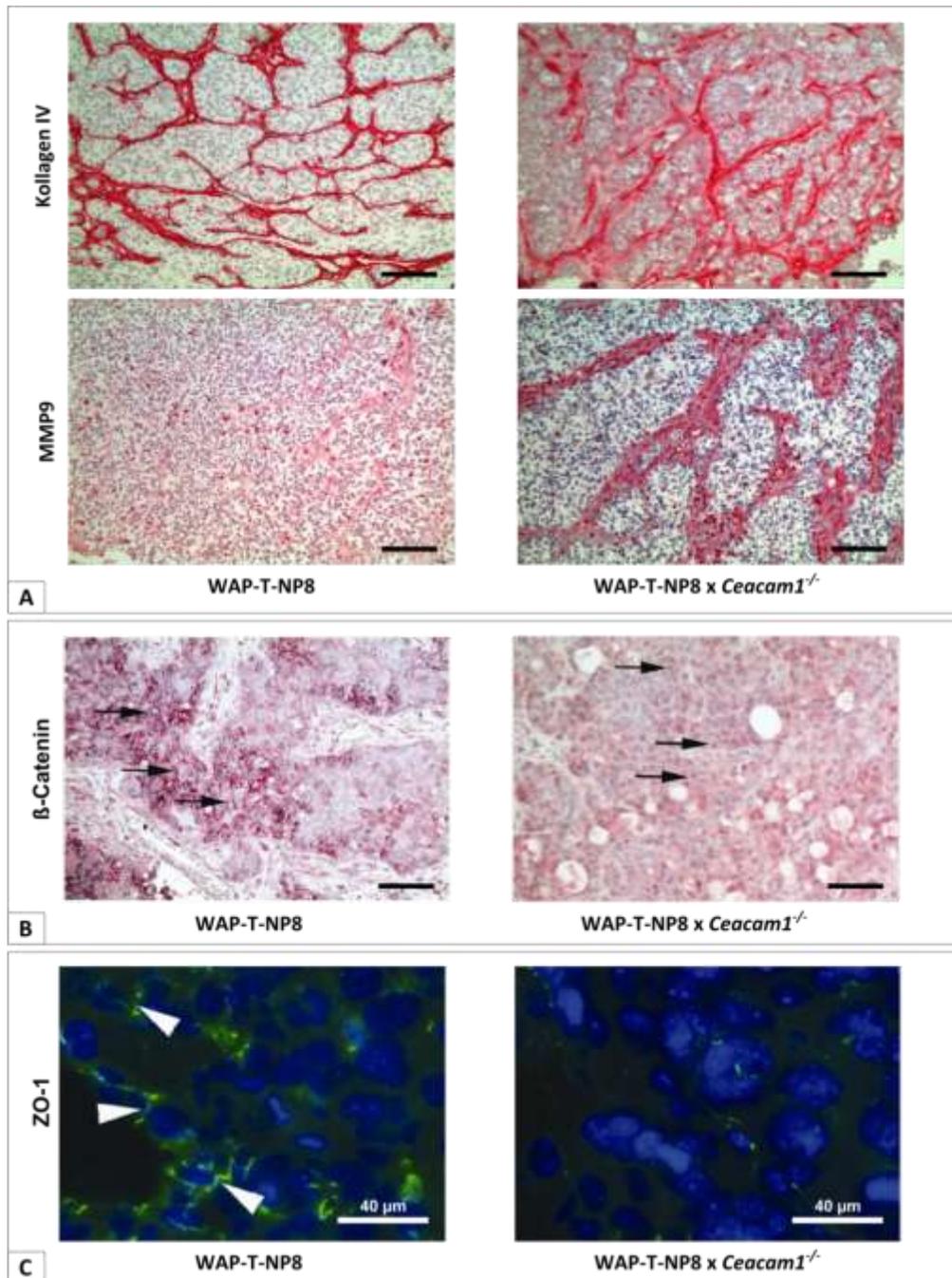


Abbildung 42: EMT-assoziierte Marker in WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren

Immunhistologie von 6 µm dicken Paraffinschnitten aus WAP-T-NP8 (links) und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren (rechts). **A:** IHC-Färbungen für Kollagen IV in der oberen Zeile und MMP9 in der unteren Zeile. **B:** IHC-Färbungen für β-Catenin: Die Pfeile stellen eine membranständige Lokalisierung bei WAP-T-NP8 Tumoren (links) und nukleäre Lokalisierung bei WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren (rechts) dar. **C:** Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (grün): Die Pfeile stellen eine membranständige Lokalisierung in WAP-T-NP8 Tumoren (links) dar. Die Detektion erfolgte über ein fluoreszierenden Alexa®-gekoppelten sekundären Antikörper. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Die Aufnahmen erfolgten (**A, B**) mit dem 20x-Objektiv eines Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer ProgRes C12 CCD-Kamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) versehen war, bzw (**C**) mit dem 63x Ölobjektiv eines Leica DMI6000B Mikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland). Maßstab: **A, B:** 100 µm; **C:** 40 µm. Diese Daten wurden von Daniela Gerstel und Dr. Andrea Horst im Rahmen der Kooperation produziert.

IV.2.3 Vergleich des Metastasierungspotentials von *Ceacam1*^{wt} und *Ceacam1*^{-/-} WAP-T-NP8 Tumorzellen nach orthotopischer Transplantation in syngenem Empfängertieren

Endogene Tumore in WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tieren weisen einen CEACAM1 negativen Hintergrund auf, d. h. sowohl Tumorzellen als auch Tumorumgebung exprimieren kein CEACAM1. Um die erhöhte Metastasierungsrate von *Ceacam1*^{-/-}-Tumortieren auf den Verlust von CEACAM1 in Tumorzellen, unabhängig vom Einfluss einer CEACAM1-negativen Umgebung, einzuschränken, wurden weitere Transplantationen durchgeführt. Hierbei sollte die Metastasierungseffizienz von CEACAM1 positiven bzw. negativen WAP-T Tumorzellen in den Lungen von WAP-T-NP8 Empfängertieren untersucht werden. Hierfür wurden 10⁵ dissoziierte Primärzellen aus WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumore (n=6) und aus WAP-T-NP8 Tumore (n=6) jeweils in ein WAP-T-NP8 Empfängertier transplantiert. Die Lungen dieser Tiere wurden anschließend hinsichtlich der Metastasenanzahl verglichen. Die Tabelle 22 liefert einen Überblick der analysierten Tiere.

Tabelle 22: Darstellung der bezüglich Lungenmetastasierung miteinander verglichenen transplantierten Tiere

Spendertiere	Empfängertiere	Spendertiere	Empfängertiere
WAP-T-NP8 12700-7	WAP-T-NP8 - 12771	WAP-T-NP8 x CEACAM1 ^{KO} 13221-7	WAP-T-NP8 - 13357
WAP-T-NP8 12701-2	WAP-T-NP8 - 12772	WAP-T-NP8 x CEACAM1 ^{KO} 13245-6	WAP-T-NP8 - 13311
WAP-T-NP8 12706-8	WAP-T-NP8 - 12782	WAP-T-NP8 x CEACAM1 ^{KO} 13221-7	WAP-T-NP8 - 13329
WAP-T-NP8 12776-7	WAP-T-NP8 - 12856	WAP-T-NP8 x CEACAM1 ^{KO} 13250-5a	WAP-T-NP8 - 13312
WAP-T-NP8 12846-8	WAP-T-NP8 - 12935	WAP-T-NP8 x CEACAM1 ^{KO} 13314-2	WAP-T-NP8 - 13358
WAP-T-NP8 12847-7	WAP-T-NP8 - 12878	WAP-T-NP8 x CEACAM1 ^{KO} 13367-7	WAP-T-NP8 - 13432

Für das Aufspüren von Metastasen wurden wie zuvor serielle Schnitte H&E und SV40 LT Färbungen unterzogen. Nach Transplantation von *Ceacam1*^{-/-} Tumorzellen konnte eine Lungenmetastase entdeckt werden (Maus #13357). Diese Metastase exprimierte das SV40 LT (Abbildung 43). Bei den mit WAP-T-NP8 Zellen transplantierten Empfängermäusen wurde keine Metastase entdeckt. Aufgrund der geringen Anzahl der detektierten Metastasen kann aus diesem Transplantationsexperiment keine eindeutige Aussage bezüglich erhöhter Metastasierungsrate von CEACAM1^{-/-} Tumorzellen getroffen werden. Allerdings ist auch bei dieser Untersuchung die Tendenz zu erkennen, dass WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumorzellen ein stärkeres Metastasierungspotential aufweisen als WAP-T-NP8 Tumorzellen, die CEACAM1 exprimieren.

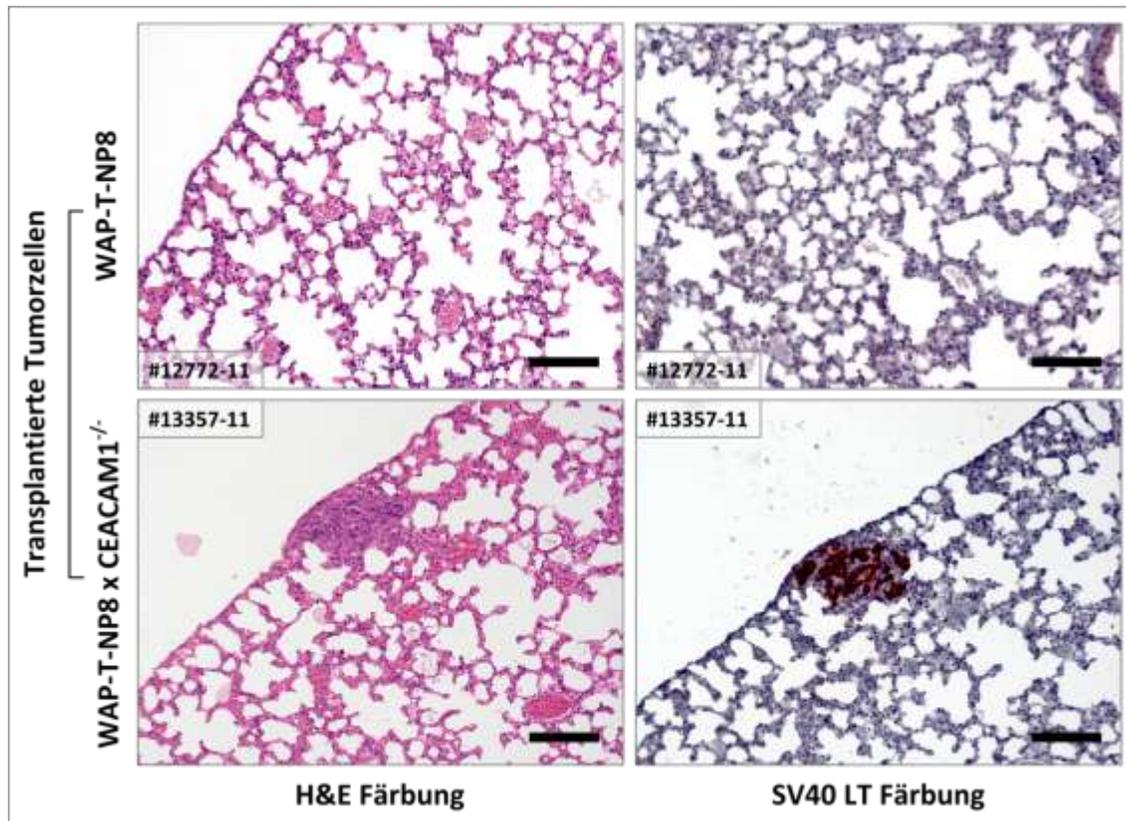


Abbildung 43: Histopathologie und Immunhistologie von Lungen aus transplantierten WAP-T-NP8 Tieren
 Färbungen von 4 µm dicken Lungen-Paraffinschnitten aus mit WAP-T-NP8 (oben) bzw. WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} (unten) primären Tumorzellen transplantierten Tieren. Links: H&E-Färbungen; rechts: SV40 LT Färbungen. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 20x Objektiv eines Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer ProgRes C12 CCD-Kamera (Jenoptik, Jena, Deutschland) versehen war. Maßstab: 100 µm.

Angesichts der Metastasierungsrate der WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tiere (6 von 9 Tumortiere) mit endogenem Tumorwachstum war die Metastasenanzahl in den vorliegenden Transplantationsexperimenten (1 von 6 Tumortiere) deutlich geringer als erwartet. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Verlust von CEACAM1 in der Tumormikroumgebung ebenso wie auf Tumorzellen eine verstärkte Invasivität von Tumorzellen bewirken kann. Um dieser Annahme nachzugehen wurde als nächstes die Tumervaskularisierung in Betracht gezogen.

IV.2.4 Auswirkung des Verlustes von CEACAM1 auf die Qualität von Blutgefäße in WAP-T Tumore

Im Zusammenhang mit Vaskularisierung von schnell replizierenden Geweben und Tumoren wurde die Expression von CEACAM1 auf Endothelzellen mit Prozessen der Neoangiogenese assoziiert (Horst, Ito et al. 2006). In derselben Veröffentlichung berichteten die Autoren, dass der Verlust von CEACAM1 Defekte in der Gefäßneubildung verursachen kann. Unter diesem Aspekt wurde in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Wagener die Qualität der Tumorgefäße von WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tiere verglichen. Zuerst wurde die Permeabilität von Blutgefäßen analysiert, indem *Ceacam1*^{wt} und *Ceacam1*^{-/-} Tumortieren FITC-Dextran gespritzt wurde, das durch sein hohes Molekulargewicht nicht durch Gefäßwände diffundieren kann. Dabei wurde in *Ceacam1*^{-/-}-Tumoren ein diffuses FITC-Dextran Signal innerhalb aber auch außerhalb der Vaskulatur beobachtet, während in WAP-T-NP8 Tumoren mit *Ceacam1*^{wt} Hintergrund das Fluoreszenzsignal ausschließlich in Gefäßen zu detektieren war. Diese Beobachtung lieferte den Beweis für eine anormale Blutgefäßpermeabilität in diesen Tumoren (Abbildung 44A). Weiterhin wurde die Reifung der Tumorgefäße in den jeweiligen Tumortieren untersucht. Ein guter Hinweis auf ausgereifte Blutgefäße ist die Bedeckung der Endothelzellen durch Perizyten. NG2 (*chondroitin sulfate proteoglycan 4, Cspg4*) ist ein geeigneter Marker für die Darstellung von Perizyten und wurde deswegen in Immunfluoreszenzmarkierung auf WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumore zusammen mit CD31 co-gefärbt (Abbildung 44B). Dabei stellte sich heraus, dass Tumorgefäße durch den Verlust von CEACAM1 eine schlechtere Perizyten-Bedeckung und somit einen anormalen Reifungsphänotyp aufweisen.

Zusammenfassend zeigten die Vaskularisierungsanalysen, dass der Verlust von CEACAM1 bedeutende Konsequenzen auf Permeabilität und Reifung der Blutgefäße von WAP-T Tumoren hat. Im Kontext der erhöhten Metastasierung von WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren im Vergleich zu WAP-T-NP8 Tumoren ist es durchaus denkbar, dass Tumorzellen durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität leichter in die Blutbahn gelangen und somit leichter ferne Organe erreichen können. So konnte in der vorliegende Arbeit Hinweise darauf gefunden werden, dass der Verlust von CEACAM1 eine duale Rolle in der Metastasierung von Tumorzellen spielt: (i) einerseits werden EMT-Ereignisse in Tumorzellen gefördert und (ii) andererseits erleichtert die verstärkte Permeabilität von Tumorblutgefäßen das Infiltrieren der Tumorzellen in die Blutbahn.

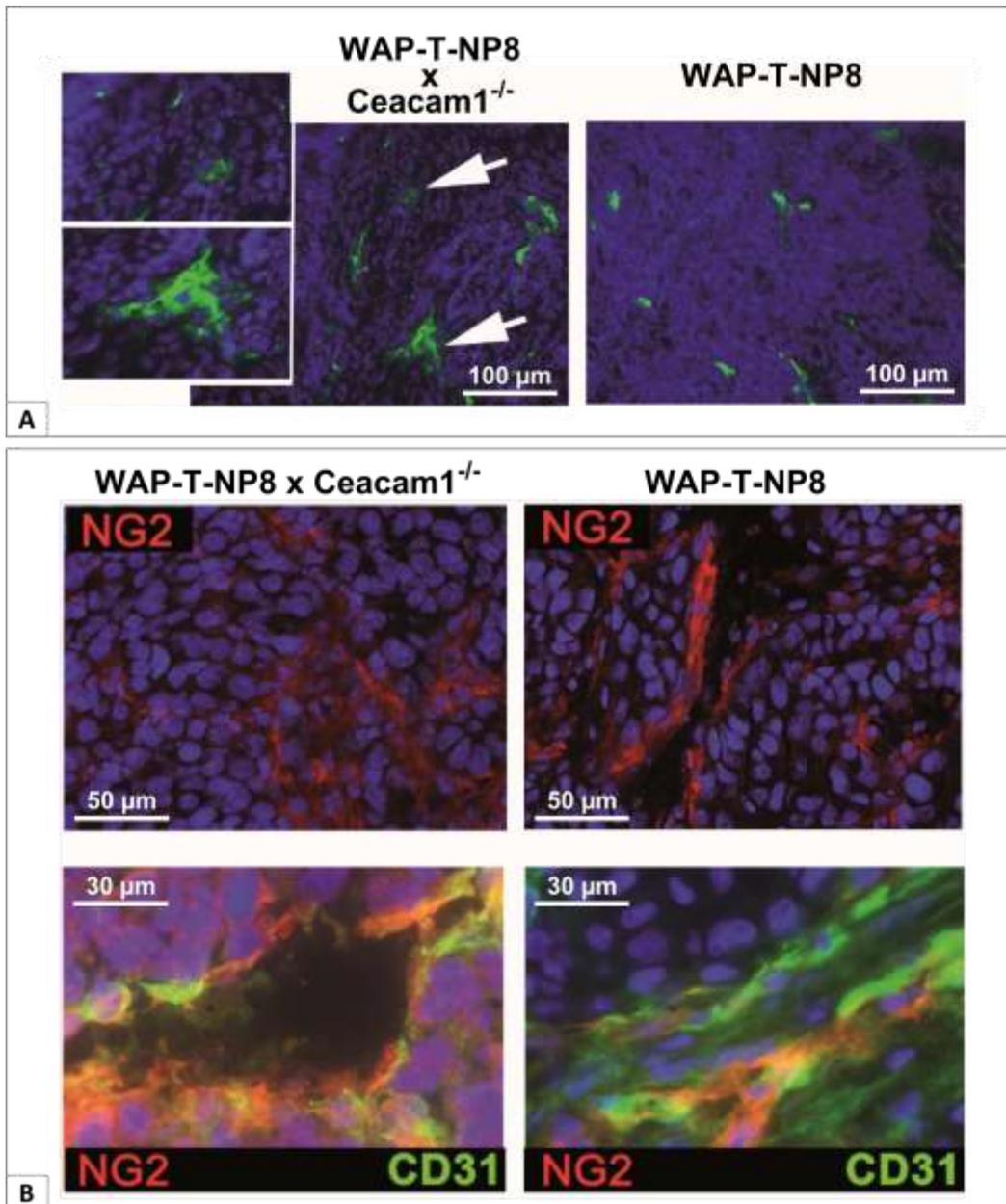


Abbildung 44: Qualität der Blutgefäße in WAP-T-NP8 Tumoren mit *Ceacam1*^{wt} bzw. *Ceacam1*^{-/-}-Hintergrund.

A: Darstellung der Permeabilität von Tumorgefäßen: FITC-Dextran (50mg/ml in PBS) wurde WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} (links) und WAP-T-NP8 (rechts) Tumortieren 15 min vor Sezierung intravenös injiziert. Die Lokalisierung von FITC-Dextran und ggf. dessen Diffusion außerhalb der Gefäße (mit weißen Pfeilen markiert) wurde anschließend an 6 µm dicken Schnitten von Formalin fixierten Tumorproben analysiert. **B:** Darstellung der Bedeckung von Tumorgefäßen durch Perizyten: anti-NG2- und anti-CD31-Antikörper wurden auf 6 µm dicke Schnitte von Formalin fixierten Tumorproben angewendet. Die Detektion erfolgte über fluoreszierende Alexa®- bzw. DyLight®-gekoppelte sekundäre Antikörper, jeweils Rot für NG2 und Grün für CD31. **A** und **B:** Die Aufnahmen erfolgten mithilfe eines Leica DMI6000B Mikroskops (**A:** 20x Objektiv, **B:** 40x und 63x Objektiv). Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert (blau). Maßstäbe: **A:** 100 µm; **B:** 50 µm (oben) bzw. 30 µm (unten).

V DISKUSSION:

Brustkrebs ist die am häufigsten diagnostizierte Krebskrankheit bei Frauen in entwickelten Ländern. Trotz eines immer besseren Verständnis der Tumorentstehung und der Entwicklung neuer und besserer Diagnose- und Therapiestrategien steigt weltweit die Anzahl der durch Mammakarzinome betroffenen Patientinnen und die damit verbundene Mortalität (Kamangar, Dores et al. 2006; Porter 2009; Raica, Jung et al. 2009). Eine effektivere und für die Patienten schonendere Behandlung von Brustkrebs erfordert die weitere Entwicklungen von Präventions- und Diagnoseverfahren, aber auch das Verständnis der molekularen Mechanismen der Erkrankung, die in neue Therapieverfahren einfließen könnten. Die Brustkrebsforschung wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Histopathologien der Tumore, unterschiedliche molekulare Profile und variierenden Überlebensraten erschwert. Mit anderen Worten, Brustkrebs stellt eine sehr heterogene Erkrankung sowohl auf klinischer als auch auf molekularer Ebene dar. Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass sich Mammakarzinome in mindesten fünf verschiedene Subgruppen einteilen lassen, die sich hinsichtlich ihrer Prognose und Therapieresistenzen unterscheiden: *basal-like*, *luminal A*, *luminal B*, *HER2+/ER-* und *normal breast-like* (Perou, Sorlie et al. 2000; Sorlie, Perou et al. 2001; Sorlie, Tibshirani et al. 2003; Sotiriou, Wirapati et al. 2006). Diese Subtypen können in den frühen, nicht invasiven Vorstufen der Krankheit, den *ductal carcinoma in situ* (DCIS), bereits erkannt werden. Die Heterogenität des Brustkrebses lässt sich durch zwei verschiedene und sich teilweise ergänzende Theorien erklären: (i) der Tumorstammzell-Theorie (*cancer stem cell*-Theorie, CSC-Theorie) nach entsteht die Krankheit in epithelialen Stammzellen der Brustdrüse oder deren kommittierten Nachkommen, den Progenitor- oder Vorläuferzellen; (ii) die Theorie der klonalen Evolution nimmt an, dass Tumorzellsubtypen durch spezifische genetische und epigenetische Ereignisse entstehen (Polyak 2007). In letzterer Theorie wird die zelluläre Heterogenität als Resultat eines Wettbewerbes zwischen Tumorzellen verschiedener Phänotypen betrachtet und der Erwerb von Resistenzen auf Therapien als Selektion von Tumorzellklonen mit Wachstumsvorteil. Bei beiden Modellen ist eine einzelne Zelle mit multiplen akkumulierten Mutationen Ausgangspunkt für das Wachstum eines Tumors (Abbildung 6). In der CSC-Theorie stellen mutierte adulte Stamm- bzw. Progenitorzellen des normalen Gewebes die Ursprungszelle der Läsion dar. Vergleicht man die Eigenschaften normaler Gewebestamm- und Progenitorzellen mit den putativ aus diesen Zellen entstehenden Tumorstammzellen, so ergibt sich hinsichtlich ihrer Charakteristika eine breite Homologie; hervorzuheben ist dabei die Eigenschaft der Selbsterneuerung, der Differenzierbarkeit, die Mobilität zu distal gelegenen Organen sowie das Invadieren von benachbarten Geweben. Aufgrund dessen bietet das CSC-Modell eine attraktive neue Theorie zur Erklärung des Ursprungs von Tumorstammzellen (Shipitsin,

Campbell et al. 2007). Die CSC-Theorie erklärt die Heterogenität des Brustkrebses als Ergebnis eines anormalen Differenzierungsprogramms von Stammzellen, und die Mechanismen der Therapieresistenz durch eine vererbte, intrinsische Resistenz der normalen Stammzellen. Das Verständnis der Ursachen die zur Entwicklung der verschiedenen Brustkrebstypen und innerhalb derer zu unterschiedlichen Tumorzelltypen führt, wird erheblich dazu beitragen, gezielte und effizientere Therapien entwickeln zu können.

