

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Tumorbilogie

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Prognostische Relevanz der 15-Hydroxyprostaglandinhydrogenase (HPGD) bei Mamma- karzinompatientinnen und Einfluss der Herunterregulation auf das Migrationsverhalten von Brustkrebszellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Johannes Reemts
aus Norden

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 21.02.2013

Veröffentlichung mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. H. Wikman-Kocher

Prüfungsausschuss, 2. Gutachterin: PD Dr. H. Schwarzenbach

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Histopathologie	2
1.1.3 TNM-Klassifikation	3
1.1.4 Weitere histopathologische Merkmale	5
1.1.5 Therapie	6
1.1.6 Prognose	8
1.2 Progression des Mammakarzinoms	9
1.2.1 Krebsentstehung	9
1.2.2 Mehrschrittkarzinogenese	12
1.2.3 Metastatische Kaskade	14
1.2.4 Minimale residuelle Krebserkrankung	15
1.3 HPGD	16
1.3.1 Allgemeiner Signalweg	16
1.3.2 Krebsentstehung und der COX-2/PGE ₂ -Signalweg	17
1.3.3 Krebsentstehung und HPGD	18
1.4 Migrations-Assays	21
1.5 Fragestellung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Untersuchungsmaterial und Patientendaten	24
2.1.2 Materialien für die Zellkultur	25
2.1.2.1 Zellen	25
2.1.2.2 Standardzellkulturmedium	25
2.1.2.3 Kollagen-Matrix-Mix	26
2.1.2.4 Weitere Materialien und Medien	26
2.1.3 Materialien für molekularbiologische Methoden	27
2.1.3.1 RNA-Extraktions-Kit	27
2.1.3.2 cDNA-Synthese-Kit	28
2.1.3.3 PCR-Primer und -Fertiglösungen	28
2.1.4 Materialien für immunologische Methoden	29
2.1.4.1 Detection-Kit	29
2.1.4.2 Primärantikörper	29
2.1.4.3 Weitere Materialien	29

2.1.5	Chemikalien	30
2.1.6	Lösungen	30
2.1.7	Geräte	31
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.9	Software	34
2.1.10	Hardware	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Zellkulturmethoden	35
2.2.1.1	Standardzellkulturmethoden	35
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen	35
2.2.1.3	siRNA-Transfektion	35
2.2.1.4	Zell-Migrations-Assay	36
2.2.1.5	Herstellung von Zytospins	39
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.2.1	RNA-Extraktion	40
2.2.2.2	RNA-Konzentrationsmessung	41
2.2.2.3	cDNA-Synthese	41
2.2.2.4	Quantitative Realtime-PCR (qPCR)	42
2.2.3	Immunologische Methoden	44
2.2.3.1	Immunhistochemische Färbung (IHC)	44
2.2.3.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbung (IHC)	46
2.2.3.3	Immunfluoreszenzfärbung	47
2.2.4	Herstellung eines Gewebe-Microarrays	48
2.2.5	Statistik	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Nachweis der HPGD-Proteinexpression in Brustkrebsgewebe	51
3.1.1	Patientenkollektiv und immunhistochemische Färbung	51
3.1.2	HPGD-Expression: Korrelation mit klinischen Parametern	55
3.1.3	HPGD-Expression und der weitere Krankheitsverlauf	60
3.2	Migrationsverhalten von Brustkrebszelllinien mit reduzierter HPGD-Expression	65
3.2.1	Immunfluoreszenzfärbung	65
3.2.2	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	67
3.2.3	Quantitative Realtime-PCR	68
3.2.4	Einzelzell-Migrations-Assay	70
3.2.5	Statistische Auswertung	72
4	Diskussion	78

5	Zusammenfassung	87
6	Anhang	89
6.1	Einzelzell-Migrations-Assay: Ergebnisse der Einzel- experimente	89
6.2	Wissenschaftliche Veröffentlichung	92
7	Abkürzungsverzeichnis	93
8	Literaturverzeichnis	96
9	Danksagung	106
10	Lebenslauf	107
11	Eidesstattliche Erklärung	108