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Mausmodelle zur Erforschung des Brustkrebses entwickelt. Dabei kamen unterschiedliche Strategien zum Einsatz, um die zu studierenden Läsionen möglichst ähnlich der humanen Situation zu induzieren (Wagner 2004). Bei Xenograft-Modellen erfolgt die Tumorinitiierung durch Injektion von humanen Tumorzellen in immundefiziente Empfängermäuse. Andere Methoden nutzen chemische, virale oder ionisierende Behandlungen zur Induktion von murinen Mammakarzinomen. Transgene Mausmodelle bieten eine weitere Möglichkeit den Brustkrebs zu initiieren und zu modellieren. Das WAP-T Mausmodell wurde wegen seiner großen Ähnlichkeit mit humanen Läsionen als ein für die Analyse von frühen und späten Stadien der Brustkrebsentwicklung geeignetes Modell beschrieben (Schulze-Garg, Lohler et al. 2000; Heinlein, Krepulat et al. 2008; Jannasch, Dullin et al. 2009).

Ziel dieser Arbeit war es, einerseits die Relevanz der CSC-Theorie bei der Entstehung von Mammakarzinomen in WAP-T Mäuse zu untersuchen und andererseits einzuschätzen, ob es möglich ist, Einfluss auf die Differenzierung der potentiellen Tumorstammzellen nehmen zu können. Um die Anwesenheit von Tumorstammzellen in WAP-T Tumoren zu untersuchen wurden aufwendige Charakterisierungsarbeiten durchgeführt, bei denen CSC-spezifische Eigenschaften analysiert wurden, wie die Aufrechterhaltung der intrinsische Tumorerogenität als Nachweis eines Differenzierungspotentials, die Fähigkeit Tumore zu initiieren, und die Expression beschriebener CSC-assoziierter Marker für Mammakarzinome.

Die Untersuchung von Primärtumorzellen ist mit verschiedenen Schwierigkeiten assoziiert, wie eine lange Entwicklungsdauer, eine limitierte Anzahl von verfügbaren endogenen Tumoren, sowie ein kompliziertes und zeitintensives Primärzell-Dissoziierungsverfahren. Aus diesem Grund wurden gleichzeitig endogene WAP-T Primärtumorzellen und eine bereits aus einem WAP-T Tumor etablierte Mammakarzinomzelllinie, die G-2 Zelllinie, in parallelen Experimenten untersucht. Endogene, undifferenzierte WAP-T Tumore und G-2 Zellen teilen viele Charakteristika, wie z.B. die Expression derselben *lineage*-Marker oder die Fähigkeit, Tumore nach Transplantation in syngenen Mäusen zu

initiieren, die den endogenen Tumoren sehr ähnlich sind. Dies machte die G-2 Zelllinie zu einem hervorragenden Werkzeug für die Untersuchungen verschiedener Fragestellungen im Kontext des WAP-T Modells. Durch die Anwendung der G-2 Zellen stand weiterhin eine nahezu unbegrenzte Materialquelle zur Verfügung und es bestand zusätzlich die Möglichkeit, *in vitro* Untersuchungen wie z.B. Subpopulationsanalysen durchführen zu können, was mit primären endogenen WAP-T Tumorzellen nicht möglich ist.

V.1 Charakteristika der WAP-T Tumore

V.1.1 Cytokeratine als geeignete *lineage*-spezifische Marker zur Diskriminierung verschiedener Differenzierungsstatus in WAP-T Tumore

Folgt man der Tumorstammzelltheorie, dann liefert die zelluläre Heterogenität bezüglich *lineage*-spezifischer Marker innerhalb eines Tumors einen Hinweis auf das Differenzierungspotential, und somit auf die Präsenz von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften. Dementsprechend wurde zuerst die Heterogenität der WAP-T Tumore untersucht. Basierend auf den in der Fachliteratur beschriebenen Expressionsmustern wurden die Intermediärfilamente CK8/18 und CK14 jeweils als Marker der luminalen bzw. myoepithelialen Zell-*lineages* ausgewählt (Taylor-Papadimitriou, Stampfer et al. 1989; Mikaelian, Hovick et al. 2006; Moll, Divo et al. 2008; Bocker, Hungermann et al. 2009). Die Spezifität deren Expression wurden zunächst in der normalen murinen Brustdrüse verifiziert. Ein weiteres Cytokeratin, CK6, wurde aufgrund der beschriebenen Expression in unreifen Epithelzellen der Mammae analysiert (Grimm, Seagroves et al. 2002; Li, Welm et al. 2003; Grimm, Bu et al. 2006; Moll, Divo et al. 2008). Das Ergebnis dieser ersten Untersuchungen zeigte, dass im verwendeten Mausmodell die Keratine 8/18 und 14 geeignet sind, um Zellen verschiedener *lineage*-Differenzierungen, d.h. luminaler und basaler/myoepithelialer Herkunft zu unterscheiden. Die Lokalisierung dieser Marker ist in Abbildung 45 schematisch dargestellt. Bezüglich der Expression von Keratin 6, ließ sich in der Immunfluoreszenz wie erwartet keine oder nur eine geringe Anzahl positiver Zellen in normalen adulten Mammagewebe nachweisen. Diese Beobachtungen stimmen mit neuesten Publikationen über die Expression von Cytokeratinen während der embryonalen Entwicklung der murinen Brustdrüse und im adulten Lebenszyklus überein (Sun, Yuan et al. 2010). Allerdings konnten die Autoren zeigen, dass die Unterscheidung luminaler und myoepithelialer Zellen durch CK14 und CK18 nur in der adulten Drüse möglich ist. Während der Embryogenese sowie den ersten Wochen nach der Geburt wurde eine Zellpopulation beschrieben, die sowohl CK14 als auch CK18 exprimiert. Sun et al. gelang weiterhin der

Nachweis einer distinkten Zellpopulation ab Tag 16.5 der Embryogenese bis zu 8 Wochen nach der Geburt, die Cytokeratin 6 zusammen mit den Cytokeratine 8 und 18 exprimiert.

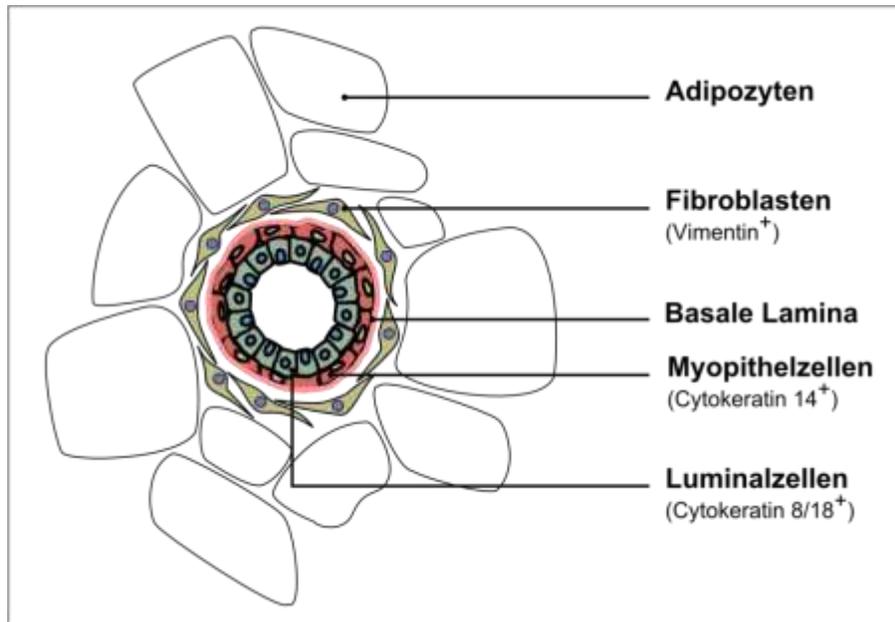


Abbildung 45: Schematische Darstellung eines Duktus von einer adulten murinen Brustdrüse im Querschnitt.

Die Expression von *lineage*-spezifischen Markern in normalem Brustdrüsenepithel jungfräulicher WAP-T Mäuse werden in dieser Abbildung zusammengefasst. Zellen der luminalen Epithelschichten exprimieren Cytokeratin 8/18, während die myoepitheliale Zellschicht Cytokeratin 14 positiv ist. Beide Epithelschichten sind von einer Basallamina umrandet, die wiederum von Vimentin positiven Fibroblasten eingekreist ist. Die kompletten Duktensstrukturen sind in den Adipozyten des Fettpolsters (*fat pad*) eingebettet.

Bei den Untersuchungen von WAP-T Mammakarzinomen wurde anhand der Histomorphologie grundsätzlich zwischen differenzierten und undifferenzierten Tumoren unterschieden (siehe Tabelle 4 und Abbildung 13). Die Expressionsanalyse der drei verschiedenen Cytokeratine in WAP-T Tumoren zeigte, dass CK8/18 ubiquitär und unabhängig vom Tumorgrad in den WAP-T Tumorzellen exprimiert wird. Dieses Ergebnis war aufgrund der Konzeption des Mausmodells zu erwarten. In WAP-T Mäusen steht das Transgen, die SV40 frühe Genregion, unter Kontrolle des gewebespezifischen WAP-Promotors, der ausschließlich in den sekretorischen Epithelzellen der Brustdrüse während der Laktation aktiv ist. In der Maus dienen alle luminalen CK8/18 positiven Epithelzellen der Duktus und Alveoli der Sekretion von Milchkomponenten. In WAP-T Mäusen exprimieren dieselben Zellen zusätzlich zu den Milchproteinen die drei Onkoproteine der SV40 frühe Genregion: Large-T-, small-t- und 17kT-Antigen (LT, st und 17kT). Damit stellen diese Zellen, bzw. deren Vorläufer, den wahrscheinlichsten Ursprung der WAP-T Mammakarzinome dar (Burdon, Sankaran et al. 1991; Hennighausen, Westphal et al. 1991; Moll, Divo et al. 2008).

Anders als CK8/18 weist CK14 abhängig vom Tumor-Differenzierungsgrad unterschiedliche Expressionsmustern auf: während nahezu alle Zellen der differenzierten WAP-T Tumore CK14 positiv sind, zeigen nur einzelne undifferenzierte Tumorzellen eine starke CK14-Expression. Dabei korreliert die Intensität der Expression von CK14 und CK8/18 in den einzelnen Tumorzellen negativ, d.h., dass CK14 positive Zellen eine schwächere CK8/18 Expression aufweisen als CK14 negativen Zellen. Bezüglich CK6 zeigen WAP-T Tumorzellen noch ein anderes Expressionsmuster: einerseits ist CK6 in differenzierten Tumoren komplett abwesend, andererseits weisen undifferenzierte Tumore, wie für CK14, in der Immunfluoreszenz einzelne stark positive Zellen auf, die eine schwächere CK8/18-Expression zeigen. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz konnten sowohl durch Expressionsarrays als auch durch RT-qPCR für die jeweiligen Cytokeratine bestätigt werden.

Zusammenfassend weisen WAP-T Mammakarzinome ähnlich wie humane Mammakarzinome zwei Ebenen der Heterogenität auf: (i) die Mäuse entwickeln verschiedene Typen von invasiven Tumoren (in dieser Arbeit vereinfacht als differenzierte und undifferenzierte Mammakarzinome bezeichnet), die individuelle und spezifische Cytokeratin-Expressionsprofile aufweisen; (ii) eine intrinsische Heterogenität bezüglich der CK8/18, CK14 und CK6 Expression lässt sich zwischen den einzelnen Tumorzellen eines Tumors beobachten. In differenzierten WAP-T Tumoren äußert sich diese Heterogenität durch eine Variation der CK8/18- und CK14-Expressionsintensitäten während undifferenzierte Tumore aus einer Mischung CK8/18^{high}/CK14⁻/CK6⁻, CK8/18⁺/CK14^{high}- und CK8/18⁺/CK6^{high}-Zellen bestehen. Zusammen mit der Expressionsstudie von Sun et al lässt diese letzte Beobachtung vermuten, dass die Initiierung differenzierter und undifferenzierter WAP-T Tumore in unterschiedlichen Vorläuferzellen der Brustdrüse stattfindet. Die zwei distinkten und nicht überlappenden CK18⁺/CK14⁺/CK6⁻ und CK18⁺/CK14⁻/CK6⁺ Vorläuferzellpopulationen, die während der Entwicklung der normalen murinen Brustdrüse schon ab dem Tag 18.5 der Embryogenese beobachtet wurden, stellen potentielle Ursprungszellen für die Entwicklung von WAP-T Tumoren (Sun, Yuan et al. 2010). Unterstützt wird diese Annahme durch den Nachweis bi-potenter CK8/18⁺-Progenitorzellen, die in der luminalen Zellschicht der adulten humanen Brustdrüse lokalisiert sind und sowohl luminale als auch myoepitheliale Zellen als Nachkommen haben können (Pechoux, Gudjonsson et al. 1999). Andere Gruppen konnten zeigen, dass die wenigen luminal lokalisierten CK5⁺/CK14⁺-Epithelzellen bi-potente Progenitorzellen sind, die mit einer bemerkenswerten proliferativen Aktivität sowohl die myoepitheliale CK14⁺/CK18⁻/SMA⁺ Zell-*lineage* als auch intermediäre glanduläre CK14⁺/CK18⁺/SMA⁻-Zellen erzeugen können (Abbildung 46). Ähnliche Beobachtungen wurden für die murine Brustdrüse beschrieben (Bocker, Moll et al. 2002; Bocker, Hungermann et al. 2009). Die Anwesenheit von Cytokeratin 6 wird mit hyperproliferativen Eigenschaften für den Ausbau der

Drüsenstrukturen während der Schwangerschaft beschrieben; weiterhin gilt CK6 auch als potentieller Stamm-/Progenitorzellmarker während der Embryogenese und in der adulten Brustdrüse (Grimm, Seagroves et al. 2002; Li, Welm et al. 2003; Grimm, Bu et al. 2006). Die wenigen CK6-positiven Zellen des reifen Mammagewebes weisen eine luminal Lokalisierung und eine Ko-Expression mit CK18 auf (Smith, Mehrel et al. 1990). Diese Beobachtungen weisen auf die Existenz verschiedener Vorläuferzellen in den luminalen Zellschichten des adulten Brustdrüsenepithels hin, in denen das Transgen des WAP-T Mausmodells nach Induktion exprimiert wird. Somit stellen alle diese Stamm- und Progenitorzellen potentielle Ursprungszellen für die Initiierung von WAP-T Mammakarzinomen dar.

Zum Vergleich mit endogenen WAP-T Tumoren wurden G-2 Zellen *in vitro* (in der Zellkultur) und *in vivo* (als transplantierte Tumore) bezüglich der Expressionsmuster der Cytokeratine 8/18 und 14 untersucht. Hier zeigte es sich, dass G-2 Zellen beide Marker in gleicher Weise wie endogene Tumore exprimieren. Die in G-2 Tumoren beobachteten Expressionsmuster ähneln denen von undifferenzierten WAP-T Tumoren, d.h. eine ubiquitäre CK8/18 Expression und einzelne verstreute CK14 positive Zellen. So weist die G-2 Zelllinie eine Heterogenität bezüglich der *lineage*-Marker auf, die wie in endogenen Tumoren auf ein Differenzierungspotential dieser Zellen hinweist.

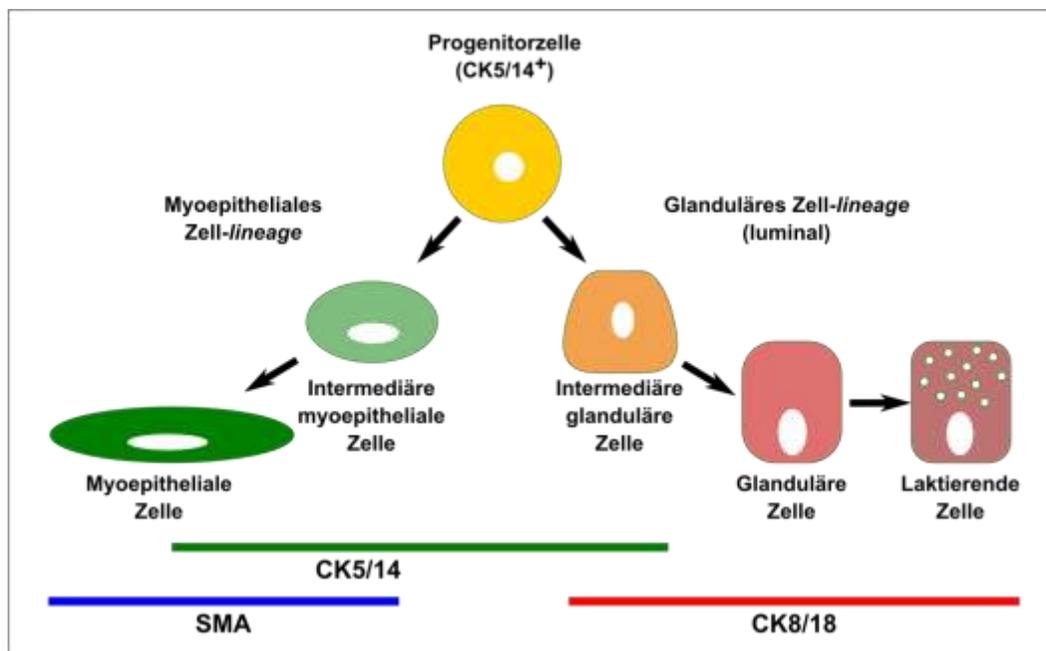


Abbildung 46 Expression der Cytokeratine 5/14 und 8/18 in den verschiedenen Zelltypen des Mammaepithels

Die Progenitorzellen des ruhenden Mammaepithels exprimieren die basalen Cytokeratine 5/14 (CK 5/14). Im Rahmen einer Differenzierung zur glandulären Zelle wird die Expression von CK5/14 schrittweise herabgesetzt, während die Expression der luminalen Cytokeratine 8/18 angeschaltet wird. Bei einer Differenzierung zur myoepithelialen Zelle wird CK5/14 weiter exprimiert, während die Expression von glattmuskulärem Aktin (smooth muscle actin, SMA) beginnt und graduell zunimmt. (Bocker, Hungermann et al. 2009)

Unter dem Aspekt eines Vergleichs mit der humanen Erkrankung liefert die Charakterisierung der CK8/18-, CK14- und CK6-Expression einen weiteren Hinweis auf eine hohe Ähnlichkeit der WAP-T Tumore mit humanen Mammakarzinomen. In den letzten 20 Jahren zeigten zahlreichen Expressionsstudien über Cytokeratine, dass, wie in dem vorliegenden Mausmodell nahezu alle humanen Mammakarzinome positiv für CK8 und CK18 sind (Malzahn, Mitze et al. 1998; Crawford, Alsarraj et al. 2008). Die Expression von basalen Cytokeratinen wie CK14 und CK5/6 ist mit den ERB-B2-, *basal-like*- und dem zum Teil überlappenden *triple negative*-Subtypen assoziiert (Lerma, Barnadas et al. 2009). Dies, sowie entweder homogene oder heterogene Expressionsmuster konnte ebenso in den WAP-T Tumoren beobachtet werden. Interessanterweise weisen beide ERB-B2- *basal-like*-Brustkrebstypen die meisten Mutationsraten im p53-Tumorsuppressorgen mit jeweils 80% bzw. 75% der Fälle auf. Diese Mutationen verursachen einen Funktionsverlust des Tumorsuppressors, eine Situation, die in den Tumorzellen des WAP-T Mausmodells durch Bindung des SV40-LT an p53 ebenso gegeben ist (Sorlie, Perou et al. 2006). Zusammen mit der Expression basaler Cytokeratine zeigen WAP-T Tumore und diese humanen Mammakarzinome damit große Ähnlichkeiten, was erneut die Relevanz dieses Mausmodells für die Untersuchung der Biologie des humanen Brustkrebses bestätigt.

V.1.2 Tumorinitiierende Zellen in WAP-T Mammakarzinomen

WAP-T Tumore zeigen, wie auch der humane Brustkrebs, eine intrinsisch heterogene *lineage*-Markerexpression, was auf Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential hinweist und somit die Tumorstammzelltheorie unterstützt. Nach der CSC-Theorie ist die große Mehrheit der Zellen eines Tumors nicht tumorigen; nur ein kleiner Anteil der Tumorzellen weist die notwendigen Proliferations- und Selbsterneuerungseigenschaften für die Initiierung, die Entwicklung und das Aufrechterhalten eines Tumors auf (Clarke 2005). Die Transplantation dieser sogenannten tumorinitiierenden Zellen (*tumor initiating cells*, TICs) in adäquate Empfängertiere führt zur Entwicklung eines Tumors, der dem Primärtyp phänotypisch gleicht und, ähnlich wie dieser, einerseits eine neue kleine TICs-Population aufweist und andererseits heterogene, nicht tumorigene Zellenpopulationen beinhaltet. Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, ob sich die Tumorzell-Subpopulationen innerhalb eines WAP-T Tumors in ihren Tumorinitiierungseigenschaften unterscheiden.

Das Abschätzen des Anteils potentiell tumorigener Vorläuferzellen und deren Isolierung basieren in den meisten Fällen auf spezifischen morphologischen und molekularen Profilen (z.B. Oberflächenmarker), sowie auf der Anwendung von Verfahren, die Zellen nach Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Antikörpern die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) bzw.

magnetischen Immunosortierung selektionieren. Bei unbekanntem molekularen Signaturen, wie im vorliegenden Fall, ist die Anreicherung von Stamm- und Tumorstammzellen ein mühsames Vorhaben, bei dem zahlreiche vermeintliche Marker getestet werden müssen. Um das zeitintensive Screening vieler Kandidatenmarker auf dafür benötigte große Menge von seltenem Primärmaterial zu vermeiden, werden Zellkultur-basierte Verfahren für die Vermehrung und die Erhaltung von Zellen mit Vorläufereigenschaften *in vitro* entwickelt. Eine sehr verbreitete Methode ist der sogenannte *spheres forming assay* (*mammospheres forming assay* bei Mammaepithelzellen), der auf der Kultivierung von Zellen in Suspension und in Abwesenheit von Serum im Kulturmedium basiert (Reynolds, Tetzlaff et al. 1992; Dontu, Abdallah et al. 2003). Unter diesen Bedingungen sterben differenzierte Zellen durch „Anoikis“ (Apoptose unter nicht adhärenen Bedingungen) während Zellen mit Vorläufereigenschaften überleben und multizelluläre Sphäroiden bilden (Dontu and Wicha 2005). Verglichen mit den Ursprungsgeweben weisen diese Sphären einen signifikant erhöhten Anteil von Stamm- und Vorläuferzellen auf, die Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential dabei erhalten. Die Anwendung der Mammosphären-Kultivierung ermöglichte die Anreicherung und eine relativ schnelle Charakterisierung von normalen humanen sowie murinen Mamma-Stammzellen (Yin, Liao et al. 1994; Dontu, Abdallah et al. 2003). Auch für die Untersuchung von Tumorstammzellen in Brustkrebs wurden Mammosphärenassays erfolgreich angewendet (Ponti, Costa et al. 2005; Grange, Lanzardo et al. 2008; Grimshaw, Cooper et al. 2008).