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Brustkrebs ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau (Silva 2007) und ist mit weltweit mehr als 350.000 Todesfällen pro Jahr bei Frauen die häufigste Tumor-Todesursache (Schmitt et al. 1999). Durchschnittlich wird jede achte Frau irgendwann in ihrem Leben an Brustkrebs erkranken (Bühling et al. 2004). Von den weltweit im Jahr 2002 geschätzten 1,5 Millionen neuen Fällen traten ca. 590.000 in Nordamerika und Europa auf (Silva 2007). In Nordamerika ist weltweit die höchste Inzidenz (99,4/100.000) für Mammakarzinome vorhanden. Sie ist dort 4 bis 5 mal höher als in Afrika oder Asien. In den industrialisierten Ländern zeigt sich außerdem eine steigende Inzidenz, die Anzahl der Erkrankungsfälle nimmt dort entsprechend zu (Taylor et al. 2001, Giersiepen et al. 2005). Diese Zahlen unterstreichen die zunehmende Bedeutung von Brustkrebs in unseren Breiten.

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist nicht bekannt, es existieren jedoch verschiedene Risikofaktoren, die bei seiner Entstehung eine Rolle zu spielen scheinen. Diese sind Alter der Patientin bei Diagnosestellung, Alter bei Menarche und Menopause, eine späte erste Schwangerschaft oder eine geringe Anzahl an Schwangerschaften sowie das Erhalten einer Hormonersatztherapie (Giersiepen et al. 2005, Armstrong et al. 2000, Trichopoulos et al. 1972). Aus diesem Grund wird die Indikation zur Hormonersatztherapie inzwischen strenger gestellt (Rossouw et al. 2002). Es existieren weitere Lebensstilfaktoren wie Alkoholkonsum, Rauchen, Übergewicht und geringe körperliche Aktivität, die Einfluss auf das Brustkrebsrisiko ausüben (Smith-Warner et al. 1998, Ursin et al. 1995).

Eine genetische Disposition liegt bei ca. 5 bis 10% der Patientinnen vor. Es wurden zwei Gene entdeckt, die das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken stark erhöhen. Es handelt sich um die DNA-Reparaturgene *BRCA1* und *BRCA2*. Frauen mit einer *BRCA1*-Mutation haben ein 80 bis 95%iges Risiko, in ihrem Leben an Brustkrebs zu erkranken (Antoniou et al. 2003). Trägerinnen eines mutierten *BRCA2*-Gens haben ein Lebenszeitrisiko von 40 bis 70%, ein Mammakarzinom zu bekommen (Antoniou et al. 2003). Ca. 15 bis 45% der vererbten Mammakarzinome werden durch Mutationen im *BRCA1*-Gen hervorgerufen (Martin und Weber 2000). Die

restlichen erblichen Mammakarzinome werden durch Mutationen in anderen Genen wie *p53* und *PTEN* verursacht (Martin und Weber 2000).

1.1.2 Histopathologie

Die beiden häufigsten histologischen Formen des Mammakarzinoms sind das duktales (Tumorgewebe ähnelt dem Milchgangepithel) sowie das lobuläre Karzinom (Tumorgewebe ähnelt den Drüsenläppchen). Es werden abhängig von ihrer Wachstumstiefe invasive und nicht-invasive Karzinome (*In-situ*-Karzinome) unterschieden. Daraus ergeben sich als invasive Formen das invasiv-duktales und das invasiv-lobuläre Karzinom sowie die nicht-invasiven Formen duktales Carcinoma in situ (DCIS) und lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) (Wilmanns et al. 2000, Krams et al. 2010). Ein häufig beobachtetes Phänomen ist die Heterogenität der Tumoren hinsichtlich ihrer Invasivität. Während ein Teil des Tumors die Eigenschaften eines LCIS besitzt und entsprechend nicht-invasives Wachstum zeigt, wachsen andere Teile invasiv in das umgebende Gewebe ein.

Invasiv-duktales Karzinome können entweder durch ein DCIS/LCIS begleitet werden oder ohne sie auftreten. Sie machen ca. 80% aller Mammakarzinome aus und sind typischerweise tastbar sowie radiologisch sichtbar. Invasiv-lobuläre Karzinome (ca. 10% der Mammakarzinome) hingegen sind meist radiologisch sowie makroskopisch nur schwer vom restlichen Gewebe zu unterscheiden. Dabei wachsen die Tumorzellen meist einzeln oder in langgezogenen Verbänden in das umliegende Gewebe ein. Einer der Gründe für dieses Verhalten wird im Funktionsverlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin gesehen (Wilmanns et al. 2000, Krams et al. 2010).