Primäre WAP-T Mammakarzinomzellen lassen sich selbst bei Anwendung des Mammosphären-Verfahrens nur sehr schwer *in vitro* kultivieren. Dies erklärt sich aus der Verwendung des WAP-Promotors, der für die Expression des Transgens und somit für die Tumorentstehung und -aufrechterhaltung verantwortlich ist. Wie von Klein et al. beschrieben, konnten auch wir beobachten, dass der WAP-Promotor schon einigen Stunden nach Beginn der *in vitro* Kultivierung von primären WAP-T Tumorzellen ausgeschaltet wird (Klein, Guhl et al. 2005). Dieses Phänomen wird zurzeit in unserem Labor weiter untersucht. Die Mammosphären-Kultivierung von Primärtumorzellen war somit ungeeignet für die Analysen von tumorinitiierenden Zellen in dem WAP-T Mausmodell.

Aus diesem Grund wurden sowohl endogene WAP-T Primärtumorzellen als auch G-2 Zellen in den Experimenten zur Identifizierung und Charakterisierung potentieller WAP-T Tumorstammzellen mit einbezogen. Für diese Untersuchungen wurde die Methode der orthotopischen Zelltransplantation in syngenen Empfängertieren ausgewählt. Dieses *in vivo* Verfahren gilt als Goldstandard für die Analyse der Selbsterneuerungs- und Proliferationseigenschaften von Stamm- und Tumorstammzellen (Nakshatri,

Srouf et al. 2009; Alison, Guppy et al. 2010). Die Anwendung der G-2 Zelllinie ermöglichte hierbei, *in vitro* Analysen parallel zu den Transplantationen durchzuführen.

V.1.3 Tumorentwicklung nach orthotopischer Transplantation primärer WAP-T Tumorzellen in syngenem Tieren

Zur Etablierung und Optimierung des Transplantationsverfahrens von endogenen WAP-T Tumorzellen begannen wir mit der Injektion von 10^6 Tumorzellen aus WAP-T-NP8 Mammakarzinomen in das Brustdrüsen-Fettpolster (*mammary fat pad*) von BALB/c Wildtyp-Empfängertieren. Hierbei entwickelten allerdings nur 30% der transplantierten BALB/c Empfängertiere einen Tumor. Weitere Transplantationen in nicht induzierte, transgene WAP-T Empfängertiere initiierten aber Tumore mit einer 100%-igen Erfolgsquote. Diese Beobachtung weist auf eine gegen die transplantierten Tumorzellen gerichtete Immunantwort der BALB/c Empfängertiere hin und war nicht erwartet worden, weil sich BALB/c und WAP-T Tiere genetisch nur durch das Transgen, d.h. die SV40 frühe Region unter Kontrolle des 1,6 Kb Fragments des WAP-Promotors unterscheiden. Zerrahn et al. und andere zeigten, dass in Mäusen mit BALB/c Hintergrund das SV40-LT keine Immunantwort auslöst, wenn SV40-transformierte BALB/c Nierensarkom mKSA-Zellen ohne Vorimmunisierung der Tiere transplantiert werden. (Zerrahn, Utermohlen et al. 1996; Lowe, Shearer et al. 2010; Lowe, Shearer et al. 2010). Allerdings kam es zu einer erfolgreichen Abstoßung der injizierten mKSA-Tumorzellen nach vorheriger Behandlung der Empfängertiere mit rekombinanten SV40-LT-Proteinen. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass BALB/c Tiere in der Lage sind eine effektive Immunantwort gegen das SV40-LT zu entwickeln, allerdings nur wenn deren Immunsystem ausreichend lange vorher mit dem Antigen in Kontakt war. Ergänzend zeigten Lewis et al., dass transplantierte 4T1 BALB/c Mammakarzinom-Zellen, die mit SV40-LT als Transgen versehen wurden (4T1.sTA-Zellen), erfolgreich abgestoßen werden, wenn die syngenem Empfängertiere mit SV40-LT vorimmunisiert werden (Lewis, Shearer et al. 2005). Interessanterweise beobachteten die Autoren, dass dieselben Tiere dann auch in der Lage waren, eine effektive Immunantwort gegen die parentalen SV40-LT- negativen 4T1-Zellen zu entwickeln. Durch Transplantation von mKSA-Zellen in vorimmunisierte Empfängertiere konnte kein Schutz gegen parentalen 4T1-Zellen induziert werden. Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass während der ersten Immunantwort gegen 4T1.sTA-Zellen eine breitere Erkennung der syngenem Tumorzellen entwickelt wird, die später zu einem allgemeinen Schutz gegen 4T1-Zellen führt. Im Fall unserer Experimente sterben viele WAP-T Tumorzellen in Folge des Einzelungsverfahrens. Die dadurch entstehenden Zelltrümmer enthalten eine signifikante Menge an SV40-LT-Protein, das durch das Immunsystem der BALB/c Empfängertiere erkannt werden kann. Da transplantierte Tumorzellen

normalerweise mehr als zwei Wochen brauchen, um ein detektierbares Tumorwachstum zu induzieren, könnten diese „freien“ SV40-LT-Proteine eine entscheidende Rolle bei der Immunisierung von BALB/c Empfängertieren spielen. Die Anwendung des *lineage depletion*-Kits in den darauffolgenden Experimenten ermöglichte es, eine reinere, aber nicht trümmerfreie Primärtumorzellsuspension zu erhalten. Die Erfolgsquote der Transplantationen von lin⁻-Tumorzellen lag bei 40% in BALB/c Tieren und erneut 100% in WAP-T Tieren. Als Vergleich zu diesen Primärzelltransplantationen ist bekannt, dass die Tumorwachstumsquote in BALB/c Empfängertieren nach Injektion von 10⁶ G-2 Zellen, zwischen 60 und 70% liegt. Hierbei waren die transplantierten Zellsuspensionen nahezu trümmerfrei, was die Theorie einer Erkennung von „freiem“ SV40-LT durch das Immunsystem von transplantierten BALB/c Tieren unterstützt. Bei der Ansiedlung von Tumorzellen in BALB/c Empfängertieren ist anzunehmen, dass ein Wettkampf zwischen Immunantwort und Tumorwachstum stattfindet. Aus den Transplantationen in WAP-T Empfängertieren war ersichtlich, dass Primärtumorzellen eine längere Latenz zwischen Injektion und Tumorwachstum als G-2 Zellen bei selben Zellzahlen aufweisen. Bei den Transplantationen in BALB/c Empfängertieren steht diese verlängerte Latenzzeit zu Gunsten der Entwicklung einer Immunantwort und ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass nur 30% der mit primär WAP-T Tumorzellen transplantierten BALB/c Tiere Tumore entwickelten während G-2 Zellen bei selben Zellzahlen eine 60 bis 70% Erfolgsquote aufweisen.

Als Konsequenz dieser Beobachtungen wurden alle darauffolgenden Transplantationen in WAP-T-NP8 Empfängertieren durchgeführt. Das etablierte Transplantationsverfahren in syngenem Empfängertiere sollte es ermöglichen, verschiedene für CSC beschriebene Charakteristika in Primärtumorzellen zu untersuchen. So wurde als nächster Schritt in der vorliegenden Arbeit die Anzahl von Zellen mit tumorinitiierenden Eigenschaften in WAP-T Tumoren untersucht.

V.1.4 Anteil der tumorinitiierende Zellen in WAP-T Mammakarzinomen

Zur Bestimmung der Anzahl von TICs in endogenen WAP-T Mammakarzinome wurden sechs WAP-T-NP8 Primärtumore (zwei differenzierte und vier undifferenzierte) dissoziiert, einer *lineage depletion* unterzogen und als serielle Verdünnung in jeweils sechs Empfängertiere orthotopisch injiziert. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl von Zellen mit tumorinitiierenden Eigenschaften in WAP-T-NP8 Mammakarzinomen relativ hoch ist. Ohne Unterscheidung bezüglich Differenzierungsgrad entwickelten alle Tiere, die mit 10³ Tumorzellen transplantiert wurden, einen Tumor. Mit 100 injizierten Zellen wuchsen 75% der Zellen aus undifferenzierten Tumoren und nur 25% der Zellen aus differenzierten Tumoren. Drei von acht Empfängertieren, die mit nur jeweils 10 undifferenzierten Zellen transplantiert

wurden, entwickelten einen Tumor. Zusammenfassend konnte in diesem Experiment die Frequenz von tumorinitiierenden Zellen in WAP-T Mammakarzinomen auf ca. 1:100 in differenzierten und bis zu mehr als 1:10 in undifferenzierten Tumoren eingeschätzt werden. Solch eine hohe Frequenz von TICs in WAP-T Tumoren war unerwartet und steht in Kontrast zu den meisten Untersuchungen bei humanen und murinen Mammakarzinomen. In einer berühmten Veröffentlichung berichteten Al-Hajj et al., dass in humanem Brustkrebs ca. nur eine von zehntausend Zellen tumorinitiierende Eigenschaften besitzt, wenn man sie in immundefiziente, humanisierte Mäuse transplantiert (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Zahlreiche Autoren ergänzten diese Ergebnisse später durch eigene Untersuchungen. So schätzte die Gruppe von Bruchell die Häufigkeit von Brustkrebs-TICs, übereinstimmend mit den Beobachtungen von Al-Hajj et al, auf weniger als 1:5000 und konnte diese Zahl durch *in vitro* Kultivierung von Primärtumorzellen als Mammosphären nur auf bis zu 1:500 steigern (Grimshaw, Cooper et al. 2008). In einer Parallelstudie zeigten Ginestier et al., dass das Passagieren von primären humanen Brustkrebszellen durch serielle Xenotransplantationen zu eine Erhöhung der Frequenz von tumorinitiierenden Zellen auf bis zu 1:500 in den entstehenden Tumoren führt (Ginestier, Hur et al. 2007). Die Tumorigenität etablierter humaner Mammakarzinom-Zelllinien wurde ebenso in Xenograft-Transplantationsmodellen untersucht. Hierbei wurden je nach Linie sehr heterogene TIC-Frequenzen von nicht detektierbar bis zu über 1:500 beobachtet (Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2009). Dieser Vergleich macht deutlich, dass die WAP-T Mammakarzinome mit Frequenzen von 1:100 bis 1:10 erheblich mehr TICs aufweisen als bisher in humanen Läsionen beobachtet wurde. Eine plausible Erklärung für die beobachtete geringere Häufigkeit von tumorinitiierenden Tumorzellen in humanem Brustkrebs liegt in der Detektionsmethode. In kritischen Reviews diskutieren z.B. Adams und Strasser die Wachstumsnachteile humaner Tumorzellen nach Transplantation in immundefiziente Mäusen (Adams and Strasser 2008; Visvader and Lindeman 2008). Durch die Inkompatibilität von humanen Tumorzellrezeptoren mit murinen Liganden können beispielweise überlebens- bzw. proliferationswichtige Signalwege nicht aufrechterhalten werden und die Besiedlung der Tumorzellen wäre folglich erheblich eingeschränkt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit unterscheiden sich daher Xenotransplantationen von Transplantationen in syngene Empfängertiere bezüglich ihrer Effizienz. Unterstützend dazu kann die Effizienz der Xenotransplantation von humanen Tumorzellen durch Co-Transplantation mit normalen humanen Fibroblasten, die eine Quelle für kompatible Wachstumsfaktoren darstellen, erhöht werden (Proia and Kuperwasser 2006). Weitere Daten zur Unterstützung dieser Theorie lieferten Ergebnisse aus syngenem Transplantationsstudien verschiedener Leukämie-Mausmodelle, bei denen von einer TIC-Frequenz von über 1:10 berichtet wurde (Kelly, Dakic et al. 2007). Ähnliche Resultate zeigt auch der Vergleich von Arbeiten an gängigen

Mammakarzinom-Mausmodellen, bei denen die Häufigkeit der TICs in syngenem Transplantationsmodellen höher ist als in humanen Brustkrebs-Xenotransplantationen. Bei Modellen die auf der Mutation des Oberflächenrezeptors BRCA1 für die Induktion von Mammakarzinomen basieren, wie z.B. den $K14cre;Brca1^{F5-13/F5-13};p53^{F2-10/F2-10}$, weisen Primärtumore eine TIC-Frequenz von ca. 1:1000 nach Transplantation in syngene Mäusen auf (Pajic, Kersbergen et al. 2010). Zelllinien, die aus Tumoren des eng verwandten $Brca1^{\Delta11}p53^{+/-}$ Mammakarzinom-Mausmodells gewonnen wurden, zeigen leicht gesteigerte Frequenzen von 1:100 bis 1:1000 (Wright, Calcagno et al. 2008; Pajic, Kersbergen et al. 2010). Cho et al. untersuchten in einer umfangreichen Studie die TICs-Häufigkeit in MMTV-Wnt1 Mammakarzinomen und beschrieben eine Frequenz von ca. 1:2000. Ähnlich wurde die Anzahl von Zellen mit tumorinitiierenden Eigenschaften auf 1:1000 in MMTV-neu Tumore bestimmt (Liu, Deng et al. 2007). Mammakarzinome des $p53^{null}$ Modells weisen eine TIC-Frequenz von 1:2500 bis 1:5000 auf (Zhang, Behbod et al. 2008). Zusammenfassend zeigen die verschiedenen Mammakarzinom-Mausmodelle eine höhere Frequenz von tumorinitiierenden Zellen als humane Läsionen, wobei diese Unterschiede wegen den Limitationen der Xenotransplantation vorsichtig interpretiert werden sollten. Interessanterweise zeigen alle Untersuchungen über die TIC-Frequenzen in Mammakarzinom-Mausmodellen Verhältnisse zwischen 1:5000 bis 1:1000. In der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich WAP-T Tumore von Tumoren anderer Modelle durch eine zehn- bis hundertfach höhere TIC-Frequenz. Einige Arbeiten über die SV40-vermittelte Transformation zeigen, dass die Expression von SV40-st und -LT unter bestimmten Umständen die vollständige Differenzierung von Linsen-, Muskeln- und Adipozyten-Vorläuferzellen verhindern kann (Mahon, Chepelinsky et al. 1987; Cherington, Brown et al. 1988; Higuchi, Fockler et al. 1993; Higgins, Chatterjee et al. 1996; Higgins and Cherington 2001; Chen, Liang et al. 2004). Auch in Epithelzellen der Brustdrüse konnte ein inhibitorischer Einfluss von SV40-st auf die terminale Differenzierung während der Laktation gezeigt werden (Goetz, Tzeng et al. 2001). Angesichts dieser Berichte ist es also durchaus denkbar, dass die Expression der SV40 „frühen“ Genregion als Onkogen in den WAP-T Mäusen für eine Anreicherung von Mammaepithelzellen mit Vorläufereigenschaften verantwortlich ist. Somit kann zumindest partiell erklärt werden, warum die in diesem Modell entstehenden Mammakarzinome eine TIC-Frequenz aufweisen, die über dem Durchschnitt liegt.

Anschließend an die Transplantationsexperimente wurden histologische Analysen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass transplantierte WAP-T Tumore überwiegend die Morphologie des Primärtumors widerspiegeln. Zusammen mit den zuvor beschriebenen Erkenntnissen zeigen WAP-T Mammakarzinome viele beschriebene Charakteristika, die auf die Anwesenheit von Tumorstammzellen hindeuten, wie die intrinsische molekulare Heterogenität und Zellpopulationen mit tumorinitiierenden Eigenschaften, die

nach Transplantation Läsionen verursachen, die dem Ursprungstumor morphologisch ähneln (Dalerba, Cho et al. 2007; Visvader and Lindeman 2008).

Basierend auf Kombinationen von Oberflächenmarker und/oder funktionelle Marker werden verschiedene Phänotypen für Brustkrebs-TICs in der Literatur beschrieben. Als nächster Schritt dieser Arbeit bot sich also an, den Phänotyp der tumorinitiierenden Zellen in den WAP-T Tumoren zu identifizieren.

V.1.5 Oberflächenmarker und Vorläufereigenschaften in WAP-T Tumore

In den zahlreichen zuvor erwähnten Studien, die sich mit Tumorstammzellen im Brustkrebs beschäftigen, wurden spezifische Kombinationen von Oberflächenmarkern beschrieben, die eine Anreicherung von TICs ermöglichen. So berichteten Al-Hajj et al, dass im humanen Brustkrebs eine starke Anreicherung von TICs durch Isolierung der $\text{Lin}^-/\text{CD24}^{\text{low}}/\text{CD44}^+$ -Tumorzellpopulation möglich ist (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Die Transplantation von nur 100 $\text{Lin}^-/\text{CD24}^{\text{low}}/\text{CD44}^+$ -Zellen war ausreichend um Tumore in immundefizienten Mäusen zu initiieren. Kombiniert mit der Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (Aldh) sind sogar 20 humane $\text{Lin}^-/\text{CD24}^{\text{low}}/\text{CD44}^+/\text{ALDH}^{\text{br}}$ -Brustkrebszellen ausreichend um Läsionen zu verursachen (Ginestier, Hur et al. 2007). Ergänzend konnten andere Autoren durch Anwendung von CD44, CD49f und CD133 mit 50 $\text{Lin}^-/\text{CD44}^+/\text{CD49f}^{\text{high}}/\text{CD133}^{\text{high}}$ -Zellen Tumore initiieren (Meyer, Fleming et al. 2010). Im Kontext von Mausmammarkarzinomen wurden Markerkombinationen beschrieben, die sich von denen des humanen Brustkrebses unterscheiden. Bis jetzt wurden verschiedene Phänotypen für murine Mammarkarzinom-TICs beschrieben. $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD49f}^+$ -Tumorzellen des $\text{K14cre};\text{Brca1}^{\text{F5-13/F5-13}};\text{p53}^{\text{F2-10/F2-10}}$ Mausmodells besitzen tumorinitiierende Eigenschaften (Pajic, Kersbergen et al. 2010). Im eng verwandten $\text{Brca1}^{\text{Co/Co}};\text{p53}^{\text{+/-}};\text{MMTV-Cre}$ Modell sowie in P53^{null} - und MMTV-Wnt1 Mäusen weisen tumorigene Zellen den $\text{Lin}^-/\text{CD24}^{\text{high}}/\text{CD29}^{\text{high}}$ -Phänotyp auf (Shackleton, Vaillant et al. 2006; Vassilopoulos, Wang et al. 2008). Interessanterweise wurden TICs des MMTV-Wnt1 MaCa in einer parallelen Studie als $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD49f}^+/\text{Thy1}^+$ identifiziert (Cho, Wang et al. 2008). Eine zusätzliche Ebene der Komplexität brachte die Beobachtung von Vaillant et al., in der MMTV-Wnt1 TICs als $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD61}^+$ -Zellen beschrieben wurden (Vaillant, Asselin-Labat et al. 2008). Angesicht dieser drei Studien liegt die Annahme nah, dass die für MMTV-Wnt1 Tumore beschriebenen tumorinitiierenden Zellen ein und dieselbe Population darstellen, die einen $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD29}^+/\text{CD49f}^+/\text{CD61}^+/\text{Thy1}^+$ -Phänotyp aufweist. Ein weiterer für tumorinitiierende Zellen beschriebener Phänotyp wurde von Grange et al beschrieben. Hierbei identifizierten die Autoren in BALB/c-neuT Mammarkarzinomen eine Sca1^+ -Zellpopulation mit erhöhter Tumorigenität (Grange, Lanzardo et al. 2008). Zusammenfassend

wurden in murinen Mammakarzinomen mindestens vier verschiedene Hauptphänotypen für TICs beschrieben: $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD49f}^+$, $\text{Lin}^-/\text{CD24}^{\text{high}}/\text{CD29}^{\text{high}}$, $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD61}^+$ und $\text{Lin}^-/\text{Sca1}^+$.

Um die WAP-T Mammakarzinome mit den publizierten Daten zu vergleichen, wurden Tumore mithilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen auf Kryoschnitten und FACS-Analysen von dissoziierten Primärzellen für die Expression der Oberflächenmarker CD24, CD29, CD49f, CD61 und Sca1 charakterisiert.

Unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad exprimieren über 95% der WAP-T Tumorzellen den Oberflächenmarker CD24. Wenn CD24 negative Stromazellen, die durch *lineage depletion* nicht entfernt wurden, berücksichtigt werden, kann man davon ausgehen, dass alle WAP-T Tumorzellen CD24 positiv sind. Wie im Abschnitt V.1.1 bereits diskutiert, ist die Expression des Transgens durch die Aktivität des WAP-Promotors auf Epithelzellen beschränkt. Da die Expression von CD24 in der normalen murinen Brustdrüse spezifisch für Epithelzellen ist (CD24^{low} für myoepitheliale/basale Zellen und CD24^{high} für luminale Zellen), reflektiert die starke Positivität der WAP-T Tumorzellen für CD24 das Set-up des Mausmodells (Thiery and Sleeman 2006). Angesichts dieses Ergebnisses kann im WAP-T MaCa davon ausgegangen werden, dass die in der Literatur beschriebenen Markerkombinationen $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD29}^+$, $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD49f}^+$ und $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD61}^+$ jeweils auf die Expression der einzelnen Integrine, CD29, CD49f und CD61, eingeschränkt werden können.

In FACS-Analysen wurden CD29, CD49f, CD61 und Sca1 auf einer variablen aber relativ hohen Zellzahl in WAP-T Tumoren detektiert. Undifferenzierte Tumore weisen ca. 80% CD29 positive Zellen, ca. 60% CD49f positive Zellen, ca. 40% CD61 positive Zellen und ca. 40% Sca1 positive Zellen auf. Differenzierte Tumore weisen hingegen eine etwas geringere Expression dieser Marker mit ca. 70% CD29 positive Zellen, ca. 50% CD49f positive Zellen, ca. 30% CD61 positive Zellen und ca. 10% Sca1 positive Zellen auf. Diese relativ hohen Zahlen korrelieren gut mit der hohen TIC-Frequenz in WAP-T Tumoren. Die stärker ausgeprägten tumorinitiierenden Eigenschaften von undifferenzierten WAP-T Tumorzellen im Vergleich zu differenzierten Tumorzellen korreliert mit einer etwas höheren Expression dieser Marker.

V.1.6 Oberflächenmarker und Vorläufereigenschaften von G-2 Zellen

Da alle untersuchten Marker in WAP-T Tumoren vorhanden und potentiell relevant sind, erfordert die Identifizierung und Charakterisierung potentieller Tumorstammzellen in endogenen Tumoren eine Untersuchung der tumorinitiierenden Eigenschaften jeder einzelnen $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD49f}^-$, $\text{Lin}^-/\text{CD24}^{\text{high}}/\text{CD29}^{\text{high}}$ -, $\text{Lin}^-/\text{CD24}^+/\text{CD61}^-$ und $\text{Lin}^-/\text{Sca1}^-$ Tumorzellpopulation, sowie von deren Pendanten anhand von Transplantationsexperimenten. Um diese sehr aufwendigen und zeitintensiven

in vivo Untersuchungen zu vermeiden, wurde als Nächstes die Relevanz der potentiellen CSC-Markerkombinationen in G-2 Zellen *in vitro* analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass G-2 Zellen in der Kultur in Analogie zu Primärzellen der Tumore alle untersuchten Marker exprimieren und zwei Hauptpopulationen aufweisen: eine CD24⁺/CD49f⁺-Population, die die CD61⁺-Zellen beinhaltet, und eine CD24⁻/CD49f⁻-Population, die die Sca1⁺-Zellen beinhaltet. Alle G-2 Zellen exprimieren CD29. In G-2 Zellkultur überlappen also die CD24⁺/CD49f⁻, CD24⁺/CD29⁻ und CD24⁺/CD61⁺-Zellpopulationen, die laut Literatur mit Tumorstammzellen angereichert sind (Shackleton, Vaillant et al. 2006; Vaillant, Asselin-Labat et al. 2008; Vassilopoulos, Wang et al. 2008; Pajic, Kersbergen et al. 2010). Auf der andere Seite weist die CD24⁻/CD49f⁻-Population der G-2 Zelllinie einen signifikanten Anteil von Sca1⁺-Zellen auf, die ebenso mit einem CSC assoziierten Phänotyp assoziiert wurden (Grange, Lanzardo et al. 2008).