Es existieren weitere morphologische Varianten des Mammakarzinoms wie medullär, muzinös und papillär. Diese spielen jedoch auf Grund ihres geringen Anteils an der Gesamtzahl der malignen Mamma-Tumoren eine untergeordnete Rolle.

Um über die Lokalisation genaue Angaben machen zu können, wird die Brust in vier Quadranten sowie den zentralen Mammillenbereich eingeteilt. Die meisten Tumoren finden sich im oberen, äußeren Quadranten (ca. 55%) (Stauber und Weyerstahl 2007).

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Mammakarzinome ist das Phänomen der Multizentrität. Treten mehrere Karzinome zeitgleich in verschiedenen Quadranten der Brust auf, so handelt es sich um multizentrische Karzinome.

1.1.3 TNM-Klassifikation

Zur Einordnung der Patientinnen in das optimale Therapieschema sowie zum Abschätzen der Prognose hat sich die TNM-Klassifikation durchgesetzt (Wittekind und Meyer 2010). Es handelt sich dabei um eine klinische Klassifikation. Der Status von Tumor (T), Lymphknoten (N) und Metastasen (M) wird angegeben.

Um Tumoren einzelnen Kategorien zuordnen zu können, werden nach der klinischen Untersuchung (Inspektion, Palpation) bildgebende Verfahren eingesetzt (Mammographie, Mammasonographie). Außerdem wird zur Einordnung in die klinische TNM-Klassifikation per Feinnadelbiopsie eine Gewebeprobe entnommen. Anhand dieser Probe lassen sich Eigenschaften wie Malignität und Histologie abschätzen.

Für die lokale Tumorausbreitung (T) spielt die Größe des Tumors eine entscheidende Rolle. Der regionäre Lymphknotenstatus (N) wird maßgeblich durch die Lokalisation der befallenen Lymphknoten bestimmt. Das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) kann durch die Angabe des Ortes spezifiziert werden. In Tabelle 1.1 sind die Kriterien der TNM-Klassifikation dargestellt.

Nach der chirurgischen Entfernung und pathologischen Untersuchung des Primärtumors und der umgebenden Lymphknoten, also *nach* einer möglichen Operation können die Tumoren in die genauere pathologische Klassifikation pTNM eingeordnet werden. Außerdem wird das histopathologische Grading nach Elston und Ellis durchgeführt (Elston und Ellis 1991).

Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

<i>T - Primärtumor</i>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder kleiner in größter Ausdehnung
- T1a	0,1 - 0,5 cm
- T1b	0,5 - 1 cm
- T1c	1 - 2cm
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht größer als 5 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
T4	Tumor jeder Größe mit Ausbreitung auf Haut oder Brustwand
- T4a	Ausdehnung auf die Brustwand
- T4b	Ödem oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut
- T4c	4a und 4b sind zutreffend
- T4d	Entzündliches Karzinom (diffuse braune Induration der Haut)
<i>N - Regionäre Lymphknoten</i>	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z.B. nicht entnommen oder bereits entfernt)
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten (Level I + II)
N2	
- N2a	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten (Level I+II), die untereinander oder an andere Strukturen fixiert sind
- N2b	Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (möglicher Nachweis durch Feinnadelaspiration) ohne axillären Lymphknotenbefall
N3	
- N3a	Metastase(n) in infraklavikulären Lymphknoten
- N3b	Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axillären Lymphknotenbefall
- N3c	Metastase(n) in supraklavikulären Lymphknoten
<i>M - Fernmetastasen</i>	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1.1.4 Weitere histopathologische Merkmale

Durch weitere Untersuchungstechniken wie die immunhistochemische Anfärbung werden zusätzlich zum pTNM-Status andere histopathologische Merkmale analysiert. So werden der Östrogen- sowie Progesteronrezeptorstatus (ER/PR) sowie der HER2/ERBB2-Status bestimmt.