Der CSC-Theorie nach induzieren Tumorstammzellen die zelluläre Heterogenität eines Tumorgewebes bzw. einer Tumorzelllinie in Kultur durch irreversible, epigenetisch getriebene Differenzierungsprozesse, die nicht-tumorigene, differenzierte Tochterzellen produzieren (Al-Hajj, Becker et al. 2004). Da die G-2 Zelllinie anhand der Marker CD24 und CD49f zwei distinkte Subpopulationen aufweist, lag die Annahme nahe, dass entsprechend der Tumorstammzelltheorie nur eine der beiden Subpopulationen Tumorzellen mit Vorläufereigenschaften enthält. Um dies zu bestätigen, wurden durch Repopulationsexperimente die CSC-Eigenschaften, d.h. die Selbsterneuerungs-, Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der beiden G-2 Subpopulationen gegenübergestellt. Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass sowohl isolierte CD24⁺/CD49f⁺- als auch CD24⁻/CD49f⁻-Zellen in der Lage sind, zu proliferieren und die ursprüngliche Heterogenität der G-2 Zellen wiederherzustellen; so wurden schon nach wenigen Tagen die entsprechenden Pendanten regeneriert. Mithilfe von Expressionsanalysen wurde außerdem gezeigt, dass CD24⁺/CD49f⁺-Zellen einen ausgeprägten epithelialen Charakter aufweisen, während CD24⁻/CD49f⁻-Zellen einen mehr mesenchymalen Phänotyp haben. Diese beiden entscheidenden Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass G-2 Zellen in der Lage sind, bidirektionale Transitionen zwischen epithelialen und mesenchymalen Phänotypen durchzuführen (Wegwitz, Kluth et al. 2010). In der Literatur werden diese Prozesse als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bzw. mesenchymale-epitheliale Transition (MET) bezeichnet.

Während der Embryogenese stellen EMT und MET überaus wichtige und streng regulierte Prozesse dar (Acloque, Adams et al. 2009; Kalluri 2009; Kalluri and Weinberg 2009). Beispielsweise wird der Aufbau von Endoderm und Mesoderm durch eine EMT in Zellen des Ektoderms ermöglicht, gefolgt von einer Migration und ggf. einer Rückkehr zum epithelialen Phänotyp durch MET (Micalizzi, Farabaugh et al. 2010). Die EMT ermöglicht Epithelzellen die Flexibilität zwischen verschiedenen Phänotypen zu

konvertieren, die während der Entwicklung für eine korrekte Organmorphogenese benötigt wird. (Duncan, Andrew et al. 1999). Im Kontext der Brustdrüse werden EMT-Vorgänge in verschiedenen Stadien der Entwicklung durchgeführt. So ist die Verzweigung und Elongation des Duktennetzes während der Pubertät und der Schwangerschaft mit einer sogenannten epithelialen Plastizität, die EMT- und MET-Prozesse erfordert, assoziiert (Sternlicht 2006; Micalizzi, Farabaugh et al. 2010). Der Verlauf eines EMT-Prozess beginnt mit dem Verlust der apikal-basalen Polarität von Epithelzellen durch den Abbau von *tight junctions*, gefolgt von der Degradation der Basalmembran und das Ersetzen von Adhäsionsmoleküle wie z.B. E-Cadherin oder spezifischen Integrinen durch andere Oberflächenproteine mit reduzierten Adhäsionseigenschaften wie z.B. N-Cadherin (Kalluri and Weinberg 2009). Das Zytoskelett erfährt ebenso einen kompletten Umbau, bei dem Aktinfasern durch *stress fibers* (Aktin-Myosin-Polymere) und Cytokeratine- durch Vimentin-Filamente ersetzt werden. Diese dramatischen Veränderungen führen zur Remodellierung der pflastersteinartigen zu einer mehr spindelartigen Morphologie und dem Erwerb von Motilität (Abbildung 47).

Bei Tumoren wird EMT grundsätzlich mit einer schlechteren Prognose, Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und einer verstärkten Metastasierung assoziiert. Die Transition von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp ist der Mechanismus, der es Zellen eines Primärtumors ermöglicht, das sie umgebene Gewebe zu invadieren, ferne Organe zu erreichen und zu besiedeln. Durch anschließende MET-Prozesse erwerben diese disseminierte Tumorzellen wieder den epithelialen Phänotyp, um Metastasen zu bilden (Thiery 2002; Cardiff 2010). Zusätzlich verknüpft eine steigende Anzahl von Publikationen den EMT-Prozess mit dem Erwerb von Stammzeleigenschaften (Ansieau, Bastid et al. 2008; Kurrey, Jalgaonkar et al. 2009; Wellner, Schubert et al. 2009; Martin and Cano 2010).

In der G-2 Zellkultur scheinen Prozesse der EMT und MET für deren zelluläre Heterogenität mitverantwortlich zu sein. Weiterhin sind diese Prozesse dafür verantwortlich, dass in G-2 Zellen kein eindeutiger Phänotyp einer Tumorstammzelle definiert werden konnte, da sowohl Zellen mit ausgeprägtem mesenchymalem Phänotyp als auch Zellen mit epithelialen Merkmalen die ursprüngliche Heterogenität der G-2 Zellkultur wiederherstellen können, wenn sie einzeln kultiviert werden. So weisen beide Subpopulationen mit mesenchymalem und epithelialem Phänotyp die in der CSC-Theorie beschriebenen Eigenschaften einer Tumorstammzelle, d.h. Proliferation-, Selbsterneuerung- und Differenzierungspotential, auf.

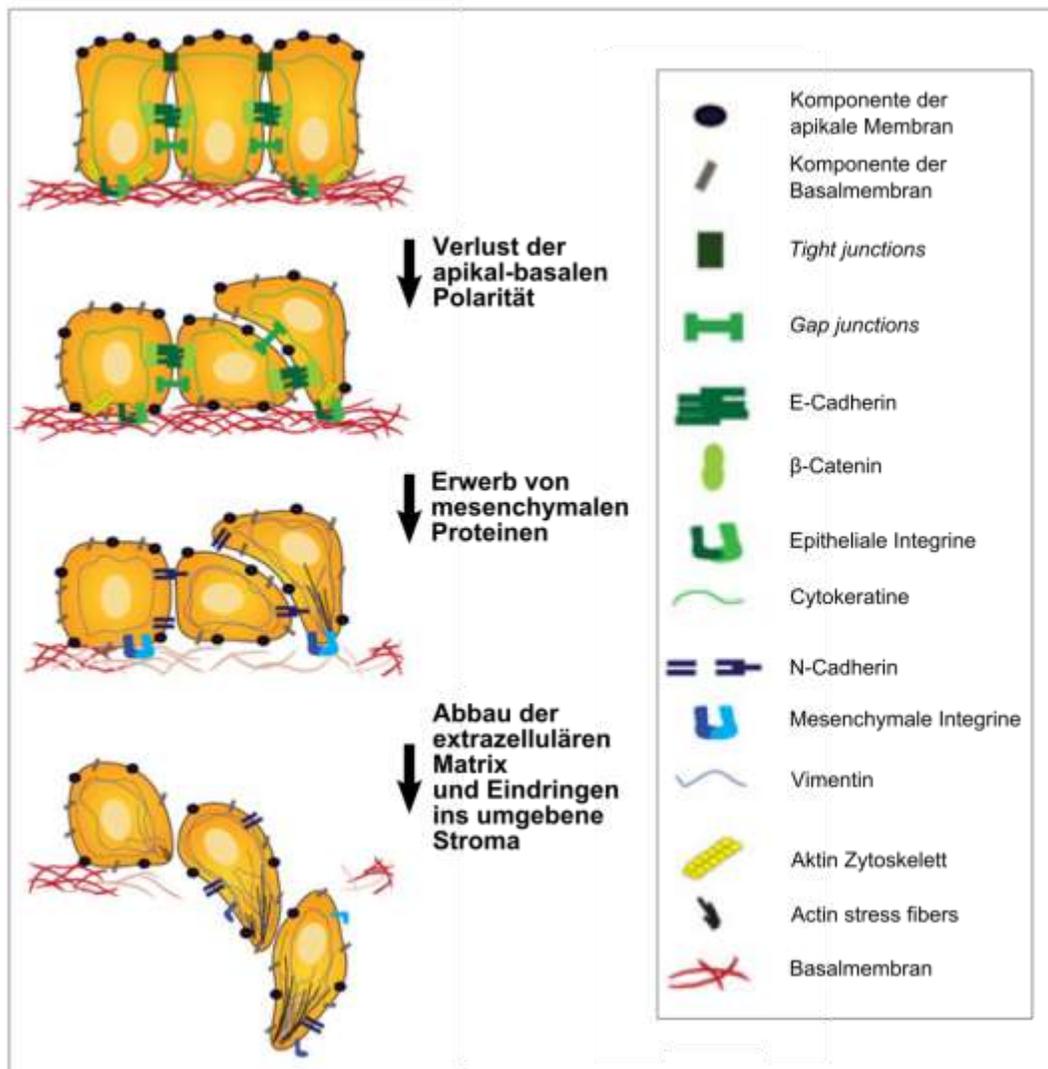


Abbildung 47: EMT und epitheliale Plastizität

Während einer EMT verlieren Epithelzellen ihre apikal-basale Polarität. *Tight Junctions*, die typischerweise für das Erhalten der apikal-basalen Polarität verantwortlich sind, werden langsam abgebaut. Dies führt zu einer Mischung apikaler und basallateraler Membranproteine. Adhäsionskomplexe und *gap junctions* werden ebenfalls abgebaut. Dann werden epithelspezifische (grün) Integrine durch Integrine spezifisch für die extrazelluläre Matrix (blau) und E-Cadherin durch N-Cadherin ersetzt. Eine Remodelierung des Aktin-Zytoskeletts findet statt, wobei *stress fibers* an der Stelle des Zellvorsprungs akkumulieren. Die Cytokeratin-Intermediärfilamente werden durch Vimentin ersetzt. Anschließend wird die Basalmembran an der Invasionsstelle verdaut, was das Eindringen der Zelle im umgebenen Stroma ermöglicht (Micalizzi, Farabaugh et al. 2010).

V.1.7 Aldh-Aktivität und CSC-Eigenschaften in WAP-T Tumoren und G-2 Zellen

Die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (Aldh) bietet eine auf funktionellen zellulären Eigenschaften basierende Alternative für die Isolierung von Stamm- und Tumorstammzellen. Für den humanen Brustkrebs wird die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase 1 als Marker für Tumorzellen mit Vorläufereigenschaften, erhöhter Metastasierungsrate und schlechter Überlebensprognose beschrieben

(Ginestier, Hur et al. 2007; Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2010). Ähnlich wie in primären humanen Tumoren wurde die Aldh-Aktivität in humanen MaCa-Zelllinien ebenfalls erfolgreich als Marker für die Anreicherung von TICs angewendet (Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2009; Ginestier, Wicinski et al. 2009). Um das vorliegende Mausmodell mit der humanen Situation vergleichen zu können, wurden zuerst primäre undifferenzierte WAP-T Tumore (n=3) mithilfe des Aldefluor®-Kits gefärbt und durch durchflusszytometrische Verfahren analysiert. So konnte eine zwischen 6,4% und 14,1% umfassende Aldh^{br}-Tumorzellpopulation beobachtet werden. *Lineage*-negative Aldh^{low}- und Aldh^{br}-Tumorzellen wurden jeweils transplantiert und Expressionsanalysen unterzogen. RT-qPCRs für verschiedene Aldehyd-Dehydrogenase zeigten, dass Aldh^{br}-Tumorzellen die Aldh1a2 und Aldh1l1 mehr als zweifach stärker als Aldh^{low}-Zellen exprimieren. Dies lässt vermuten, dass diese beiden Isotypen für den Aldh^{br}-Phänotyp in den WAP-T Mammakarzinomen verantwortlich sind. Interessanterweise konnte durch Transplantation von Aldh^{br}-Tumorzellen keine signifikante Anreicherung von TICs gegenüber Aldh^{low}-Zellen beobachtet werden.

Dissoziation und Durchflusszytometrie sind zwei Verfahren, die Primärtumorzellen schädigen und somit einen signifikanten Einfluss auf die Detektion von Tumorstammzellen haben können. Um auszuschließen, dass diese Problematik das Ergebnis des Aldh-Assays beeinflusst hatte, wurden G-2 Zellen denselben Analysen unterzogen. G-2 Zellen weisen eine hervorragende Vitalität nach Dissoziation und FACS auf. Anders als in Primärtumoren zeigen G-2 Zellen eine zwischen 30% und 35% aller Zellen umfassende Alde^{br}-Population, die eine stärkere Aldh1a3-Expression als in der Aldh^{low}-Population aufweist. *In vivo* initiieren Alde^{br}-G-2 Zellen etwas schneller Tumore als Alde^{low}-Zellen, allerdings konnten beide Populationen sowohl mit 10⁴ als auch 10² transplantierten Zellen Tumore induzieren. In parallelen *in vitro* Repopulationsanalysen konnten ebenso Alde^{br} sowie Alde^{low} G-2 Zellen proliferieren und die ursprüngliche Heterogenität der G-2 Zell wiederherstellen. Bereits wenige Tage nach FACS-Sortierung wurden die entsprechenden Pendanten erneut regeneriert.

Zusammenfassend machen die *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen der G-2 Zellen bezüglich Aldh-Aktivität deutlich, dass sowohl die Alde^{br} wie auch die Alde^{low} Zellpopulationen Proliferation-, Selbsterneuerung- und Differenzierungspotential aufweisen, also Eigenschaften, die als CSC-Eigenschaften beschrieben sind. Die parallel analysierten endogene WAP-T Tumoren zeigten anhand von *in vivo* Transplantationsexperimente, dass sowohl Aldh^{br} als auch Aldh^{low} Primärtumorzellen tumorigen sind und somit den Eigenschaften der G-2 Zelllinie ähneln.

V.1.8 Konzepte der Tumorstammzellmetastabilität und des „Tumorzellsystems“

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Oberflächenmarkern und des funktionellen Markers Aldh-Aktivität für die Isolierung von Tumorstammzellen zeigten in beiden Fällen, dass G-2 Zellen zwischen den in der Literatur für CSC-Eigenschaften beschriebenen Phänotypen ($CD24^+/CD49f^+$ bzw. $Aldh^{Br}$) und deren Pendanten ($CD24^-/CD49f^-$ bzw. $Aldh^{low}$) schwanken können. So können G-2 Tumorstammzellen nicht als einzelne Entität mit festem Phänotyp definiert werden sondern eher als heterogenes homöostatisches „Tumorzellsystem“ (*cancer cell system, CCS*), dessen Zusammensetzung durch Zell-Zell-Kontakte und humorale Signale reguliert wird. Die Fähigkeit der G-2 Zellen, epitheliale und mesenchymale Differenzierungsstadien aufzuweisen und ggf. die Komplementärfraktion regenerieren zu können ist mit dem von Ford und Thompson vorgeschlagenen Konzept der epithelial-mesenchymalen Plastizität (EMP) kompatibel, auch wenn in dem vorliegenden Fall nur eine partielle EMT stattfindet. Somit eignet sich der Begriff der Metastabilität, der von uns und ebenso von Micalizzi et al definiert wurde, bedeutend besser für die Beschreibung des G-2 Zellsystems (Micalizzi, Farabaugh et al. 2010). Das Konzept der Metastabilität von Tumorzellen und von Tumorzellsystemen bietet eine Alternative zur Weiterentwicklung des klassischen CSC-Konzeptes, in dem Tumorstammzellen nicht mehr einen einzigen spezifischen Phänotyp aufweisen, wie es Dalerba und Clarke postuliert haben, sondern als Zellen, die eine Reihe von Phänotypen annehmen können, definiert werden (Dalerba, Cho et al. 2007). Durch Analysen eines weiteren Markers, des Thy1-Oberflächenproteins, konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass das G-2 CCS mindestens drei verschiedenen metastabilen Differenzierungsstadien aufweist: der $CD24^+/Sca1^{low/-}/Thy1^-$ „quasi-epitheliale“ Phänotyp, der $CD24^{low/-}/Sca1^{high}/Thy1^-$ „intermediäre“ Phänotyp und der $CD24^{low/-}/Sca1^{high}/Thy1^{high}$ „quasi-mesenchymale“ Phänotyp (Wegwitz, Kluth et al. 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Balance zwischen den verschiedenen Differenzierungsstadien durch Modulation der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden kann. Die *in vitro* Depletion des Transkriptionsfaktors Sox10 durch shRNA-vermittelte Reduktion resultierte beispielsweise in der Hochregulation des Transkriptionsfaktors Twist2, der von Ansieau et al mit dem Prozess der EMT assoziiert wurde (Ansieau, Bastid et al. 2008). Als Konsequenz der Depletion verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den Differenzierungsstadien der G-2 Zellen zu Gunsten der $CD24^{low/-}/Sca1^{high}/Thy1^{high}$ -Zellpopulation und somit des „quasi-mesenchymalen“ Phänotyps (Wegwitz, Kluth et al. 2010). Abbildung 48 gibt eine schematische Darstellung des G-2 Tumorzellsystems.

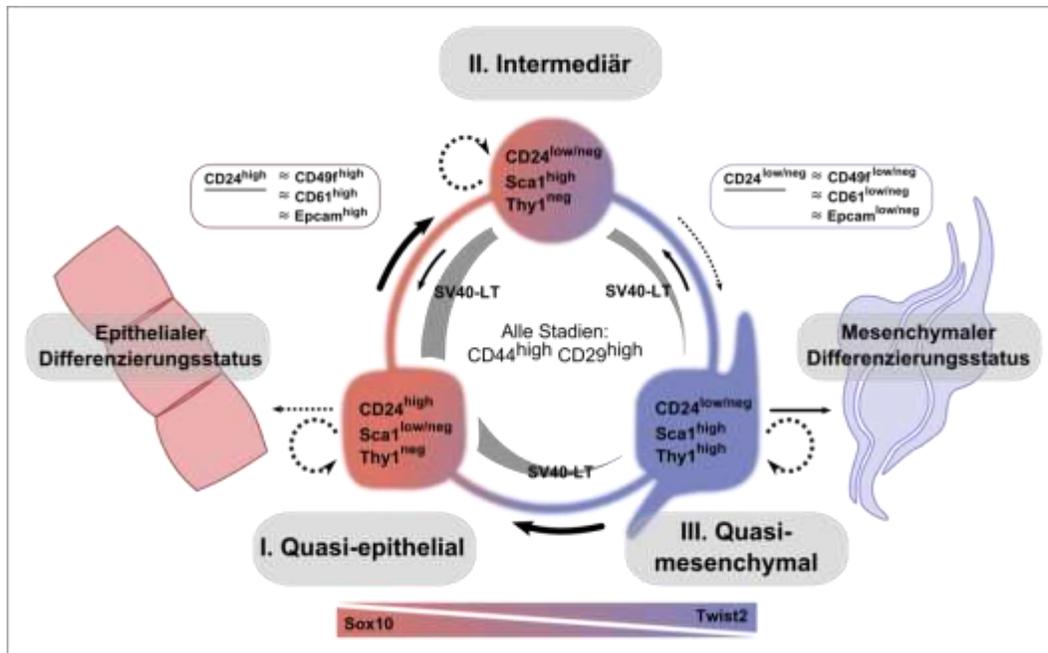


Abbildung 48: Schematische Darstellung des G-2 Tumorzellsystems

Das G-2 Tumorzellsystem (*cancer cell system, CCS*) besteht aus mindestens drei unterschiedlichen Differenzierungsstadien, die durch spezifische Markerkombinationen definiert werden: (i) der „quasi-epitheliale“ Phänotyp zeichnet sich durch die Expression epithelialer Marker (wie z.B. CD24, CD49f, CD61 und EpCAM) und die Abwesenheit von Sca1 und Thy1 aus; (ii) der „intermediäre“ Phänotyp weist eine geringe bis vernachlässigbare Menge epithelialer Marker, keine Thy1- und eine starke Sca1-Expression auf; (iii) der „quasi-mesenchymale“ Phänotyp zeichnet sich durch die Abwesenheit epithelialer Marker und die starke Expression von Sca1 und Thy1 aus. Alle drei Phänotypen weisen eine starke Expression von CD44 und CD29 sowie eine variable Menge an SV40-LT auf, die mit dem Verlust des epithelialen Charakters abnimmt. Das komplette Ausschalten von SV40-LT durch den Verlust von epithelialen Transkriptionsfaktoren führt zu einer irreversiblen mesenchymalen Differenzierung. Eine irreversible epitheliale Differenzierung konnte bis jetzt nicht beobachtet aber auch nicht ausgeschlossen werden. Die Balance zwischen den verschiedenen Differenzierungsstadien der G-2 Zellen wird durch Transkriptionsfaktoren (z.B. Sox10 und Twist2), Zell-Zell-Kontakten und autokrinen/parakrinen Signalen gesteuert. Die kreisförmigen Pfeile stellen Selbsterneuerungseigenschaften dar. Die Dicke der Pfeile für Differenzierungsvorgänge stellt die Häufigkeit der auftretenden Transitionen dar (Wegwitz, Kluth et al. 2010).

In einer vor kurzem erschienenen Veröffentlichung berichtet die Gruppe um Vonderhaar, dass humane Brustkrebs-Zelllinien ähnlich wie das G-2 Zellsystem Metastabilität zeigen (Meyer, Fleming et al. 2010). Dabei zeigten die Autoren, dass CD44⁺/CD24^{low/-}-Zellen, die den von Al-Hajj et al als CSC-assoziierten Phänotyp aufweisen, und CD44⁺/CD24⁺-Zellen jeweils ein ausgeprägtes mesenchymales bzw. epitheliales Profil haben und dass beide Zellpopulationen fähig sind, deren Pendanten zu repopulieren, wenn sie nach Isolierung weiterkultiviert werden. In Xenotransplantationen zeigten beide Zellpopulationen ähnlichen tumorinitiierenden Eigenschaften. Diese Publikation beweist, dass das Konzept der Metastabilität von Tumorzellen sich nicht nur auf das WAP-T Mausmodell beschränkt, sondern dass diese Eigenschaften in der humanen Situation ebenso gültig und relevant sind.

Da G-2 Zellen aus einem WAP-T Tumor gewonnen wurde, liegt die Annahme nahe, dass die Zellen endogener WAP-T Mammakarzinome sich ebenfalls in einem metastabilen Zustand befinden. Hinweise dafür konnten durch Immunofluoreszenz-Färbungen geliefert werden, die zeigten, dass sowohl transplantierte G-2 Tumore als auch undifferenzierte endogene WAP-T Tumore Zellen beinhalten, die gleichzeitig epitheliale Keratine und mesenchymales Vimentin exprimieren. Unterstützt von Berichten anderer Autoren lässt sich dieses Phänomen so interpretieren, dass diese Zellen sich in einem Übergangszustand zwischen epithelialen und mesenchymalen Phänotyp befinden. (Vongwiwatana, Tasanarong et al. 2005; Kokkinos, Wafai et al. 2007; Tomaskovic-Crook, Thompson et al. 2009). Ergänzend beobachteten Morel et al, dass das Einfügen von SV40-LT und -st in immortalisierte humane CD44⁺/CD24⁺-Mammaepithelzellen zur Entstehung einer kleinen CD44⁺/CD24^{low/-}-Zellenpopulation führt und assoziierten dieses Phänomen mit EMT-Ereignissen (Ansieau, Bastid et al. 2008). Diese Ergebnisse sprechen daher für die Existenz eines EMT-Prozesses in den WAP-T Mammakarzinomzellen. Der Nachweis des tumoralen Ursprungs dieser Zellen gelang durch die gleichzeitige Detektion von SV40-LT und Vimentin in einzelnen Zellen transplantiertes G-2 und undifferenzierter endogene WAP-T Tumore. Interessanterweise konnten keine EMT-Ereignisse in differenzierten WAP-T Tumoren detektiert werden.

Der klassischen CSC-Theorie nach repräsentieren Tumorstammzellen nur einen kleinen Anteil der Läsion. Sie sind durch spezifische Markerexpression charakterisiert und vor allem verantwortlich für das Aufrechterhalten und die Aggressivität der Läsionen (Dalerba, Cho et al. 2007). Entsprechend wurde also postuliert, dass spezifisch gegen Tumorstammzellmerkmale gerichtete Therapien effizienter zu einem Rezidiv-freien Eliminieren der Krankheit führen als allgemein krebsspezifische Medikamente (Huff, Matsui et al. 2006). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Metastabilität von Tumorzellen hinsichtlich ihres Phänotyps bringt eine zusätzliche Ebene der Komplexität ein, da Tumorzellen mit Vorläufereigenschaften in einem System gleichzeitig verschiedene Charakteristika aufweisen können, ohne ihre Tumorigenität und somit ihr Potential, Rezidive zu verursachen, zu verlieren. In solchen Tumorzellsystemen wird es möglicherweise notwendig sein, Einfluss auf dem metastabilen Zustand der Tumorzellen auszuüben, um alle Tumorstammzellen der Läsion mit geeigneten Therapeutika behandeln zu können.

V.2 Die duale Rolle von CEACAM1 in WAP-T Tumoren

Wie zuvor erwähnt, ist es möglich, das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Differenzierungszuständen von G-2 Zellen *in vitro* durch Modulation von Sox10 zu beeinflussen. Dies bedeutet, dass es prinzipiell möglich sein muss, dieses Gleichgewicht auch in WAP-T Tumoren durch

veränderte Expression von Faktoren in Richtung eines verstärkten EMT-Phänotyps zu verändern. Um eine solche Modulation *in vivo* zu untersuchen, wurde in Kooperation mit der Gruppe von Herrn Prof. Wagener eine Abwandlung des WAP-T Mausmodells hergestellt, in dem der EMT-Zustand von Mammakarzinomzellen gegenüber den parental WAP-T Tumorzellen beeinflusst wurde. In Zellen, die eine EMT durchführen, kommt es zu einer Downregulation der Expression epithelspezifischer Adhäsionsmoleküle. Das bekannteste Beispiel im Falle des Brustkrebses ist der Verlust von E-Cadherin, einem Adhäsionsmolekül das an der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten und Zellpolaritäten in den Epithelien beteiligt ist (Abbildung 47). Verschiedene Studien zeigten zudem, dass der Verlust von E-Cadherin selbst zur Induktion einer EMT durch Re-Lokalisierung von β -Catenin, einem Signalmolekül des Wnt-Pathways, im Nukleus verursachen kann (Thiery 2002; Zheng, Lyons et al. 2009; Chao, Shepard et al. 2010). Der Wnt-Pathway ist ausführlich beschriebener Signaltransduktionsweg für die Regulation von EMT-Prozessen (Kalluri and Weinberg 2009). Wie E-Cadherin ist auch CEACAM1 ein Adhäsionsmolekül, das durch homophile Bindungen in Zell-Zell-Kontakten involviert ist und für eine Lokalisierung von β -Catenin an der Plasmamembran durch direkte Interaktion sorgt (Jin, Li et al. 2008). Zahlreiche Veröffentlichungen berichten über den Verlust von CEACAM1 während der Entwicklung verschiedener Karzinome (wie z.B. Kolonkarzinom, Leberkarzinom, Blasenkarzinom, Nierenkarzinom und Mammakarzinom). Dieser Verlust korreliert mit einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Invasivität der Erkrankung (Nollau, Prall et al. 1997; Nollau, Scheller et al. 1997; Riethdorf, Lisboa et al. 1997; Bamberger, Riethdorf et al. 1998; Oliveira-Ferrer, Tilki et al. 2004; Tilki, Irmak et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Auswirkung des Verlustes von CEACAM1 auf den EMT-Status sowie auf die Metastasierungseigenschaften des WAP-T Tumorzellsystems untersucht. Für diesen Zweck wurden in Kooperation mit der Gruppe von Herrn Prof. Wagener bi-transgene WAP-T-NP8 x Ceacam1^{-/-} Mäuse generiert.

V.2.1 Metastatische Eigenschaften von Ceacam1^{-/-}-Tumorzellen in dem WAP-T Mausmodell

Um die Veränderung des CEACAM1-Verlustes auf WAP-T Tumorzellen *in vivo* zu bestimmen, wurden induzierte WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x Ceacam1^{-/-} Mäuse hinsichtlich Tumorinzidenz und Metastasierungen in der Lunge untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass beide Mausmodelle ähnliche Eigenschaften bezüglich Latenz nach Induktion, Tumorinzidenz und Tumorwachstumskinetik aufweisen (Manuskript in Vorbereitung, Gerstel et al.). Interessanterweise wiesen 67% der Ceacam1^{-/-}-Tumormäuse Lungenmetastasen und somit eine erheblich höhere Metastasierungsrate als mono-transgene WAP-T Mäuse auf, bei denen in der vorliegenden Studie keine Metastasen gefunden wurden und die allgemein eine Inzidenz von ca. 6% aufweisen. Um sicherzustellen, dass der beobachtete Phänotyp auf den Verlust

von CEACAM1 in den Tumorzellen und nicht in deren Mikroumgebung zurückzuführen ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Transplantationsexperimente vorgenommen. Dabei konnte eine Lungenmetastase in Empfängertieren (n=6), die mit Ceacam1^{-/-}-Tumorzellen transplantiert wurden, entdeckt werden, während die Transplantation von Ceacam^{wt}-Tumorzellen (n=6) keine Metastase verursachte. Die Beobachtungen einer verstärkten Metastasierungsrate in endogenen und transplantierten Ceacam1^{-/-}-Tumoren stimmen mit den Veröffentlichungen überein, die über eine Korrelation zwischen dem Verlust von CEACAM1 auf Zellen verschiedener Karzinomtypen und einer erhöhten Invasivität berichten (Nollau, Prall et al. 1997; Nollau, Scheller et al. 1997; Riethdorf, Lisboa et al. 1997; Bamberger, Riethdorf et al. 1998; Oliveira-Ferrer, Tilki et al. 2004; Tilki, Irmak et al. 2006; Shinozuka, Uzawa et al. 2009). Zudem zeigt der Vergleich zwischen WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x Ceacam1^{-/-} Tumormäusen, dass der Verlust von CEACAM1 nicht nur eine Konsequenz in der Tumorprogression darstellt, sondern eine aktive Rolle im Metastasierungsprozess spielt. Somit wird die Annahme unterstützt, dass der Verlust von CEACAM1 zu einer Verschiebung des metastabilen Zustandes von Tumorzellen führt. Um dieses Postulat zu untermauern, wurden Expressionsarrays von WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x Ceacam1^{-/-} Tumoren analysiert. Übereinstimmend mit der starken Lungenmetastasierungsrate stellte es sich hierbei heraus, dass im Vergleich zu CEACAM1-positiven Tumoren die CEACAM1-negativen Mammakarzinome ein aggressiveres Expressionsprofil mit Merkmalen für erhöhte Invasions- und Metastasierungseigenschaften aufweisen. Von den bekannten Effektoren von EMT-Prozessen, die in Ceacam1^{-/-}-Mammakarzinomen hochreguliert waren, stellt die Hochregulation von *Fgf1* (*fibroblast growth factor 1*) einen durchaus interessanten Befund dar. Unter anderem wird in der Literatur berichtet, dass FGF1 die Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen wie MMP9 bewirken kann, was zum Abbau von extrazellulärer Matrix und somit erhöhter Motilität führt (Billottet, Tuefferd et al. 2008). Als Bestätigung wurde durch IHC-Färbungen eine massive Expression von MMP9 sowie der daraus resultierende Abbau des MMP9-Substrats Kollagen IV in Ceacam1^{-/-}, nicht aber in Ceacam^{wt}-Tumoren detektiert. Zusätzlich zu der Modulation von *Fgf1*, gehörte vor allem Clusterin (CLU) zu den am stärksten hoch regulierten Genen in WAP-T-NP8 x Ceacam1^{-/-} Tumoren. Clusterin, auch bekannt als Apolipoprotein J, ist ein Plasmaprotein, das im Kontext von Brustkrebs unter anderem mit Invasivität, migratorischen Eigenschaften, einer erhöhten Überlebensfähigkeit der Tumorzellen und Metastasierung assoziiert war (Redondo, Tellez et al. 2009). Weiterhin zeigte ein neuer Bericht von Lenferink et al., dass CLU als positiver Effektor der EMT unter Kontrolle des TGFβ-Signalwegs dient (Lenferink, Cantin et al. 2010). Andere berichteten, dass die Reduktion von CLU in Lungenkarzinomzellen zur Induktion des gegensätzlichen MET-Prozesses führt (Andarawewa, Erickson et al. 2007).

Die Lokalisierung des β -Catenin Moleküls, einen Haupteffektor des Wnt-Signalwegs, an der Plasmamembran von Zellen wurde mit dem epithelialen Phänotyp assoziiert. In Epithelzellen, die eine EMT durchführen, relokalisiert das β -Catenin in den Zellkernen bei gleichzeitigem Verlust des epithelialen Charakters und dem Gewinn mesenchymaler Merkmale (Kalluri and Weinberg 2009; Schmalhofer, Brabletz et al. 2009). Da beschrieben wurde, dass die intrazelluläre Domäne von CEACAM1 das β -Catenin binden und dessen Lokalisierung somit kontrollieren kann, lag die Annahme nah, dass der Verlust von CEACAM1 in WAP-T Tumorzellen eine Modulation des EMT-Status bewirkt (Leung, Turbide et al. 2008). Als Bestätigung wurden IHC-Färbungen für β -Catenin durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass β -Catenin in WAP-T-NP8 Tumoren an der Plasmamembran der Tumorzellen lokalisiert ist, während WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumorzellen eine Färbung im Nukleus aufweisen (Manuskript in Vorbereitung, Gerstel et al.). Die Lokalisierung von β -Catenin im Zellkern ist ein ausführlich beschriebenes Merkmal von EMT-Ereignissen und beweist somit, dass der Verlust von CEACAM1 eine Verstärkung der mesenchymalen Merkmale von WAP-T Tumoren bewirken kann (Cadigan and Peifer 2009).

Zusammen weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass der Verlust von CEACAM1 und die dadurch folgende Kernlokalisierung von β -Catenin sowie die verstärkte Expression von Clusterin, *Fgf1* und MMP9 zu erhöhten EMT-Ereignissen innerhalb des WAP-T Tumorzellsystems führt, was wiederum eine stärkere Metastasierungsrate der Tumorzellen verursacht.

Interessanterweise konnte in den Expressionsarrays keine Veränderung der Transkriptmenge von mesenchymalen Markern wie Vimentin oder epithelialen Markern wie Cytokeratine in den Expressionsprofilen von WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren detektiert werden. In weiteren RT-qPCR-Analysen und Immunofluoreszenz-Färbungen, konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen mono- und bi-transgenen Tumoren hinsichtlich dieser Marker beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte lediglich eine deutliche Abnahme von ZO-1 (*zonula occludens 1*), ein Bestandteil des *tight junction*-Proteinkomplexes, in Färbungen von Tumoren mit *Ceacam1*^{-/-}-Hintergrund gezeigt werden (Manuskript in Vorbereitung, Gerstel et al.). Der Verlust von ZO-1 korreliert mit dem Verlust des epithelialen Charakters und wurde im Kontext von EMT bereits häufig beschrieben (Thiery and Sleeman 2006; Andarawewa, Erickson et al. 2007). In neusten Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass der EMT-Prozess von humanen Mammaepithelzellen in drei Phasen unterteilt werden kann: die Induktionsphase, die Aufrechterhaltungsphase und die Dedifferenzierungsphase (Lindley and Briegel 2010). Dabei zeigten die Autoren, dass der Verlust von ZO-1 zu frühen Ereignissen der Induktionsphase gehört. Zusammen mit dem früher erwähnten Konzept einer partiellen EMT weisen diese Daten darauf

hin, dass der Verlust von CEACAM1 in WAP-T Tumorzellen eine nicht vollständige EMT verursacht, die aber ausreichend ist, um die Metastasierungseigenschaften von WAP-T Tumoren zu verstärken.

V.2.2 Einfluss des Verlustes von CEACAM1 auf die Tumorgefäßqualität

Angesichts der Metastasierungsrate der WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tiere (6 von 9 Tumortiere) mit endogenem Tumorwachstum korrelierte zwar die Metastasenanzahl der Transplantationsexperimenten von *Ceacam1*^{-/-}-Tumorzellen in *Ceacam1*^{WT}-Empfängertiere (1 von 6 Tumortiere), wies aber eine deutlich geringere Frequenz als erwartet auf. CEACAM1 ist als positiver Regulator der Neoangiogenese bekannt (Horst, Ito et al. 2006). Es ist also möglich, dass der Verlust von CEACAM1 in der Tumormikroumgebung endogener *Ceacam1*^{-/-}-Tumore auch dazu beiträgt, die Invasivität von Tumorzellen zu erhöhen. Um dieser Annahme nachzugehen wurden die Konsequenzen eines Verlustes von CEACAM1 in der Tumolvaskularisierung von WAP-T Mammakarzinomen in Betracht gezogen.

Blutgefäße von WAP-T Mammakarzinomen sind CEACAM1-negativ, während Gefäße der Tumorkapsel und Tumorumgebung positiv für CEACAM1 sind. Trotz Abwesenheit von CEACAM1 auf Tumorgefäße in WAP-T Mammakarzinomen führte die Depletion des *Ceacam1*-Gens zu einer allgemein schlechteren Qualität der Tumorblutgefäße. Anhand von NG2-Färbungen, ein Marker für Perizyten, konnte zuerst gezeigt werden, dass Blutgefäße von *Ceacam1*^{-/-} Tumoren sehr schlecht bzw. gar nicht von Perizyten bedeckt sind. Dies konnte in WAP-T Tumoren mit *Ceacam1*^{wt}-Hintergrund nicht beobachtet werden. Die Interaktion von Perizyten und Endothelzellen ist sehr wichtig für eine korrekte Reifung beider Zelltypen und die Abwesenheit einer Perizytenbedeckung wurde als Zeichen von schlechter Gefäßreifung beschrieben (Bergers and Song 2005). Huang et al. berichteten zudem, dass transplantierte Gehirntumore in NG2 negativen Empfängertiere ebenso wie in WAP-T-NP8 x *Ceacam1*^{-/-} Tumoren eine mangelhafte Perizytenbedeckung aufweisen. In diesem Modell war die Abwesenheit von Perizyten mit einer verstärkten Permeabilität der Tumorgefäße für FITC-Dextran und eine stark erhöhte Hypoxie innerhalb der Tumore assoziiert (Huang, You et al. 2010). In dem Fall von WAP-T Mammakarzinomen verursachte der Verlust von CEACAM1 auch eine signifikant erhöhte Permeabilität der Blutgefäße für FITC-Dextran.

Der Verlust von CEACAM1 resultiert in einer Verschlechterung der Qualität von WAP-T Tumorblutgefäßen, da eine korrekte Reifung der Endothelzellen verhindert wird. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen berichten, dass eine erhöhte Gefäßpermeabilität das Eindringen von Tumorzellen in der Blutbahn und somit die Metastasenbildung begünstigt (Fukumura and Jain 2007; Kumar, Ning et al. 2008). Übereinstimmend zeigten Xian et al., dass eine Verbesserung der Perizytenbedeckung von

Tumorblutgefäße eine Reduktion der Metastasierungsrate bewirkt (Xian, Hakansson et al. 2006). Es ist also anzunehmen, dass die Verschlechterung der Tumorgefäßqualität in WAP-T-NP8 x Ceacam1^{-/-} Tumoren einen Beitrag zur erhöhten Metastasierungsrate leistet.

Zusätzlich liefert der Bericht von Huang et al. im Zusammenhang mit EMT-Prozessen eine interessante Beobachtung. Hierbei zeigten Tumoren mit mangelhafter Perizytenbedeckung und verstärkter Gefäßpermeabilität eine gesteigerte Hypoxie (Huang, You et al. 2010). Nun ist es bekannt, dass Hypoxie EMT-Prozesse in Tumorzellen, u. A. Mammakarzinomzellen, induzieren können (Lundgren, Nordenskjold et al. 2009; Chen, Imanaka et al. 2010; Louie, Nik et al. 2010). Es ist also durchaus denkbar, dass der Verlust von CEACAM1 in der Tumormikroumgebung eine Verstärkung der EMT-Ereignisse in WAP-T Tumorzellen bewirken kann, indem durch verschlechterte der Tumorgefäßqualität eine Hypoxie verursacht wird.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CEACAM1 während der WAP-T Mammakarzinogenese eine duale Rolle bezüglich der Metastasierungseigenschaften der Tumorzellen bewirkt: (i) die Abwesenheit von CEACAM1 auf den Tumorzellen begünstigt EMT-Ereignisse und verschiebt somit deren metastabilen Zustand zugunsten einer erhöhten Invasivität; (ii) der Verlust von CEACAM1 in der Tumormikroumgebung verursacht eine Verschlechterung der Blutgefäßqualität. Dadurch wird ein vereinfachtes Eindringen der Tumorzellen in der Blutbahn ermöglicht sowie vermutlich auch EMT-Ereignisse durch erhöhte Hypoxie verstärkt.

V.3 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Tumorstammzelltheorie im WAP-T Mausmodells der Mammakarzinogenese. In vielen Aspekten erfüllen WAP-T Tumorzellen die Kriterien, die für CSC beschrieben wurden. So konnte hier gezeigt werden, dass WAP-T Tumorzellen untereinander hinsichtlich des Differenzierungsstatus heterogen sind und somit Differenzierungspotential besitzen. Weiterhin konnte durch das in dieser Arbeit etablierte Transplantationsverfahren bewiesen werden, dass WAP-T Tumore Zellen mit tumorinitiierenden Eigenschaften aufweisen und dass diese TICs mit einer Frequenz von einer Zelle in zehn Tumorzellen bis eine Zelle in hundert Tumorzellen vorkommen. Zudem wurde beobachtet, dass transplantierte Tumore den Phänotyp des Primärtumors rekapitulierten, was ebenfalls ein beschriebenes Charakteristikum für Tumorstammzellen ist.

Auf der Suche nach für WAP-T CSC spezifischen Markerkombinationen konnte gezeigt werden, dass G-2 Zellen, die aus einem WAP-T Mammakarzinom etabliert wurde, einen metastabilen Zustand zwischen mindestens drei verschiedenen Differenzierungsstatus *in vitro* aufweisen, und dass diese Eigenschaft durch EMT- und MET-Prozesse ermöglicht wird. Die Metastabilitätseigenschaften verleihen G-2 Zellen die Fähigkeit, verschiedene Phänotypen aufzuweisen und dabei Selbsterneuerungs-, Differenzierungs- und Tumorinitiierungseigenschaften zu erhalten. Hinweise auf Metastabilität in endogenen WAP-T Tumoren *in vivo* konnten ebenfalls in transplantierten G-2 Tumoren beobachtet werden. Dementsprechend können Tumorstammzellen der WAP-T Tumore nicht klassisch als einzelne Entität mit gut charakterisiertem Phänotyp, sondern vielmehr als homöostatisches heterogenes „Tumorzellsystem“ definiert werden.

Diese Erkenntnisse fordern eine Verfeinerung der klassischen Definition einer Tumorstammzelle und haben dramatische Konsequenzen auf das Konzept CSC-spezifischer Therapien. Tumore mit metastabilen Eigenschaften besitzen Zellen mit verschiedenen Phänotypen bezüglich Oberflächen- oder funktionellen Marker, die aber alle tumorinitiierenden Fähigkeiten besitzen und ggf. deren Pendanten repopulieren können. Die durch spezifische Therapeutika gezielte Eliminierung einzelner Tumorzellpopulationen basierend auf deren Phänotyp hätte in diesem Fall nur einen partiellen Effekt, da die restlichen Populationen des Tumorzellsystems, die von der Behandlung nicht betroffen wären, nach einiger Zeit die ursprüngliche Zellzusammensetzung des Tumors wiederhergestellt haben werden. So sollte bei der Entwicklung von Therapien bedacht werden, dass entweder alle Bestandteile des tumorigenen Tumorzellsystems gleichzeitig eliminiert werden, was voraussetzt, dass das CCS ausführlich bekannt ist, oder dass Mitteln entwickelt werden, die einen Einfluss auf den Differenzierungsstatus aller tumorigenen Zellpopulationen des Systems ermöglicht, so dass anschließend nur noch Tumorzellen eines einzelnen Phänotyps zu Behandeln bleiben.

Zudem ist das Konzept des Tumorzellsystems und Metastabilität von Tumorzellen im Zusammenhang mit Prozessen der Metastasenbildung durchaus relevant. Es wird in der Literatur breit akzeptiert, dass das Erwerben eines mesenchymalen Phänotyps durch EMT einer der ersten Schritte der Metastasierungskaskade von Karzinomzellen darstellt und die Motilität sowie Invasivität der Tumorzellen fördert (Kalluri 2009; Thiery, Acloque et al. 2009; van der Pluijm 2010). Das Durchführen einer MET am Besiedlungsort gehört zu den späten Ereignissen der Metastasierungskaskade. Durch den Rückerwerb eines epithelialen Phänotyps werden Metastasen gebildet, welche die ursprüngliche Heterogenität des Primärtumors widerspiegelt (Chaffer, Thompson et al. 2007; Tsuji, Ibaragi et al. 2009; van der Pluijm 2010). Die Metastabilitätseigenschaften von disseminierenden Tumorzellen stellen also eine Voraussetzung für die Besiedlung von distalen Organen und die Bildung von Primärtumor-ähnlichen Metastasen dar. Zudem wird vermutet, dass die Bildung eines Tumorzellsystems am Ort der Tumorzellbesiedlung für die darauf folgende Metastasenbildung ebenfalls absolut notwendig ist (Polyak and Weinberg 2009). So könnten Therapeutika, die die Metastabilitätseigenschaften von Tumorzellen beeinträchtigen können, die Metastasierung von Tumorzellen verringern.

Nachdem in unserem Labor eine Verschiebung des metastabilen Zustandes von G-2 Zellen *in vitro* durch RNA-Interferenz-Methoden gezeigt wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit die Effektivität eines Einflusses auf WAP-T Tumorzellen *in vivo* durch Anwendung transgener Tiere mit ausgeknockten *Ceacam1*-Gen untersucht. Dabei konnte eine duale Rolle von CEACAM1 in der Tumorprogression beschrieben werden: (i) durch den Verlust von CEACAM1 in WAP-T Tumorzellen wird ein aggressiverer und EMT-ausgeprägter Phänotyp der Tumorzellen verursacht. Unter anderem ist die sequestrierende Funktion von CEACAM1 auf β -Catenin, der EMT-auslösende Effekt von FGF1 sowie die Überexpression von Clusterin als positiver Effektor der EMT unter Kontrolle des TGF β -Signalwegs in der Modulation des Tumorzellenphänotyps involviert. (ii) Den Verlust von CEACAM1 in der Tumormikroumgebung verursacht eine Verschlechterung der Tumorgefäßqualität. Die dadurch entstehende erhöhte Gefäßpermeabilität erleichtert das Eindringen von Tumorzellen in der Blutbahn. Parallel ist anzunehmen, dass eine geringe Tumorgefäßqualität eine verstärkte Hypoxie im Tumor verursacht, was wiederum EMT-Ereignisse von Tumorzellen und eine darauffolgende Metastasierung begünstigen kann.