Der Estrogenrezeptor (ER) besitzt besondere klinische Bedeutung. Es handelt sich um einen Steroidrezeptor für Östrogene. Er bildet nach der Aktivierung durch einen Liganden ein Homodimer mit einem zweiten Rezeptor. Dieser Komplex kann im Zellkern die Transkription von Genen aktivieren, die häufig mit Tumorprogression assoziiert sind. Etwa 2/3 der Mammatumoren zeigen eine erhöhte Expression des Estrogenrezeptors (Al-Kuraya et al. 2004). Patientinnen mit ER/PR-überexprimierenden Tumoren haben durchschnittlich eine bessere Prognose als ER/PR-negative Patientinnen. Es existieren verschiedene Wirkstoffe, die eingesetzt werden, um die Wirkungen von Östrogen zu verringern. Tamoxifen ist ein kompetitiver Antagonist des Östrogens am Estrogenrezeptor und verhindert so die Weitergabe des Östrogensignals (Russo und Russo 2004). Tamoxifen gehört zu den Standardmedikamenten der adjuvanten endokrinen Therapie bei Patientinnen mit ER/PR-positiven Tumoren.

Auch bei HER2/ERBB2 handelt es sich um einen Rezeptor. Er stammt aus der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Genfamilie (ERBB1-4). Diese Genfamilie codiert für Transmembranrezeptoren mit intrazellulärer Tyrosinkinasedomäne. Die anderen Rezeptoren aus der Familie binden extrazelluläre Liganden wie EGF und TGF- α und vermitteln deren Wirkungen ins Zellinnere. HER2/ERBB2 hingegen bindet keinen Liganden. Es kann mit den anderen monomeren Rezeptoren der Genfamilie Heterodimere bilden und dadurch Signale in die Zelle vermitteln. Durch erhöhte Rezeptordichte auf der Zelle bilden sich bei geringeren EGF-Konzentrationen im Extrazellularraum bereits aus EGF-Rezeptor und HER2/ERBB2 bestehende Heterodimere mit Einfluss auf die Signalwege in der Zelle. Bei ca. 25 bis 30% der Mammakarzinome findet sich eine Amplifikation des HER2/ERBB2-Gens. Patientinnen mit Überexpression von HER2/ERBB2 haben durchschnittlich eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit und eine schlechtere Prognose. Um die Wirkung der erhöhten HER2/ERBB2-Dichte auf den Zellen zu antagonisieren, wurde ein Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des HER2/ERBB2-Wachstumsfaktorrezeptors entwickelt. Herceptin (Trastuzumab) verhindert auf diesem Weg die Signaltransduktion von HER2/ERBB2 (Wagener und Müller 2010). Ein weiterer eingesetzter Antikörper ist Cetuximab. Er unterbindet die Signaltransduktion des ERBB1 (Humblet 2004).

Durch den Nachweis des Proteins Ki-67 lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl der Zellteilungen ziehen. Lässt es sich in untersuchten Geweben verstärkt nachweisen, so deutet dies auf eine hohe mitotische Aktivität hin und ist aus diesem Grund mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Gerdes et al. 1984). Es gibt viele weitere histopathologische Parameter (z.B. uPA), deren Nachweis nicht in allen Fällen durchgeführt wird.

Um die optimale Therapie und die Prognose von Patientinnen bei Diagnosestellung genauer abschätzen zu können, werden die Patientinnen in Gruppen eingeteilt, die sich hinsichtlich dieser Parameter gleich verhalten und aus diesem Grund die gleiche Therapie erhalten.

Ein Versuch, diese Unterscheidung zu erreichen, findet durch die cDNA-Microarray-Technologie statt. Sie ermöglicht es, die relative Genexpression von mehreren Tausend Genen zu bestimmen. Anhand dieser Analyse werden fünf Genexpressionsmuster unterschieden (Perou et al. 2000). Die Tumoren werden den folgenden Gruppen zugeordnet:

- HER2/ERBB2-positiv
- ER-positiv Luminal A
- ER-positiv Luminal B
- Basal (ER/PR-negativ, HER2-negativ, inklusive BRCA1-mutierte Kazinome)
- normaler Typ

Die einzelnen Gruppen werden durch ein bestimmtes Gen-Überexpressionmuster charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass die Zuordnung zu den Gruppen eine genauere Abschätzung der Prognose ermöglicht (Veer et al. 2002).