Dieses Beispiel hervorhebt, wie wichtig die genaue Charakterisierung von Tumorzellsystemen und der Mechanismen ist, die für das Aufrechterhalten der verschiedenen Subpopulationen in ihrer Beziehungen untereinander verantwortlich sind. Ohne dieses Verständnis wird die Entwicklung wirksamer Therapien schwierig sein. Dabei erweist sich das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell als ein hervorragendes Werkzeug, um Tumorzellsysteme zu studieren und neue Therapienstrategien zu entwickeln.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Acloque, H., M. S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." *J Clin Invest* **119**(6): 1438-49.
- Adams, J. M. and A. Strasser (2008). "Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones?" *Cancer Res* **68**(11): 4018-21.
- Adamson, J. W., P. J. Fialkow, S. Murphy, J. F. Prchal and L. Steinmann (1976). "Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease." *N Engl J Med* **295**(17): 913-6.
- Ahuja, D., M. T. Saenz-Robles and J. M. Pipas (2005). "SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation." *Oncogene* **24**(52): 7729-45.
- Al-Hajj, M., M. W. Becker, M. Wicha, I. Weissman and M. F. Clarke (2004). "Therapeutic implications of cancer stem cells." *Curr Opin Genet Dev* **14**(1): 43-7.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3983-8.
- Ali-Seyed, M., N. Laycock, S. Karanam, W. Xiao, E. T. Blair, et al. (2006). "Cross-platform expression profiling demonstrates that SV40 small tumor antigen activates Notch, Hedgehog, and Wnt signaling in human cells." *BMC Cancer* **6**: 54.
- Alison, M. R., N. J. Guppy, S. M. Lim and L. J. Nicholson (2010). "Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose?" *J Pathol* **222**(4): 335-44.
- Almholt, K., K. A. Green, A. Juncker-Jensen, B. S. Nielsen, L. R. Lund, et al. (2007). "Extracellular proteolysis in transgenic mouse models of breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**(1): 83-97.
- Alvi, A. J., H. Clayton, C. Joshi, T. Enver, A. Ashworth, et al. (2003). "Functional and molecular characterisation of mammary side population cells." *Breast Cancer Res* **5**(1): R1-8.
- AmericanCancerSociety (2007). "Cancer facts and figures 2007." *American Cancer Society*.
- Andarawewa, K. L., A. C. Erickson, W. S. Chou, S. V. Costes, P. Gascard, et al. (2007). "Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition." *Cancer Res* **67**(18): 8662-70.
- Ansieau, S., J. Bastid, A. Doreau, A. P. Morel, B. P. Bouchet, et al. (2008). "Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence." *Cancer Cell* **14**(1): 79-89.
- Armstrong, L., M. Stojkovic, I. Dimmick, S. Ahmad, P. Stojkovic, et al. (2004). "Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity." *Stem Cells* **22**(7): 1142-51.
- Asselin-Labat, M. L., K. D. Sutherland, H. Barker, R. Thomas, M. Shackleton, et al. (2007). "Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation." *Nat Cell Biol* **9**(2): 201-9.
- Aubele, M., A. Mattis, H. Zitzelsberger, A. Walch, M. Kremer, et al. (1999). "Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization." *Cancer Genet Cytogenet* **110**(2): 94-102.
- Bamberger, A. M., L. Riethdorf, P. Nollau, M. Naumann, I. Erdmann, et al. (1998). "Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer." *Am J Pathol* **152**(6): 1401-6.
- Bao, S., Q. Wu, S. Sathornsumetee, Y. Hao, Z. Li, et al. (2006). "Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor." *Cancer Res* **66**(16): 7843-8.
- Bayna, E. M. and J. M. Rosen (1990). "Tissue-specific, high level expression of the rat whey acidic protein gene in transgenic mice." *Nucleic Acids Res* **18**(10): 2977-85.
- Beauchemin, N., P. Draber, G. Dveksler, P. Gold, S. Gray-Owen, et al. (1999). "Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family." *Exp Cell Res* **252**(2): 243-9.
- Bergers, G. and S. Song (2005). "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance." *Neuro Oncol* **7**(4): 452-64.
- Billottet, C., M. Tuefferd, D. Gentien, A. Rapinat, J. P. Thiery, et al. (2008). "Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells." *J Cell Biochem* **104**(3): 826-39.

- Bin Amer, S. M., Z. Maqbool, M. S. Nirmal, A. T. Qattan, S. S. Hussain, et al. (2008). "Gene expression profiling in women with breast cancer in a Saudi population." *Saudi Med J* **29**(4): 507-13.
- Bocker, W., D. Hungermann and T. Decker (2009). "[Anatomy of the breast]." *Pathologe* **30**(1): 6-12.
- Bocker, W., R. Moll, C. Poremba, R. Holland, P. J. Van Diest, et al. (2002). "Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept." *Lab Invest* **82**(6): 737-46.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* **3**(7): 730-7.
- Boyapati, A., M. Wilson, J. Yu and K. Rundell (2003). "SV40 17KT antigen complements dnaj mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts." *Virology* **315**(1): 148-58.
- Brabletz, T., A. Jung, S. Reu, M. Porzner, F. Hlubek, et al. (2001). "Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10356-61.
- Brenton, J. D., L. A. Carey, A. A. Ahmed and C. Caldas (2005). "Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?" *J Clin Oncol* **23**(29): 7350-60.
- Bruce, W. R. and H. Van Der Gaag (1963). "A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo." *Nature* **199**: 79-80.
- Burdon, T., L. Sankaran, R. J. Wall, M. Spencer and L. Hennighausen (1991). "Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation." *J Biol Chem* **266**(11): 6909-14.
- Busch, C., T. A. Hanssen, C. Wagener and O. B. B (2002). "Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition." *Hum Pathol* **33**(3): 290-8.
- Cadigan, K. M. and M. Peifer (2009). "Wnt signaling from development to disease: insights from model systems." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(2): a002881.
- Calabrese, C., H. Poppleton, M. Kocak, T. L. Hogg, C. Fuller, et al. (2007). "A perivascular niche for brain tumor stem cells." *Cancer Cell* **11**(1): 69-82.
- Campbell, L. L. and K. Polyak (2007). "Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?" *Cell Cycle* **6**(19): 2332-8.
- Cardiff, R. D. (2010). "The pathology of EMT in mouse mammary tumorigenesis." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**(2): 225-33.
- Cardiff, R. D., M. R. Anver, B. A. Gusterson, L. Hennighausen, R. A. Jensen, et al. (2000). "The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting." *Oncogene* **19**(8): 968-88.
- Chaffer, C. L., E. W. Thompson and E. D. Williams (2007). "Mesenchymal to epithelial transition in development and disease." *Cells Tissues Organs* **185**(1-3): 7-19.
- Chaichana, K., G. Zamora-Berridi, J. Camara-Quintana and A. Quinones-Hinojosa (2006). "Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies." *Stem Cells* **24**(12): 2851-7.
- Chao, Y. L., C. R. Shepard and A. Wells (2010). "Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition." *Mol Cancer* **9**: 179.
- Charafe-Jauffret, E., C. Ginestier, F. Iovino, C. Tarpin, M. Diebel, et al. (2010). "Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer." *Clin Cancer Res* **16**(1): 45-55.
- Charafe-Jauffret, E., C. Ginestier, F. Iovino, J. Wicinski, N. Cervera, et al. (2009). "Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature." *Cancer Res* **69**(4): 1302-13.
- Chen, C. J. and J. E. Shively (2004). "The cell-cell adhesion molecule carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 inhibits IL-2 production and proliferation in human T cells by association with Src homology protein-1 and down-regulates IL-2 receptor." *J Immunol* **172**(6): 3544-52.
- Chen, J., N. Imanaka and J. D. Griffin (2010). "Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion." *Br J Cancer* **102**(2): 351-60.

- Chen, M. S., W. A. Woodward, F. Behbod, S. Peddibhotla, M. P. Alfaro, et al. (2007). "Wnt/beta-catenin mediates radiation resistance of Sca1+ progenitors in an immortalized mammary gland cell line." *J Cell Sci* **120**(Pt 3): 468-77.
- Chen, Q., D. Liang, L. D. Fromm and P. A. Overbeek (2004). "Inhibition of lens fiber cell morphogenesis by expression of a mutant SV40 large T antigen that binds CREB-binding protein/p300 but not pRb." *J Biol Chem* **279**(17): 17667-73.
- Chen, W., R. Possemato, K. T. Campbell, C. A. Plattner, D. C. Pallas, et al. (2004). "Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation." *Cancer Cell* **5**(2): 127-36.
- Chen, W. J., H. W. Chen, S. L. Yu, C. H. Huang, T. D. Wang, et al. (2005). "Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1." *Shock* **24**(2): 124-31.
- Cherington, V., M. Brown, E. Paucha, J. St Louis, B. M. Spiegelman, et al. (1988). "Separation of simian virus 40 large-T-antigen-transforming and origin-binding functions from the ability to block differentiation." *Mol Cell Biol* **8**(3): 1380-4.
- Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*." *J Bacteriol* **127**(3): 1550-7.
- Cho, R. W., X. Wang, M. Diehn, K. Shedden, G. Y. Chen, et al. (2008). "Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors." *Stem Cells* **26**(2): 364-71.
- Clarke, M. F. (2005). "Self-renewal and solid-tumor stem cells." *Biol Blood Marrow Transplant* **11**(2 Suppl 2): 14-6.
- Cohnheim, J. (1867). "Ueber entzündung und eiterung." *Path Anat Physiol Klin Med* **40**: 1-79.
- Cohnheim, J. (1875). "Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren." *Virchows Arch* **65**: 64.
- Collins, A. T., P. A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower and N. J. Maitland (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* **65**(23): 10946-51.
- Collins, C. A., I. Olsen, P. S. Zammit, L. Heslop, A. Petrie, et al. (2005). "Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche." *Cell* **122**(2): 289-301.
- Crawford, N. P., J. Alsarraj, L. Lukes, R. C. Walker, J. S. Officewala, et al. (2008). "Bromodomain 4 activation predicts breast cancer survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(17): 6380-5.
- Crespi, B. and K. Summers (2005). "Evolutionary biology of cancer." *Trends Ecol Evol* **20**(10): 545-52.
- Crnogorac-Jurcovic, T., E. Efthimiou, P. Capelli, E. Blaveri, A. Baron, et al. (2001). "Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia." *Oncogene* **20**(50): 7437-46.
- Dalerba, P., R. W. Cho and M. F. Clarke (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." *Annu Rev Med* **58**: 267-84.
- Dango, S., W. Sieneel, M. Schreiber, C. Stremmel, A. Kirschbaum, et al. (2008). "Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM-1) is associated with increased angiogenic potential in non-small-cell lung cancer." *Lung Cancer* **60**(3): 426-33.
- Deome, K. B., L. J. Faulkin, Jr., H. A. Bern and P. B. Blair (1959). "Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice." *Cancer Res* **19**(5): 515-20.
- Deppert, W. and R. Pates (1979). "Simian virus 40 specific proteins on surface of HeLa cells infected with adenovirus 2-SV40 hybrid virus Ad2+ND2." *Nature* **277**(5694): 322-4.
- Dimri, G., H. Band and V. Band (2005). "Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models." *Breast Cancer Res* **7**(4): 171-9.
- Dontu, G., W. M. Abdallah, J. M. Foley, K. W. Jackson, M. F. Clarke, et al. (2003). "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells." *Genes Dev* **17**(10): 1253-70.
- Dontu, G. and M. S. Wicha (2005). "Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**(1): 75-86.
- Douville, J., R. Beaulieu and D. Balicki (2008). "ALDH1 as a Functional Marker of Cancer Stem and Progenitor Cells." *Stem Cells Dev.*
- Duester, G. (2008). "Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis." *Cell* **134**(6): 921-31.
- Duncan, G. S., D. P. Andrew, H. Takimoto, S. A. Kaufman, H. Yoshida, et al. (1999). "Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions." *J Immunol* **162**(5): 3022-30.

- Durante, F. (1874). "Nesso fisio-pathologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni." *Arch Memor Observ Chir Pract* **11**: 217–26.
- Eramo, A., F. Lotti, G. Sette, E. Pillozzi, M. Biffoni, et al. (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." *Cell Death Differ* **15**(3): 504-14.
- Ergun, S., N. Kilik, G. Ziegeler, A. Hansen, P. Nollau, et al. (2000). "CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor." *Mol Cell* **5**(2): 311-20.
- Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." *Science* **240**(4854): 889-95.
- Fantozzi, A. and G. Christofori (2006). "Mouse models of breast cancer metastasis." *Breast Cancer Res* **8**(4): 212.
- Ferlay, J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, et al. (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." *Ann Oncol* **18**(3): 581-92.
- Ferrara, N. and R. S. Kerbel (2005). "Angiogenesis as a therapeutic target." *Nature* **438**(7070): 967-74.
- Fialkow, P. J., G. B. Faguet, R. J. Jacobson, K. Vaidya and S. Murphy (1981). "Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell." *Blood* **58**(5): 916-9.
- Fialkow, P. J., R. J. Jacobson and T. Papayannopoulou (1977). "Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage." *Am J Med* **63**(1): 125-30.
- Fialkow, P. J., J. W. Singer, J. W. Adamson, K. Vaidya, L. W. Dow, et al. (1981). "Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin." *Blood* **57**(6): 1068-73.
- Flanagan, L., L. Whyte, N. Chatterjee and M. Tenniswood (2010). "Effects of clusterin over-expression on metastatic progression and therapy in breast cancer." *BMC Cancer* **10**(1): 107.
- Fukumura, D. and R. K. Jain (2007). "Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize." *J Cell Biochem* **101**(4): 937-49.
- Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, et al. (2004). "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." *Cancer Res* **64**(19): 7011-21.
- Gibson, U. E., C. A. Heid and P. M. Williams (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." *Genome Res* **6**(10): 995-1001.
- Ginestier, C., M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." *Cell Stem Cell* **1**(5): 555-67.
- Ginestier, C., J. Wicinski, N. Cervera, F. Monville, P. Finetti, et al. (2009). "Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation." *Cell Cycle* **8**(20): 3297-302.
- Goetz, F., Y. J. Tzeng, E. Guhl, J. Merker, M. Graessmann, et al. (2001). "The SV40 small t-antigen prevents mammary gland differentiation and induces breast cancer formation in transgenic mice; truncated large T-antigen molecules harboring the intact p53 and pRb binding region do not have this effect." *Oncogene* **20**(18): 2325-32.
- Grange, C., S. Lanzardo, F. Cavallo, G. Camussi and B. Bussolati (2008). "Sca-1 identifies the tumor-initiating cells in mammary tumors of BALB-neuT transgenic mice." *Neoplasia* **10**(12): 1433-43.
- Grimm, S. L., W. Bu, M. A. Longley, D. R. Roop, Y. Li, et al. (2006). "Keratin 6 is not essential for mammary gland development." *Breast Cancer Res* **8**(3): R29.
- Grimm, S. L., T. N. Seagroves, E. B. Kabotyanski, R. C. Hovey, B. K. Vonderhaar, et al. (2002). "Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development." *Mol Endocrinol* **16**(12): 2675-91.
- Grimshaw, M. J., L. Cooper, K. Papazisis, J. A. Coleman, H. R. Bohnenkamp, et al. (2008). "Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells." *Breast Cancer Res* **10**(3): R52.
- Guan, Y., B. Gerhard and D. E. Hogge (2003). "Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML)." *Blood* **101**(8): 3142-9.
- Guzman, M. L., C. F. Swiderski, D. S. Howard, B. A. Grimes, R. M. Rossi, et al. (2002). "Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 16220-5.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." *Genome Res* **6**(10): 986-94.

- Heinlein, C., F. Krepulat, J. Lohler, D. Speidel, W. Deppert, et al. (2008). "Mutant p53(R270H) gain of function phenotype in a mouse model for oncogene-induced mammary carcinogenesis." *Int J Cancer* **122**(8): 1701-9.
- Hennighausen, L. and G. W. Robinson (2005). "Information networks in the mammary gland." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(9): 715-25.
- Hennighausen, L., C. Westphal, L. Sankaran and C. W. Pittius (1991). "Regulation of expression of genes for milk proteins." *Biotechnology* **16**: 65-74.
- Heppner, G. H. (1984). "Tumor heterogeneity." *Cancer Res* **44**(6): 2259-65.
- Hess, D. A., L. Wirthlin, T. P. Craft, P. E. Herrbrich, S. A. Hohm, et al. (2006). "Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells." *Blood* **107**(5): 2162-9.
- Higgins, C., S. Chatterjee and V. Cherington (1996). "The block of adipocyte differentiation by a C-terminally truncated, but not by full-length, simian virus 40 large tumor antigen is dependent on an intact retinoblastoma susceptibility protein family binding domain." *J Virol* **70**(2): 745-52.
- Higgins, C. and V. Cherington (2001). "Methods to assess inhibition of adipocyte differentiation by SV40 large T antigen." *Methods Mol Biol* **165**: 165-83.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh and R. Griffith (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." *Biotechnology (N Y)* **10**(4): 413-7.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." *Biotechnology (N Y)* **11**(9): 1026-30.
- Horst, A. K., W. D. Ito, J. Dabelstein, U. Schumacher, H. Sander, et al. (2006). "Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo." *J Clin Invest* **116**(6): 1596-605.
- Hsieh, J. T., W. Luo, W. Song, Y. Wang, D. I. Kleinerman, et al. (1995). "Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches." *Cancer Res* **55**(1): 190-7.
- Huang, F. J., W. K. You, P. Bonaldo, T. N. Seyfried, E. B. Pasquale, et al. (2010). "Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse." *Dev Biol* **344**(2): 1035-46.
- Huang, J., J. F. Simpson, C. Glackin, L. Riethorf, C. Wagener, et al. (1998). "Expression of biliary glycoprotein (CD66a) in normal and malignant breast epithelial cells." *Anticancer Res* **18**(5A): 3203-12.
- Huang, S., Y. Chen, K. Podsypanina and Y. Li (2008). "Comparison of expression profiles of metastatic versus primary mammary tumors in MMTV-Wnt-1 and MMTV-Neu transgenic mice." *Neoplasia* **10**(2): 118-24.
- Huff, C. A., W. H. Matsui, B. Douglas Smith and R. J. Jones (2006). "Strategies to eliminate cancer stem cells: clinical implications." *Eur J Cancer* **42**(9): 1293-7.
- Hwang-Verslues, W. W., K. J. Chang, E. Y. Lee and W. H. Lee (2008). "Breast cancer stem cells and tumor suppressor genes." *J Formos Med Assoc* **107**(10): 751-66.
- Jannasch, K., C. Dullin, C. Heinlein, F. Krepulat, F. Wegwitz, et al. (2009). "Detection of different tumor growth kinetics in single transgenic mice with oncogene-induced mammary carcinomas by flat-panel volume computed tomography." *Int J Cancer* **125**(1): 62-70.
- Jin, L., Y. Li, C. J. Chen, M. A. Sherman, K. Le, et al. (2008). "Direct interaction of tumor suppressor CEACAM1 with beta catenin: identification of key residues in the long cytoplasmic domain." *Exp Biol Med (Maywood)* **233**(7): 849-59.
- Kalluri, R. (2009). "EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells." *J Clin Invest* **119**(6): 1417-9.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest* **119**(6): 1420-8.
- Kamangar, F., G. M. Dores and W. F. Anderson (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world." *J Clin Oncol* **24**(14): 2137-50.
- Kammerer, R., T. Popp, B. B. Singer, J. Schlender and W. Zimmermann (2004). "Identification of allelic variants of the bovine immune regulatory molecule CEACAM1 implies a pathogen-driven evolution." *Gene* **339**: 99-109.
- Kaplan, R. N., R. D. Riba, S. Zacharoulis, A. H. Bramley, L. Vincent, et al. (2005). "VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche." *Nature* **438**(7069): 820-7.

- Kelly, P. N., A. Dakic, J. M. Adams, S. L. Nutt and A. Strasser (2007). "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells." *Science* **317**(5836): 337.
- Kim, S. H., M. C. Kook, Y. K. Shin, S. H. Park and H. G. Song (2004). "Evaluation of antigen retrieval buffer systems." *J Mol Histo* **35**(4): 409-16.
- Kinugasa, T., M. Kuroki, H. Takeo, Y. Matsuo, K. Ohshima, et al. (1998). "Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas." *Int J Cancer* **76**(1): 148-53.
- Kirshner, J., C. J. Chen, P. Liu, J. Huang and J. E. Shively (2003). "CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 521-6.
- Klein, A., E. Guhl, R. Zollinger, Y. J. Tzeng, R. Wessel, et al. (2005). "Gene expression profiling: cell cycle deregulation and aneuploidy do not cause breast cancer formation in WAP-SVT/t transgenic animals." *J Mol Med* **83**(5): 362-76.
- Knoblich, J. A. (2001). "Asymmetric cell division during animal development." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 11-20.
- Kokkinos, M. I., R. Wafai, M. K. Wong, D. F. Newgreen, E. W. Thompson, et al. (2007). "Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo." *Cells Tissues Organs* **185**(1-3): 191-203.
- Kolb, A. F., W. H. Gunzburg, R. Albang, G. Brem, V. Erfle, et al. (1994). "Negative regulatory element in the mammary specific whey acidic protein promoter." *J Cell Biochem* **56**(2): 245-61.
- Kondo, M., A. J. Wagers, M. G. Manz, S. S. Prohaska, D. C. Scherer, et al. (2003). "Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application." *Annu Rev Immunol* **21**: 759-806.
- Kordon, E. C. and G. H. Smith (1998). "An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell." *Development* **125**(10): 1921-30.
- Krepulat, F., J. Lohler, C. Heinlein, A. Hermannstadter, G. V. Tolstonog, et al. (2005). "Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice." *Oncogene* **24**(29): 4645-59.
- Kuespert, K., S. Pils and C. R. Hauck (2006). "CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology." *Curr Opin Cell Biol* **18**(5): 565-71.
- Kumar, P., Y. Ning and P. J. Polverini (2008). "Endothelial cells expressing Bcl-2 promotes tumor metastasis by enhancing tumor angiogenesis, blood vessel leakiness and tumor invasion." *Lab Invest* **88**(7): 740-9.
- Kunath, T., C. Ordonez-Garcia, C. Turbide and N. Beauchemin (1995). "Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein." *Oncogene* **11**(11): 2375-82.
- Kurrey, N. K., S. P. Jalgaonkar, A. V. Joglekar, A. D. Ghanate, P. D. Chaskar, et al. (2009). "Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells." *Stem Cells* **27**(9): 2059-68.
- Kuukasjarvi, T., R. Karhu, M. Tanner, M. Kahkonen, A. Schaffer, et al. (1997). "Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer." *Cancer Res* **57**(8): 1597-604.
- Land, C. E. and D. H. McGregor (1979). "Breast cancer incidence among atomic bomb survivors: implications for radiobiologic risk at low doses." *J Natl Cancer Inst* **62**(1): 17-21.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* **367**(6464): 645-8.
- Lenferink, A. E., C. Cantin, A. Nantel, E. Wang, Y. Durocher, et al. (2010). "Transcriptome profiling of a TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition reveals extracellular clusterin as a target for therapeutic antibodies." *Oncogene* **29**(6): 831-44.
- Lerma, E., A. Barnadas and J. Prat (2009). "Triple negative breast carcinomas: similarities and differences with basal like carcinomas." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **17**(6): 483-94.
- Leung, N., C. Turbide, B. Balachandra, V. Marcus and N. Beauchemin (2008). "Intestinal tumor progression is promoted by decreased apoptosis and dysregulated Wnt signaling in Ceacam1-/- mice." *Oncogene* **27**(36): 4943-53.
- Leung, N., C. Turbide, M. Olson, V. Marcus, S. Jothy, et al. (2006). "Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis." *Oncogene* **25**(40): 5527-36.