Durch die verschiedenen Analysemethoden und Untersuchungstechniken sowie die Einordnung in die pTNM-Nomenklatur wird eine individuelle Therapie angestrebt, die im Einzelfall eine Kombination aus maximaler Tumor-bekämpfender Wirkung mit minimalen Nebenwirkungen ermöglichen soll.

1.1.5 Therapie

Die Therapieoptionen sind wie bei den meisten anderen malignen Tumoren die chirurgische Entfernung, Bestrahlung sowie zytostatische und hormonelle Therapie als auch eine Kombination dieser Komponenten. Bei Brusttumoren spielt die chirurgische Entfernung die wichtigste Rolle.

Im Zentrum der operativen Therapie bei Mammakarzinompatientinnen existieren zwei verschiedene Gruppen von Operationsarten: Die Mastektomie und die brusterhaltende Therapie. Diese teilen sich wiederum in Untergruppen auf.

Bei der Mastektomie werden meist große Teile der Brust entfernt. Sie kann unter anderem radikal (Entfernung der kompletten Brust inklusive Mm. pectorales) oder modifiziert radikal (Entfernung der Brust unter Schonung der Mm. pectorales) durchgeführt werden.

Als brusterhaltende Therapien werden Lumpektomie (Tumorentnahme mit freien Absetzungsrändern) oder Quadrantektomie (En-bloc-Entnahme mit ~3cm Sicherheitsabstand) bezeichnet. Welche Operation durchgeführt wird und welche weiteren Behandlungsschritte sich anschließen, hängt maßgeblich vom TNM-Status der betroffenen Patientin ab.

In der Operation wird der vorher markierte Sentinel-Lymphknoten (*deutsch*: Wächterlymphknoten) entnommen und untersucht. Es handelt sich um den ersten Lymphknoten im Lymphabflussgebiet des Tumors. Er wird präoperativ mit einem Farbstoff oder Radionuklid markiert. Erweist er sich als tumorfrei, kann auf eine komplette Lymphonodektomie verzichtet werden. Finden sich jedoch Tumorzellen im Sentinel-Lymphknoten, wird die Lymphonodektomie durchgeführt. Üblicherweise werden per Axilladisektion die Lymphknoten der Level I und II als Pakete entnommen (Stauber und Weyerstahl 2007).

Die Sentinel-Lymphknoten-Technik wird durchgeführt, wenn Einschlusskriterien wie z.B. histologisch/zytologisch gesichertes Mammakarzinom, keine Hinweise auf axilläre Lymphknotenmetastasen und technische Aspekte erfüllt werden und Ausschlusskriterien wie z.B. Multizentrität, Multifokalität oder Metastasen nicht zutreffen (Stauber und Weyerstahl 2007).

Nach der Operation wird bei den meisten Patientinnen eine postoperative Bestrahlung durchgeführt um lokale Rezidive zu verhindern (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). So senkt die Bestrahlung das Risiko für ein lokoregionäres Rezidiv um drei Viertel (Whelan et al. 2000) und beträgt danach noch ca. 5 bis 10% (Fowble 1997). Dadurch sinkt auch die Mortalität um ca. 12% (Steene et al. 2000). Die Rezidive befinden sich am häufigsten in supraklavikulären Lymphknoten, der Axilla oder in der Thoraxwand. Häufige Nebenwirkungen wie Lymphödeme oder kardiale Komplikationen werden dabei in Kauf genommen (Recht et al. 2001). Dauer und Art der Bestrahlung richten sich auch hier nach den individuellen Voraussetzungen der Patientin.

Unter adjuvanter Chemotherapie mit Zytostatika versteht man die Chemotherapie, die sich an eine chirurgische Entfernung des Tumors oder an die Bestrahlung anschließt. Das Hauptziel der adjuvanten Chemotherapie besteht in der Eliminierung von Mikrometastasen. Diese stellen eine häufige Todesursache für Brustkrebspatientinnen dar. Es konnte gezeigt werden, dass durch die adjuvante Chemotherapie das Rezidivrisiko um 22% sowie die Gesamtsterberate um 13% gesenkt werden können (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998).

Die neoadjuvante Chemotherapie hingegen wird präoperativ durchgeführt, um die Tumorgroße zu verringern bzw. ein Downstaging des Tumor- und Nodalstatus zu erreichen. So wird in ca. 45% der Fälle eine brusterhaltende Therapie ermöglicht (Mauriac et al. 1999).

Zur Senkung des Rezidivrisikos wird ebenfalls die adjuvante endokrine Therapie durchgeführt. Eingesetzte Mittel sind Tamoxifen (kompetitive Hemmung der Östrogenrezeptoren) und Trastuzumab (monoklonaler Antikörper gegen HER2/ERBB2) (Herdegen 2008, Karow und Lang-Roth 2008) (s.1.1.4.). So senkt Tamoxifen nach 5-jähriger Anwendung bei Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiven Tumoren die jährliche Todesrate um ca. 31% und das Rezidivrisiko nach 15 Jahren um ca. 12% (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005). Allgemeine Voraussetzung der endokrinen Therapien ist, dass die behandelten Patientinnen einen Tumor haben, der die entsprechenden Rezeptoren überexprimiert.

Welche Therapieoptionen zum Einsatz kommen, wird anhand der individuellen Eigenschaften der Patientin entschieden. Entscheidend sind Faktoren wie TNM-Klassifikation und Grading des Tumors, Hormonrezeptorstatus (ER/PR), HER2/ERBB2-Status und Genexpressionsmuster des Tumors sowie der Allgemeinzustand der Patientin.

1.1.6 Prognose

Die Prognose hängt maßgeblich vom Lymphknotenstatus ab. Während Patientinnen, bei denen kein axillärer Lymphknoten befallen ist eine 10-Jahres-Überlebensrate von 65 bis 80% haben, beträgt dieser Wert bei Patientinnen mit mehr als vier befallenen Lymphknoten 13 bis 24% (Valagussa et al. 1978).

Man geht davon aus, dass durch zytostatische sowie hormonelle (neo-)adjuvante Therapieansätze die Mortalität um 20 bis 30% gesenkt werden kann (Allred und Swanson 2000). Die Reduktion der Gesamtsterblichkeit ist dabei nicht ganz so groß, weil durch das oft höhere

Lebensalter der Patientinnen bedingt auch andere Todesursachen, die nicht in einem kausalen Zusammenhang mit der Krebserkrankung stehen, eine wichtige Rolle spielen können.

Bei allen Behandlungsoptionen ist zu beachten, dass sie mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sind, die die Lebensqualität der Patientinnen erheblich einschränken können. Außerdem sprechen die einzelnen Patientinnen unterschiedlich stark auf die Therapien an. Deshalb sollten Patientinnen im Optimalfall ein Chemotherapie-Schema erhalten, das bei ihnen die größten Heilungschancen hat und wenige Nebenwirkungen mit sich bringt. Aufgrund der hohen und steigenden Anzahl an Therapiemöglichkeiten ist es erstrebenswert, bereits vor Beginn der Therapie einschätzen zu können, welche Patientinnen von welcher Therapie am meisten profitieren werden. Obwohl vielfältige Therapieansätze existieren ist die Mortalitätsrate weiterhin hoch. Besonders Patientinnen, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen vorhanden sind, haben eine niedrige Überlebenschance. Dies ist nicht zuletzt auf die großen Unterschiede der Brusttumoren untereinander zurückzuführen. Sie sind so individuell, dass eine wichtige Aufgabe der Medizin sein wird, alle Eigenschaften zu erkennen und für jede mögliche Kombination die optimale Therapie evidenzbasiert erforscht zu haben und anbieten zu können. Die Variabilität der Brusttumoren untereinander ist ein bisher ungelöstes und wenig verstandenes Problem (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