- Lewis, J. D., M. H. Shearer, R. C. Kennedy and R. K. Bright (2005). "Surrogate tumor antigen vaccination induces tumor-specific immunity and the rejection of spontaneous metastases." *Cancer Res* **65**(7): 2938-46.
- Li, L. and T. Xie (2005). "Stem cell niche: structure and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 605-31.
- Li, X., M. T. Lewis, J. Huang, C. Gutierrez, C. K. Osborne, et al. (2008). "Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy." *J Natl Cancer Inst* **100**(9): 672-9.
- Li, Y., B. Welm, K. Podsypanina, S. Huang, M. Chamorro, et al. (2003). "Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15853-8.
- Lindley, L. E. and K. J. Briegel (2010). "Molecular characterization of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **399**(4): 659-64.
- Lindstrom, M. S. and Y. Zhang (2008). "Ribosomal protein S9 is a novel B23/NPM-binding protein required for normal cell proliferation." *J Biol Chem* **283**(23): 15568-76.
- Liu, J. C., T. Deng, R. S. Lehal, J. Kim and E. Zacksenhaus (2007). "Identification of tumorsphere- and tumor-initiating cells in HER2/Neu-induced mammary tumors." *Cancer Res* **67**(18): 8671-81.
- Liu, W., W. Wei, D. Winer, A. M. Bamberger, C. Bamberger, et al. (2007). "CEACAM1 impedes thyroid cancer growth but promotes invasiveness: a putative mechanism for early metastases." *Oncogene* **26**(19): 2747-58.
- Liu, X., G. W. Robinson, F. Gouilleux, B. Groner and L. Hennighausen (1995). "Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8831-5.
- Losi, L., B. Baisse, H. Bouzourene and J. Benhattar (2005). "Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression." *Carcinogenesis* **26**(5): 916-22.
- Louie, E., S. Nik, J. S. Chen, M. Schmidt, B. Song, et al. (2010). "Identification of a stem-like cell population by exposing metastatic breast cancer cell lines to repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation." *Breast Cancer Res* **12**(6): R94.
- Lowe, D. B., M. H. Shearer, J. F. Aldrich, R. E. Winn, C. A. Jumper, et al. (2010). "Role of the innate immune response and tumor immunity associated with simian virus 40 large tumor antigen." *J Virol* **84**(19): 10121-30.
- Lowe, D. B., M. H. Shearer, C. A. Jumper, R. K. Bright and R. C. Kennedy (2010). "Tumor immunity against a simian virus 40 oncoprotein requires CD8+ T lymphocytes in the effector immune phase." *J Virol* **84**(2): 883-93.
- Lundgren, K., B. Nordenskjold and G. Landberg (2009). "Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer." *Br J Cancer* **101**(10): 1769-81.
- Lungu, G., L. Covalada, O. Mendes, H. Martini-Stoica and G. Stoica (2008). "FGF-1-induced matrix metalloproteinase-9 expression in breast cancer cells is mediated by increased activities of NF-kappaB and activating protein-1." *Mol Carcinog* **47**(6): 424-35.
- Mahon, K. A., A. B. Chepelinsky, J. S. Khillan, P. A. Overbeek, J. Piatigorsky, et al. (1987). "Oncogenesis of the lens in transgenic mice." *Science* **235**(4796): 1622-8.
- Malzahn, K., M. Mitze, M. Thoenes and R. Moll (1998). "Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas." *Virchows Arch* **433**(2): 119-29.
- Mark, M., N. B. Ghyselinck and P. Chambon (2009). "Function of retinoic acid receptors during embryonic development." *Nucl Recept Signal* **7**: e002.
- Martin, A. and A. Cano (2010). "Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal." *Nat Cell Biol* **12**(10): 924-5.
- Martin, M. D., K. J. Carter, S. R. Jean-Philippe, M. Chang, S. Mobashery, et al. (2008). "Effect of ablation or inhibition of stromal matrix metalloproteinase-9 on lung metastasis in a breast cancer model is dependent on genetic background." *Cancer Res* **68**(15): 6251-9.
- Matsui, W., C. A. Huff, Q. Wang, M. T. Malehorn, J. Barber, et al. (2004). "Characterization of clonogenic multiple myeloma cells." *Blood* **103**(6): 2332-6.
- Medina, D. (1996). "The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **1**(1): 5-19.
- Merlo, L. M., J. W. Pepper, B. J. Reid and C. C. Maley (2006). "Cancer as an evolutionary and ecological process." *Nat Rev Cancer* **6**(12): 924-35.
- Meyer, M. J., J. M. Fleming, A. F. Lin, S. A. Hussnain, E. Ginsburg, et al. (2010). "CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer." *Cancer Res* **70**(11): 4624-33.

- Micalizzi, D. S., S. M. Farabaugh and H. L. Ford (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**(2): 117-34.
- Mikaelian, I., M. Hovick, K. A. Silva, L. M. Burzenski, L. D. Shultz, et al. (2006). "Expression of terminal differentiation proteins defines stages of mouse mammary gland development." *Vet Pathol* **43**(1): 36-49.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." *Annu Rev Neurosci* **28**: 223-50.
- Moll, R., M. Divo and L. Langbein (2008). "The human keratins: biology and pathology." *Histochem Cell Biol* **129**(6): 705-33.
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." *Science* **311**(5769): 1880-5.
- Moskophidis, D. and R. M. Zinkernagel (1995). "Immunobiology of cytotoxic T-cell escape mutants of lymphocytic choriomeningitis virus." *J Virol* **69**(4): 2187-93.
- Mukhopadhyay, S. S., S. L. Wyszomierski, R. M. Gronostajski and J. M. Rosen (2001). "Differential interactions of specific nuclear factor I isoforms with the glucocorticoid receptor and STAT5 in the cooperative regulation of WAP gene transcription." *Mol Cell Biol* **21**(20): 6859-69.
- Muller, M. M., B. B. Singer, E. Klaile, B. Obrink and L. Lucka (2005). "Transmembrane CEACAM1 affects integrin-dependent signaling and regulates extracellular matrix protein-specific morphology and migration of endothelial cells." *Blood* **105**(10): 3925-34.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Nakshatri, H., E. F. Srour and S. Badve (2009). "Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on." *Curr Stem Cell Res Ther* **4**(1): 50-60.
- Neumaier, M., S. Paululat, A. Chan, P. Matthaes and C. Wagener (1993). "Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10744-8.
- Nicolson, G. L. and N. L. Rosenberg (1987). "Diversification and progression of malignant tumors." *Bioessays* **6**(5): 204-8.
- Nittka, S., J. Gunther, C. Ebisch, A. Erbersdobler and M. Neumaier (2004). "The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis." *Oncogene* **23**(58): 9306-13.
- Nollau, P., F. Prall, U. Helmchen, C. Wagener and M. Neumaier (1997). "Dysregulation of carcinoembryonic antigen group members CGM2, CD66a (biliary glycoprotein), and nonspecific cross-reacting antigen in colorectal carcinomas. Comparative analysis by northern blot and in situ hybridization." *Am J Pathol* **151**(2): 521-30.
- Nollau, P., H. Scheller, M. Kona-Horstmann, S. Rohde, F. Hagenmuller, et al. (1997). "Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas." *Cancer Res* **57**(12): 2354-7.
- Nouvion, A. L. and N. Beauchemin (2009). "[CEACAM1 as a central modulator of metabolism, tumor progression, angiogenesis and immunity]." *Med Sci (Paris)* **25**(3): 247-52.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* **194**(4260): 23-8.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger and J. E. Dick (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." *Nature* **445**(7123): 106-10.
- Obrink, B. (1997). "CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties." *Curr Opin Cell Biol* **9**(5): 616-26.
- Obrink, B. (2008). "On the role of CEACAM1 in cancer." *Lung Cancer* **60**(3): 309-12.
- Ocklind, C. and B. Obrink (1982). "Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process." *J Biol Chem* **257**(12): 6788-95.
- Oikawa, S., M. Kuroki, Y. Matsuoka, G. Kosaki and H. Nakazato (1992). "Homotypic and heterotypic Ca(++)-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface." *Biochem Biophys Res Commun* **186**(2): 881-7.
- Oliveira-Ferrer, L., D. Tilki, G. Ziegeler, J. Hauschild, S. Loges, et al. (2004). "Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer." *Cancer Res* **64**(24): 8932-8.
- Olumi, A. F., G. D. Grossfeld, S. W. Hayward, P. R. Carroll, T. D. Tlsty, et al. (1999). "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." *Cancer Res* **59**(19): 5002-11.

- Pajic, M., A. Kersbergen, F. van Diepen, A. Pfauth, J. Jonkers, et al. (2010). "Tumor-initiating cells are not enriched in cisplatin-surviving BRCA1;p53-deficient mammary tumor cells in vivo." *Cell Cycle* **9**(18): 3780-91.
- Pajic, M., A. Kersbergen, F. van Diepen, A. Pfauth, J. Jonkers, et al. (2010). "Tumor-initiating cells are not enriched in cisplatin-surviving BRCA1;p53-deficient mammary tumor cells in vivo." *Cell Cycle* **9**(18).
- Pappa, A., D. Brown, Y. Koutalos, J. DeGregori, C. White, et al. (2005). "Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells." *J Biol Chem* **280**(30): 27998-8006.
- Park, C. H., D. E. Bergsagel and E. A. McCulloch (1971). "Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay." *J Natl Cancer Inst* **46**(2): 411-22.
- Patrawala, L., T. Calhoun, R. Schneider-Broussard, H. Li, B. Bhatia, et al. (2006). "Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells." *Oncogene* **25**(12): 1696-708.
- Pearce, D. J., D. Taussig, C. Simpson, K. Allen, A. Z. Rohatiner, et al. (2005). "Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples." *Stem Cells* **23**(6): 752-60.
- Pechoux, C., T. Gudjonsson, L. Ronnov-Jessen, M. J. Bissell and O. W. Petersen (1999). "Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells." *Dev Biol* **206**(1): 88-99.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-52.
- Phillips, T. M., W. H. McBride and F. Pajonk (2006). "The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation." *J Natl Cancer Inst* **98**(24): 1777-85.
- Pierce, G. B. (1967). "Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer." *Curr Top Dev Biol* **2**: 223-46.
- Polyak, K. (2007). "Breast cancer: origins and evolution." *J Clin Invest* **117**(11): 3155-63.
- Polyak, K. and R. A. Weinberg (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." *Nat Rev Cancer* **9**(4): 265-73.
- Ponti, D., A. Costa, N. Zaffaroni, G. Pratesi, G. Petrangolini, et al. (2005). "Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties." *Cancer Res* **65**(13): 5506-11.
- Pontier, S. M. and W. J. Muller (2009). "Integrins in mammary-stem-cell biology and breast-cancer progression--a role in cancer stem cells?" *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 207-14.
- Porter, P. L. (2009). "Global trends in breast cancer incidence and mortality." *Salud Publica Mex* **51** Suppl 2: s141-6.
- Prince, M. E., R. Sivanandan, A. Kaczorowski, G. T. Wolf, M. J. Kaplan, et al. (2007). "Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(3): 973-8.
- Proia, D. A. and C. Kuperwasser (2006). "Reconstruction of human mammary tissues in a mouse model." *Nat Protoc* **1**(1): 206-14.
- Raica, M., I. Jung, A. M. Cimpean, C. Suciuc and A. M. Muresan (2009). "From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change?" *Rom J Morphol Embryol* **50**(1): 5-13.
- Redondo, M., T. Tellez and M. J. Roldan (2009). "The role of clusterin (CLU) in malignant transformation and drug resistance in breast carcinomas." *Adv Cancer Res* **105**: 21-43.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**(6859): 105-11.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff and S. Weiss (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." *J Neurosci* **12**(11): 4565-74.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-5.
- Riethdorf, L., B. W. Lisboa, U. Henkel, M. Naumann, C. Wagener, et al. (1997). "Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the human mammary gland." *J Histochem Cytochem* **45**(7): 957-63.
- Rizki, A., V. M. Weaver, S. Y. Lee, G. I. Rozenberg, K. Chin, et al. (2008). "A human breast cell model of preinvasive to invasive transition." *Cancer Res* **68**(5): 1378-87.
- Rosen, J. M. (2004). "MOLECULAR MECHANISMS REGULATING BREAST DEVELOPMENT." *Diseases of the Breast*.

- Rosen, P. P., S. Groshen, P. E. Saigo, D. W. Kinne and S. Hellman (1989). "Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years." *J Clin Oncol* **7**(9): 1239-51.
- Rosenberg, M., P. Nedellec, S. Jothy, D. Fleiszer, C. Turbide, et al. (1993). "The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues." *Cancer Res* **53**(20): 4938-45.
- Russo, J. E. and J. Hilton (1988). "Characterization of cytosolic aldehyde dehydrogenase from cyclophosphamide resistant L1210 cells." *Cancer Res* **48**(11): 2963-8.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-4.
- Salton, M., Y. Lerenthal, S. Y. Wang, D. J. Chen and Y. Shiloh (2010). "Involvement of matrin 3 and SFPQ/NONO in the DNA damage response." *Cell Cycle* **9**(8).
- Scheffrahn, I., B. B. Singer, K. Sigmundsson, L. Lucka and B. Obrink (2005). "Control of density-dependent, cell state-specific signal transduction by the cell adhesion molecule CEACAM1, and its influence on cell cycle regulation." *Exp Cell Res* **307**(2): 427-35.
- Schmalhofer, O., S. Brabletz and T. Brabletz (2009). "E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer." *Cancer Metastasis Rev* **28**(1-2): 151-66.
- Schulz, M., P. Aichele, M. Vollenweider, F. W. Bobe, F. Cardinaux, et al. (1989). "Major histocompatibility complex--dependent T cell epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein and their protective capacity against viral disease." *Eur J Immunol* **19**(9): 1657-67.
- Schulz, M., R. M. Zinkernagel and H. Hengartner (1991). "Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(3): 991-3.
- Schulze-Garg, C., J. Lohler, A. Gocht and W. Deppert (2000). "A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland." *Oncogene* **19**(8): 1028-37.
- Shackleton, M., F. Vaillant, K. J. Simpson, J. Stingl, G. K. Smyth, et al. (2006). "Generation of a functional mammary gland from a single stem cell." *Nature* **439**(7072): 84-8.
- Shannan, B., M. Seifert, K. Leskov, J. Willis, D. Boothman, et al. (2006). "Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer." *Cell Death Differ* **13**(1): 12-9.
- Sheffield, L. G. (1988). "Organization and growth of mammary epithelia in the mammary gland fat pad." *J Dairy Sci* **71**(10): 2855-74.
- Sheng, Q., T. M. Love and B. Schaffhausen (2000). "J domain-independent regulation of the Rb family by polyomavirus large T antigen." *J Virol* **74**(11): 5280-90.
- Shi, S. R., M. E. Key and K. L. Kalra (1991). "Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections." *J Histochem Cytochem* **39**(6): 741-8.
- Shinozuka, K., K. Uzawa, K. Fushimi, Y. Yamano, M. Shiiba, et al. (2009). "Downregulation of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in oral squamous cell carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis." *Oncology* **76**(6): 387-97.
- Shipitsin, M., L. L. Campbell, P. Argani, S. Weremowicz, N. Bloushtain-Qimron, et al. (2007). "Molecular definition of breast tumor heterogeneity." *Cancer Cell* **11**(3): 259-73.
- Sienel, W., S. Dango, U. Woelfle, A. Morresi-Hauf, C. Wagener, et al. (2003). "Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **9**(6): 2260-6.
- Silva, J., J. M. Silva, G. Dominguez, J. M. Garcia, B. Cantos, et al. (2003). "Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms." *J Pathol* **199**(3): 289-97.
- Singer, B. B., I. Scheffrahn and B. Obrink (2000). "The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation." *Cancer Res* **60**(5): 1236-44.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* **63**(18): 5821-8.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* **432**(7015): 396-401.

- Smith, G. H. and D. Medina (1988). "A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland." *J Cell Sci* **90** (Pt 1): 173-83.
- Smith, G. H., T. Mehrel and D. R. Roop (1990). "Differential keratin gene expression in developing, differentiating, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary epithelium." *Cell Growth Differ* **1**(4): 161-70.
- Smith, G. H., P. Strickland and C. W. Daniel (2002). "Putative epithelial stem cell loss corresponds with mammary growth senescence." *Cell Tissue Res* **310**(3): 313-20.
- Sneddon, J. B. and Z. Werb (2007). "Location, location, location: the cancer stem cell niche." *Cell Stem Cell* **1**(6): 607-11.
- Sneddon, J. B., H. H. Zhen, K. Montgomery, M. van de Rijn, A. D. Tward, et al. (2006). "Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(40): 14842-7.
- Sophos, N. A. and V. Vasiliou (2003). "Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update." *Chem Biol Interact* **143-144**: 5-22.
- Sorlie, T., C. M. Perou, C. Fan, S. Geisler, T. Aas, et al. (2006). "Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer." *Mol Cancer Ther* **5**(11): 2914-8.
- Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-74.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, et al. (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8418-23.
- Sotiriou, C., P. Wirapati, S. Loi, A. Harris, S. Fox, et al. (2006). "Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis." *J Natl Cancer Inst* **98**(4): 262-72.
- Sternlicht, M. D. (2006). "Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis." *Breast Cancer Res* **8**(1): 201.
- Sternlicht, M. D., A. Lochter, C. J. Simpson, B. Huey, J. P. Rougier, et al. (1999). "The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis." *Cell* **98**(2): 137-46.
- Stingl, J. and C. Caldas (2007). "Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis." *Nat Rev Cancer* **7**(10): 791-9.
- Stingl, J., P. Eirew, I. Ricketson, M. Shackleton, F. Vaillant, et al. (2006). "Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells." *Nature* **439**(7079): 993-7.
- Storms, R. W., A. P. Trujillo, J. B. Springer, L. Shah, O. M. Colvin, et al. (1999). "Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9118-23.
- Strange, R., F. Li, S. Saurer, A. Burkhardt and R. R. Friis (1992). "Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution." *Development* **115**(1): 49-58.
- Sun, P., Y. Yuan, A. Li, B. Li and X. Dai (2010). "Cytokeratin expression during mouse embryonic and early postnatal mammary gland development." *Histochem Cell Biol* **133**(2): 213-21.
- Tagi, T., T. Matsui, S. Kikuchi, S. Hoshi, T. Ochiai, et al. (2010). "Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer." *J Gastroenterol*.
- Takashima, N., H. Ishiguro, Y. Kuwabara, M. Kimura, N. Haruki, et al. (2006). "Expression and prognostic roles of PABPC1 in esophageal cancer: correlation with tumor progression and postoperative survival." *Oncol Rep* **15**(3): 667-71.
- Tanaka, K., Y. Hinoda, H. Takahashi, H. Sakamoto, Y. Nakajima, et al. (1997). "Decreased expression of biliary glycoprotein in hepatocellular carcinomas." *Int J Cancer* **74**(1): 15-9.
- Taylor-Papadimitriou, J., M. Stampfer, J. Bartek, A. Lewis, M. Boshell, et al. (1989). "Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium." *J Cell Sci* **94** (Pt 3): 403-13.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer* **2**(6): 442-54.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* **139**(5): 871-90.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(2): 131-42.

- Thies, A., I. Moll, J. Berger, C. Wagener, J. Brummer, et al. (2002). "CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease." *J Clin Oncol* **20**(10): 2530-6.
- Thompson, J. A., F. Grunert and W. Zimmermann (1991). "Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives." *J Clin Lab Anal* **5**(5): 344-66.
- Tilki, D., S. Irmak, L. Oliveira-Ferrer, J. Hauschild, K. Miethe, et al. (2006). "CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer." *Oncogene* **25**(36): 4965-74.
- Till, J. E. and E. McCulloch (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiat Res* **14**: 213-22.
- Tomaskovic-Crook, E., E. W. Thompson and J. P. Thiery (2009). "Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer." *Breast Cancer Res* **11**(6): 213.
- Torres, L., F. R. Ribeiro, N. Pandis, J. A. Andersen, S. Heim, et al. (2007). "Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases." *Breast Cancer Res Treat* **102**(2): 143-55.
- Tsai, Y. C., Y. Lu, P. W. Nichols, G. Zlotnikov, P. A. Jones, et al. (1996). "Contiguous patches of normal human mammary epithelium derived from a single stem cell: implications for breast carcinogenesis." *Cancer Res* **56**(2): 402-4.
- Tsuji, T., S. Ibaragi and G. F. Hu (2009). "Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis." *Cancer Res* **69**(18): 7135-9.
- Turbide, C., T. Kunath, E. Daniels and N. Beauchemin (1997). "Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth." *Cancer Res* **57**(13): 2781-8.
- Vaillant, F., M. L. Asselin-Labat, M. Shackleton, N. C. Forrest, G. J. Lindeman, et al. (2008). "The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis." *Cancer Res* **68**(19): 7711-7.
- van der Pluijm, G. (2010). "Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation." *Bone*.
- Vargo-Gogola, T. and J. M. Rosen (2007). "Modelling breast cancer: one size does not fit all." *Nat Rev Cancer* **7**(9): 659-72.
- Vasiliou, V. (2009). "Aldehyde Dehydrogenase Gene Superfamily Database." www.aldh.org.
- Vassilopoulos, A., R. H. Wang, C. Petrovas, D. Ambrozak, R. Koup, et al. (2008). "Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumors using markers for normal mammary stem cells." *Int J Biol Sci* **4**(3): 133-42.
- Veltmaat, J. M., A. A. Mailloux, J. P. Thiery and S. Bellusci (2003). "Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation." *Differentiation* **71**(1): 1-17.
- Visvader, J. E. (2009). "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis." *Genes Dev* **23**(22): 2563-77.
- Visvader, J. E. and G. J. Lindeman (2006). "Mammary stem cells and mammaryogenesis." *Cancer Res* **66**(20): 9798-801.
- Visvader, J. E. and G. J. Lindeman (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." *Nat Rev Cancer* **8**(10): 755-68.
- Volpert, O., W. Luo, T. J. Liu, V. T. Estrera, C. Logothetis, et al. (2002). "Inhibition of prostate tumor angiogenesis by the tumor suppressor CEACAM1." *J Biol Chem* **277**(38): 35696-702.
- Vonderhaar, B. K., G. H. Smith, R. J. Pauley, J. M. Rosen and Y. J. Topper (1978). "Difference between mammary epithelial cells from mature virgin and primiparous mice." *Cancer Res* **38**(11 Pt 2): 4059-65.
- Vongwiwatana, A., A. Tasanarong, D. C. Rayner, A. Melk and P. F. Halloran (2005). "Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis." *Am J Transplant* **5**(6): 1367-74.
- Voorhoeve, P. M. and R. Agami (2003). "Knockdown stands up." *Trends Biotechnol* **21**(1): 2-4.
- Wagner, K. U. (2004). "Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling?" *Breast Cancer Res* **6**(1): 31-8.
- Wang, E., S. Voiculescu, I. C. Le Poole, M. El-Gamil, X. Li, et al. (2006). "Clonal persistence and evolution during a decade of recurrent melanoma." *J Invest Dermatol* **126**(6): 1372-7.
- Wegwitz, F., M. A. Kluth, C. Manz, B. Otto, K. Gruner, et al. (2010). "Tumorigenic WAP-T Mouse Mammary Carcinoma Cells: A Model for a Self-Reproducing Homeostatic Cancer Cell System." *PLoS One* **5**(8).
- Weidner, N. (1998). "Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow." *J Pathol* **184**(2): 119-22.

- Weidner, N. (2004). "The importance of tumor angiogenesis: the evidence continues to grow." *Am J Clin Pathol* **122**(5): 675-7.
- Weinberg, R. A. (2008). "Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence." *Nat Cell Biol* **10**(9): 1021-3.
- Wellner, U., J. Schubert, U. C. Burk, O. Schmalhofer, F. Zhu, et al. (2009). "The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs." *Nat Cell Biol* **11**(12): 1487-95.
- Welm, B., F. Behbod, M. A. Goodell and J. M. Rosen (2003). "Isolation and characterization of functional mammary gland stem cells." *Cell Prolif* **36 Suppl 1**: 17-32.
- Welm, B. E., S. B. Tepera, T. Venezia, T. A. Graubert, J. M. Rosen, et al. (2002). "Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population." *Dev Biol* **245**(1): 42-56.
- Wicha, M. S., S. Liu and G. Dontu (2006). "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." *Cancer Res* **66**(4): 1883-90; discussion 1895-6.
- Wolman, S. R. (1986). "Cytogenetic heterogeneity: its role in tumor evolution." *Cancer Genet Cytogenet* **19**(1-2): 129-40.
- Wright, M. H., A. M. Calcagno, C. D. Salcido, M. D. Carlson, S. V. Ambudkar, et al. (2008). "Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics." *Breast Cancer Res* **10**(1): R10.
- Wu, D. Y., L. Ugozzoli, B. K. Pal, J. Qian and R. B. Wallace (1991). "The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction." *DNA Cell Biol* **10**(3): 233-8.
- Wu, R. X., M. Laser, H. Han, J. Varadarajulu, K. Schuh, et al. (2006). "Fibroblast migration after myocardial infarction is regulated by transient SPARC expression." *J Mol Med* **84**(3): 241-52.
- Xian, X., J. Hakansson, A. Stahlberg, P. Lindblom, C. Betsholtz, et al. (2006). "Pericytes limit tumor cell metastasis." *J Clin Invest* **116**(3): 642-51.
- Yin, S. J., C. S. Liao, Y. C. Lee, C. W. Wu and S. W. Jao (1994). "Genetic polymorphism and activities of human colon alcohol and aldehyde dehydrogenases: no gender and age differences." *Alcohol Clin Exp Res* **18**(5): 1256-60.
- Young, L. J., D. Medina, K. B. DeOme and C. W. Daniel (1971). "The influence of host and tissue age on life span and growth rate of serially transplanted mouse mammary gland." *Exp Gerontol* **6**(1): 49-56.
- Yu, F., H. Yao, P. Zhu, X. Zhang, Q. Pan, et al. (2007). "let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells." *Cell* **131**(6): 1109-23.
- Yun, M., S. H. Bang, J. W. Kim, J. Y. Park, K. S. Kim, et al. (2009). "The importance of acetyl coenzyme A synthetase for 11C-acetate uptake and cell survival in hepatocellular carcinoma." *J Nucl Med* **50**(8): 1222-8.
- Zerrahn, J. and W. Deppert (1993). "Analysis of simian virus 40 small t antigen-induced progression of rat F111 cells minimally transformed by large T antigen." *J Virol* **67**(3): 1555-63.
- Zerrahn, J., O. Utermohlen, G. Warnecke, W. Deppert and F. Lehmann-Grube (1996). "Protective immunity in BALB/c mice against the simian virus 40-induced mKSA tumor resulting from injection of recombinant large T antigen. Requirement of CD8+ T lymphocytes." *J Immunol* **156**(10): 3919-24.
- Zhang, M., F. Behbod, R. L. Atkinson, M. D. Landis, F. Kittrell, et al. (2008). "Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer." *Cancer Res* **68**(12): 4674-82.
- Zheng, G., J. G. Lyons, T. K. Tan, Y. Wang, T. T. Hsu, et al. (2009). "Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells." *Am J Pathol* **175**(2): 580-91.

VII ANHANG

VII.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
Accs1	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 1
Aldh	Aldehyd-Dehydrogenase
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
B	Belgien
BAA	BODIPY-Aminoacetate
BAAA	BODIPY-Aminoacetataldehyde
BGP	Biliäres Glykoprotein
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BODIPY	<i>boron-dipyrromethene</i>
bp	Basenpaar
<i>Brd4</i>	Bromodomain Protein 4
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirka (<i>circa</i>)
CCS	Tumorzellsystem (<i>cancer cell system</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM1	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>
CH	Schweiz
CK	Cytokeratin
CLSM	Konfokale-Laser-Scan-Mikroskopie (<i>confocal laser scanning microscopy</i>)
CLU	Clusterin
CML	Chronische myeloische Leukämie
CSC	Tumorstammzelle (<i>cancer stem cell</i>)
Cspg4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
d.h.	Das heißt
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylidol
DCIS	duktale <i>in situ</i> Karzinome (<i>ductal carcinoma in situ</i>)
DE	Deutschland
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>Dmkn</i>	Dermokine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNase	Deoxyribonuclease

Abkürzung	Bedeutung
dNTPs	Desoxynukleotide
DRAQ5	1,5-bis{[2-(di-methylamino) ethyl]amino}-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazellulärer Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	Epithelial-mesenchymale Plastizität
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
Engl.	Englisch
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
et al	<i>et alii</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF1	<i>Fibroblast growth factor 1</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FR	Frankreich
FSC	<i>Forward scatter</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GB	Großbritannien
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
ggf.	Gegebenenfalls
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H&E	Hämalaun und Eosin
HEPES	(N-2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethansulfonsäure)
HMW	<i>High molecular weight</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HSA	<i>Heat stable protein</i>
HSC	Hämatopoetischen Stammzellen (<i>hematopoietic stem cells</i>)
IDC	Invasive duktale Karzinome
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
ILC	Invasive lobuläre Karzinome
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Krt	Keratin
lat.	Latein
LCMV	Lymphozytären Choriomeningitis Virus (<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i>)
LCMV-NP	LCMV- Nukleokapsidprotein
lin	<i>Lineage</i>
LSC	<i>Leukemic stem cells</i>
LSM	Laser-Scan-Mikroskopie (<i>laser scanning microscopy</i>)
MaCa	Mammakarzinom (<i>mammary carcinoma</i>)
<i>Matr3</i>	Matrin 3
MEC	Mammaepithelzellen (<i>mammary epithelial cells</i>)
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

Abkürzung	Bedeutung
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
Orient.	Orientierung
<i>Pabpc1</i>	<i>Poly(A) binding protein cytoplasmic 1</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PEACAM1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pos.	Position
PP2A	Protein Phosphatase 2
qPCR	Quantitativen PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSP9	Ribosomale Protein S9
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR (<i>Reverse transcription PCR</i>)
Sca1	<i>Stem cell antigen 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Slit3	<i>Slit homolog 3 protein</i>
SMA	<i>Smooth muscle actin</i>
SP	<i>Side population</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
SV40-17kT	<i>Simian-Virus 40 17kT antigen</i>
SV40-LT	<i>Simian-Virus 40 large T antigen</i>
SV40-st	<i>Simian-Virus 40 small T antigen</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEB	<i>Terminal end buds</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Thy1	<i>Thymocyte differentiation antigen 1</i>
TIC	Tumorinitiierende Zelle(<i>tumor initiating cells</i>)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.A.	Unter Anderem
USA	Vereinigten Staaten von Amerika (<i>united states of america</i>)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vim	Vimentin
WAP	<i>Whey acidic protein</i>
z.B.	<i>Zum Beispiel</i>
ZO-1	<i>Zonula Occludens 1</i>

VII.2 Sicherheitstechnischdaten

VII.2.1 Verzeichnis der Gefahrensymbole

O	Brandfördernd
C	Ätzend
F	Leichtentzündlich
T	Giftig
T+	Sehr giftig
Xn	Gesundheitsschädlich
Xi	Reizend
N	Umweltgefährlich

VII.2.2 Verzeichnis der R- und S- Sätze

VII.2.2.1 Gefahrenhinweise (R-Sätze)

R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
R 10	Entzündlich
R 11	Leichtentzündlich
R 20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 34	Verursacht Verätzungen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 36	Reizt die Augen
R 37	Reizt die Atmungsorgane
R 38	Reizt die Haut
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 66	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
R 68	Irreversibler Schaden möglich

VII.2.2.2 Kombination der R-Sätze

R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 21/22	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 48/23/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 50/53	Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 51/53	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

VII.2.2.3 Sicherheitsratschläge (S-Sätze)

S 3	Kühl aufbewahren
S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 16	Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen
S 22	Staub nicht einatmen
S 23.2	Dampf nicht einatmen
S 24	Berührung mit der Haut vermeiden
S 26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 28.1	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser
S 28.2	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife
S 28.6	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400 und anschließende Reinigung mit viel Wasser
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S 37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S 53	Exposition vermeiden - vor Gebrauch bes. Anweisungen einholen
S 60	Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen

S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

VII.2.2.4 Kombination der S-Sätze

S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
 S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
 S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
 S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

VII.2.3 Gefahrenstoffe

Die folgende Liste beinhaltet sämtliche Verbindungen und Lösungsmittel, mit denen während dieser Arbeit umgegangen wurde. Die Gefahrstoffe sind, soweit vorhanden, mit den jeweiligen Gefahrensymbolen, R- und S-Sätzen versehen worden.

Substanzname	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	R 22-24-34-51/53	S 26-36/37/39-45-
2-Propanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-24-26
Aceton	F, Xi	R 11-36-66-67	S 9-16-26
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22	S 36/37
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38	S 24/25
Eosin Y	Xi	R 36	S 22-26
Essigsäure 100 %	C	R 10-35	S 23.2-26-45
Ethanol	F	R 11	S 7-16
Ethidiumbromid	T+	R 22-26-36/37/38-68	S 26-28.2-36/37
Formaldehyd 37%	T	R 23/24/25-34-40-43	S 26-36/37/39-45-51
Isoamylalkohol	Xn	R 10-20	S 24/25
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25	S 7-16-36/37-45
Natriumazid	T+	N R 28-32-50/53	S 28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	R 21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumhydroxid	C	R 35	S 26-37/39-45
Phenol	T	R 24/25-34	S 28.6-45
Salzsäure 37 %	C	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Triton X-100	Xn	R 22-41	S 24-26-39
Trypanblau	T	R 45	S 53-45
Wasserstoffperoxid 30 %	C	R 34	S 3-26-36/37/39-45
Xylol	Xn	R 10-20/21-38	S 25

VII.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisierung der Brustdrüsen in der Maus	2
Abbildung 2: Morphologie von terminal end buds (TEB) und Duktus	3
Abbildung 3: Entwicklung der Mausbrustdrüse während der Pubertät, Schwangerschaft und Laktation	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung von asymmetrischer Teilung und Differenzierung einer Stammzelle	6
Abbildung 5: Modell der Differenzierungshierarchie innerhalb des Brustdrüsenepithels.	8
Abbildung 6: Darstellung der zwei Modelle zur Erklärung der Krebsinitiierung und –progression	10
Abbildung 7: Stammzellhierarchie im humanen Brustepithel mit vorgeschlagenen Ausgangszelltypen für verschiedenen Brustkrebs-Subtypen	16
Abbildung 8: Humane CEACAM1 Isoformen	24
Abbildung 9: Darstellung der Genhomologie zum Hintergrundstamm in Abhängigkeit von der Generation während einer Mauslinien-Rückkreuzung	31
Abbildung 10: Darstellung des Ceacam1-Gens, des Ceacam1 ^{-/-} -Allels und des Ceacam1 ^{endo+} -Transgens	32
Abbildung 11: Prinzips der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie	52
Abbildung 12: Darstellung von lineage spezifischen Markern in der normalen WAP-T-NP8 Brustdrüse	67
Abbildung 13: Morphologie der für die Charakterisierung angewendeten WAP-T-NP8 Tumorproben	69
Abbildung 14: Darstellung von CK8/18 und CK14 in WAP-T-NP8 Tumoren	70
Abbildung 15: Darstellung von CK6 in WAP-T-NP8 Tumoren	71
Abbildung 16: Darstellung der in DChip für die Cluster-Analyse vorgenommene Einstellungen	73
Abbildung 17: Differenzielle Expression der Krt 18, Krt 14 und Krt 6 Gene in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumoren (RNA-Microarray Daten)	74
Abbildung 18: Differenzielle Expression der Krt 18, Krt 14 und Krt 6 Gene in differenzierten und undifferenzierten WAP-T-NP8 Tumoren (Quantitative PCR Daten)	75
Abbildung 19: Darstellung der Brustdrüsennummerierung der Maus und des orthotopischen Transplantationsorts	77
Abbildung 20: Darstellung des Transplantationserfolgs von WAP-T-NP8 Primärtumorzellen in syngenem BALB/c, WAP-T1, WAP-T-NP6 und WAP-T-NP8 Empfängertieren	78
Abbildung 21: Kontrolle zu den Transplantationsexperimenten	79
Abbildung 22: Darstellung des Transplantationserfolgs von Lin ⁻ WAP-T-NP8 Primärtumorzellen in syngenem BALB/c, WAP-T1, und WAP-T-NP8 Empfängertieren	80
Abbildung 23: Darstellung des Transplantationserfolgs von differenzierten bzw. undifferenzierten WAP-T-NP8 Primärtumorzellen in Abhängigkeit von der Anzahl transplantierte Zellen.	82
Abbildung 24: Morphologie primärer und transplantierte WAP-T-NP8 Tumoren	84
Abbildung 25: Charakterisierung der G-2 Zelllinie	86
Abbildung 26: Charakterisierung von Tumoren aus transplantierte G-2 Zellen	88
Abbildung 27: Expression der verschiedenen Aldh-Isotypen in WAP-T-NP8 Tumoren und in transplantierte G-2 Tumoren (RNA-Microarray Daten)	91
Abbildung 28: Eigenschaften der Aldh ^{br} - und Aldh ^{low} -Zellpopulationen aus WAP-T-NP8 Tumoren bezüglich Tumorinitiierung und Expression von Aldh-Isotypen	94
Abbildung 29: Eigenschaften der Aldh ^{br} - und Aldh ^{low} -Zellpopulationen aus G-2 Zellpopulationen bezüglich Tumorinitiierung und Expression von Aldh-Isotypen	96
Abbildung 30: Darstellung von CD24 in WAP-T-NP8 Tumoren	99
Abbildung 31: Darstellung von CD49f in WAP-T-NP8 Tumoren	100
Abbildung 32: Darstellung von CD29 in WAP-T-NP8 Tumoren	101
Abbildung 33: Darstellung von CD61 in WAP-T-NP8 Tumoren	102
Abbildung 34: Darstellung von Sca1 in WAP-T-NP8 Tumoren	103

Abbildung 35: Expression und Verteilung von CSC-relevanten Markern in G-2 Zellen. _____	105
Abbildung 36: : Metastabilität der G-2 Zelllinie _____	107
Abbildung 37: Darstellung von Vimentin und Keratin 8/18 in G-2 und WAP-T-NP8 Tumoren _____	109
Abbildung 38: Darstellung von Vimentin und SV40 LT in G-2 und WAP-T-NP8 Tumoren _____	110
Abbildung 39: Untersuchte Proben für die Charakterisierung der CEACAM1-Expression in normalen Brustdrüsen, Tumorvorstufen und Mammakarzinomen _____	114
Abbildung 40: Darstellung der Expression und Lokalisierung von CEACAM1 und CD31 in der Brustdrüse von WAP-T-NP8 und BALB/c Mäusen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und in Tumoren _____	115
Abbildung 41: Metastasierung in WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x Ceacam1 ^{-/-} Tumoren _____	116
Abbildung 42: EMT-assoziierte Marker in WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x Ceacam1 ^{-/-} Tumoren _____	121
Abbildung 43: Histopathologie und Immunhistologie von Lungen aus transplantierten WAP-T-NP8 Tieren _____	123
Abbildung 44: Qualität der Blutgefäße in WAP-T-NP8 Tumoren mit Ceacam1 ^{wt} bzw. Ceacam1 ^{-/-} Hintergrund. _____	125
Abbildung 45: Schematische Darstellung eines Duktus von einer adulten murinen Brustdrüse im Querschnitt. _____	129
Abbildung 46 Expression der Cytokeratine 5/14 und 8/18 in den verschiedenen Zelltypen des Mammaepithels _____	131
Abbildung 47: EMT und epitheliale Plastizität _____	142
Abbildung 48: Schematische Darstellung des G-2 Tumorzellsystems _____	145

VII.4 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Liste von Oberflächenmarkern, die in der Literatur für die Fraktionierung von Brustdrüsenepithel- und Mammarkarzinomzellen angewendet wurden (Visvader 2009).</i>	18
<i>Tabelle 2: Oberflächenmarker-Kombinationen, die in der Literatur für die Anreicherung von Tumorstammzellen in verschiedenen Mammarkarzinom-Mausmodellen angewendet wurden.</i>	20
<i>Tabelle 3: Eigenschaften von CEACAM1 in normalen Geweben</i>	25
<i>Tabelle 4: Klassifizierung der WAP-T Tumoren in 5 Kategorien, basierend auf dem histologischen Grad</i>	28
<i>Tabelle 5: Expression von SV40-LT während der Laktation in den WAP-T Mauslinien</i>	32
<i>Tabelle 6: Programm „Organe 1“ zur Gewebeentwässerung und -infiltration</i>	45
<i>Tabelle 7: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitten</i>	45
<i>Tabelle 8: Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung der Gewebeschnitte</i>	46
<i>Tabelle 9: Temperatureinstellungen des Cryostats</i>	48
<i>Tabelle 10: Zusammensetzung der PCR Ansätze für die Identifizierung der SV40-LT und CEACAM1^{endo+} Transgene sowie des CEACAM1^{KO} Genotyps</i>	60
<i>Tabelle 11: PCR-Programm für die Detektion der Transgene und des Knockouts</i>	60
<i>Tabelle 12: Zusammensetzung der Ansätze für die cDNA-Synthese</i>	63
<i>Tabelle 13: Übersicht über das zur cDNA-Synthese benötigte Temperaturprogramm</i>	63
<i>Tabelle 14: Zusammensetzung der qRT-PCR Ansätze</i>	64
<i>Tabelle 15: Darstellung der für die Transplantationen angewendeten Primärtumore und der entsprechenden Empfängertiere</i>	77
<i>Tabelle 16: Darstellung der für die Transplantationen von Lin⁻ Zellen verwendeten Primärtumore und der entsprechenden Empfängertiere</i>	80
<i>Tabelle 17: Tabellarische Darstellung des Transplantationserfolges von WAP-T-NP8 Primärtumorzellen</i>	82
<i>Tabelle 18: Tabellarische Darstellung des Grads der nach Transplantation gewachsenen Tumore</i>	84
<i>Tabelle 19: Tumorinitiierende Eigenschaften der G-2 Zelllinie in WAP-T-NP8 Empfängertieren</i>	87
<i>Tabelle 20: Liste der in die Aldh-Expressionsanalysen untersuchten Gene</i>	92
<i>Tabelle 21: Ergebnisse von RNA-Microarrays aus WAP-T-NP8 und WAP-T-NP8 x Ceacam1^{-/-} Tumoren</i>	119
<i>Tabelle 22: Darstellung der bezüglich Lungenmetastasierung miteinander verglichenen transplantierten Tiere</i>	122

POSTER, VORTRAGE, KONGRESSTEILNAHMEN, FÖRDERUNG UND KOOPERATION

- Poster

Wegwitz F, Maenz C, Heinlein C, Krepulat F, Schumacher U, Tolstonog GV, Deppert W. Analysis of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) as a functional marker of cancer stem cells in a mouse model for mammary carcinoma. Poster beim AEK-Kongress; Berlin, 03/2009

- Vortrag

Daniela Gerstel*, Florian Wegwitz*, Andrea Kristina Horst, Wolfgang Deppert, Christoph Wagener. Modulation of tumor angiogenesis by CEACAM1 in a mouse model for mammary carcinogenesis (WAP-T mice). SPP 1190 – Young Scientists Meeting; Würzburg, 05/2008

- Kongressteilnahme

SPP 1190 – Young Scientists Meeting im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms „SPP1190 – The tumor vessel interface“. Würzburg, 05/2008

AEK-Kongress 2009 - Abteilung experimentelle Krebsforschung in der Deutschen Krebs Gesellschaft, Berlin, 03/2009

- Förderung und Kooperation

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms „SPP1190 – The tumor-vessel interface“ und der Deutschen Krebshilfe in Rahmen des Schwerpunktprogramms „Tumorstammzellen“ gefördert

Kooperationen: UKE, Institut für Klinische Chemie: Prof. Dr. Christoph Wagener, Dr. Andrea

LEBENS LAUF

Persönliche Informationen

Name: Florian Wegwitz

Geburtsdatum: 13. März 1980

Geburtsort: Grasse (Dpt. Alpes-Maritimes), Frankreich

Studiengang:

März 2006

bis Jan. 2011: **Doktorarbeit im Fach "Biochemie"**

Universität Hamburg

Fachbereich Chemie

Titel: „Entdeckung, Charakterisierung und Modulation des Tumorstammzellsystems im WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell“.

Mai 2004

bis Juli 2005: **Diplomabschluss im Fach "Biochemie"**

Freie Universität Berlin

Fachbereich "Biologie, Chemie, Pharmazie, Studiengang Biochemie"

Gesamturteil: "sehr gut"

Diplomarbeit: "Herstellung, Reinigung und funktionelle Charakterisierung des HSV-1 Helikase-Primase-Komplexes im Baculovirus Expressionssystem" in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. R. Heilbronn im Institut für Infektionsmedizin, Campus Benjamin Franklin der Universitätsmedizin Charité, Berlin

Note: "sehr gut" (1,0)

Okt. 2002

bis Sept. 2003: "Maîtrise de Biochimie"

Université de Nice-Sophia-Antipolis, Campus Valrose, Nizza, Frankreich

Okt. 2001

bis Juni 2002: "Licence de Biochimie"

Université de Nice-Sophia-Antipolis, Campus Valrose, Nizza, Frankreich

Okt. 1998

bis Juni 2001: "DEUG mention sciences de la vie et de la terre"

Université de Nice-Sophia-Antipolis, Campus Valrose, Nizza, Frankreich

Sept. 1997

bis Juni 1998: "Baccalauréat" (Abitur)

Lycee Massena, Nizza, Frankreich

Weiterbildungen:

July 2009

„Good Laboratory Practice“-Schulung; Bernhard Nocht Institut, Hamburg

Jan. 2008

bis Juni 2008 „English for business and career“ (60 Unterrichtsstunden)

Feb. 2008

Immunohistochemie Workshop, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

März 2006

Kurs „Tierexperimentelle Arbeit mit der Maus“; UKE, Hamburg

DANKSAGUNG

Da diese Arbeit nur durch die Unterstützung und Mithilfe vieler Menschen möglich wurde, möchte ich all jenen an dieser Stelle danken:

Mein wohl größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert dafür, dass er mir das Thema dieser Promotionsarbeit überlassen hat. Ich danke ihm für seine fachliche Unterstützung, Diskussionsbereitschaft sowie seinen persönlichen Einsatz und sein Vertrauen, welches er mir entgegen gebracht hat.

Für die ausgesprochen nette und produktive Kooperation möchte ich mich bei der Gruppe von Herrn Prof. Dr. C. Wagener und insbesondere bei Dr. Andrea Horst und Daniela Gerstel bedanken. Die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Freude bereitet und war eine große Bereicherung für mich.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frauke Krepulat, Nina Heinlein und Claudia Mänz für die umfassende Betreuung und Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit in der Abteilung für Tumorvirologie. Ich danke für die zahlreichen motivierenden Gespräche und ebenso für die konstruktive und faire Kritik im Rahmen meiner Doktorarbeit.

Dr. Genrich Tolstonog danke ich für die unermüdliche Beantwortung molekularbiologischer Fragestellungen und Unterstützung im Laborbereich.

Jasmin Oehlmann, Andrea Diesterbeck, Annette Preuß und Julia Abe möchte ich für die stets zuverlässige Arbeit, die angenehme Arbeitsstimmung und die moralische Unterstützung in den schwierigen Momenten danken. Weiterhin danke ich Eva Lenfert für die zahlreichen Korrekturen und konstruktiven Diskussionen.

Ich danke zudem Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher und Gundula Pilnitz-Stolze für die umfangreiche aber immer hochwertig durchgeführte histopathologische Arbeit.

Gleichzeitig bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Heinrich-Pette-Instituts, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, unter anderem bei den Tierpflegern Hasso Münd, Beate Miksche, Anke Dorendorf und Matthias Timmermann. Hierbei gilt ein besonderen Dank an die Mitarbeiter der Abteilung Tumorvirologie: Martina Hintz, Marion Kühl, Gabriele Warnecke und Doris Weidemann für deren unerschöpfliche Hilfsbereitschaft.

Mark-Andreas Kluth und Timo Quante möchte ich vor allem für das Korrekturlesen meiner Promotionsarbeit und die wertvollen stilistischen Verbesserungsvorschläge, die wesentlich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben, danken. Nicht zuletzt danke ich ihnen für ihre Freundschaft, die mir sehr viel bedeutet.

An dieser Stelle, möchte ich herzlich Judith Heinz dafür danken, dass sie in guten sowie in schlechten Zeiten an meiner Seite gestanden hat und mir mit Verständnis und Geduld, Unterstützung und Motivation während meiner Promotion gegeben hat. Dafür, dass sie mir das schönste Geschenk, das jemand sich wünschen kann, gegeben hat, bedanke ich mich vom ganzen Herz

Als letztes, möchte ich meinen Eltern Anne und Michael Wegwitz sowie meiner Schwester Lea Wegwitz für die persönliche Unterstützung, die sie mir entgegen gebracht haben, danken.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hamburg, 26.11.2011

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich, Florian Wegwitz, geboren am 13 März 1980 in Grasse (Frankreich), die eingereichte Dissertation „**Entdeckung, Charakterisierung und Modulation des Tumorstammzellsystems im WAP-T Mammakarzinom-Mausmodell**“ selbstständig angefertigt habe und mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden. Weiterhin versichere ich, dass ich die zur Erstellung der Dissertationsschrift verwendeten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Florian Wegwitz