1.2 Progression des Mammakarzinoms

1.2.1 Krebsentstehung

Krebs ist eine Krankheit, die durch Veränderungen des Genoms hervorgerufen wird. Damit aus einer gesunden Körperzelle eine Krebszelle entstehen kann, muss sie verschiedene Stadien der klonalen Evolution durchwandern. Dieses Modell der Tumorentstehung (Nowell 1976) geht von den Grundprinzipien der klassischen darwinistischen Evolutionstheorie aus. Nach diesem Konzept erhält die Ursprungszelle eines Tumors durch ein initiales Ereignis einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen. Dadurch kann diese Zelle expandieren und sich zu einem Klon identischer Zellen entwickeln. Von den Zellen des entstandenen Klons wiederum wird eine Zelle von einem weiteren Ereignis getroffen. Dieses Ereignis verschafft der Zelle erneut einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen. Infolgedessen wird diese Zelle vermehrt expandieren (Merlo et al. 2006). Der Ablauf wiederholt sich so oft,

bis ein Klon selektioniert ist, der sich den Kontrollmechanismen des Wirtes komplett entziehen kann. Es ist auch möglich, dass eine Zelle von einem Ereignis getroffen wird, das einen Nachteil gegenüber den anderen Zellen mit sich bringt. Infolgedessen wird die Zelle zugrunde gehen und die anderen, besser angepassten Zellen werden weiterwachsen.

Die bisher als Ereignisse bezeichneten Veränderungen können durch Mutationen im Genom verursacht werden. Die Mutationen können entweder bereits in der befruchteten Eizelle vorhanden sein (Keimbahnmutation) oder nach dem Eizellstadium auftreten (somatische Mutation). Sie entstehen aus verschiedenen Gründen. Chemische Mutagene (z.B. Tabakrauch) und physikalische Mutagene (z.B. ionisierende Strahlung) sowie biologische Mutagene (z.B. Humanes Papillomavirus, Epstein-Barr-Virus) spielen eine wichtige Rolle (Martin und Gutkind 2009). Die DNA kann ebenfalls durch physiologisch vorkommende Sauerstoffradikale geschädigt werden. Spontane Mutationen wiederum können auf einen Fehler der DNA-Polymerasen zurückzuführen sein. Viele der genannten Mutagene verursachen Krebs und können daher auch als Karzinogene bezeichnet werden.

Die Mutationen lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Auf DNA-Ebene werden Punktmutationen (Austausch einer Base), Insertionen (Einfügen einzelner oder mehrerer Basen), Deletionen (Verlust einzelner oder mehrerer Basen), Duplikationen (Verdopplung eines Gens oder Teilen eines Gens) und Amplifikationen (Vervielfältigung eines Gens oder Genomabschnittes) unterschieden. Sind Abschnitte von Chromosomen oder ganze Chromosomen verändert, so wird dies als Chromosomenmutation bezeichnet (Wagener und Müller 2010).

Betreffen die Mutationen Tumorgene, ist es möglich, dass Krebs entsteht. Damit Tumore verursacht werden, ist das Zusammenwirken mehrerer Tumorgene erforderlich: Kein einzelnes Tumorgen kann alleine Krebs hervorrufen.

Die Tumorgene lassen sich grob in Onkogene/Protoonkogene und in Tumorsuppressorgene unterteilen. In den meisten Fällen handelt es sich um Gene, die hemmend oder fördernd auf die Zellteilung, den Zelltod (Apoptose) oder die Zelldifferenzierung wirken. Sind Gene mit dieser Funktion verändert, können unkontrolliertes Zellwachstum und Tumorentstehung die Folge sein (Rassow 2006).

Onkogene sind Gene, deren Produkte den malignen Prozess aktiv beeinflussen können. Sie entstehen durch Mutationen aus Protoonkogenen. Die Produkte der Onkogene fördern meist die Zellteilung und besitzen durch Mutation eine verstärkte Wirkung. Sie wirken durch den

Zugewinn an Aktivität (Gain of function, GOF) zu lange, am falschen Ort oder zur falschen Zeit. Beispiele für Onkogene sind die BCR/ABL-Translokation bei chronisch myeloischer Leukämie oder die Amplifikation des Her2/ERBB2-Gens bei Brustkrebs. Aus zwei verschiedenen Gründen entstehen bei diesen Beispielen Genprodukte (Tumorproteine) in erhöhten Mengen oder mit erhöhter Aktivität: Durch Umlagerung eines Protoonkogens und daraus resultierender Produktion eines neuen Genprodukts (BCR/ABL) bzw. durch Verlagerung des Protoonkogens in eine Region des Genoms mit höherer Expressionsrate (Her2/ERBB2) (Rasow et al. 2006).

Tumorsuppressorgene hingegen verlieren durch Mutationen ihre Wirkung (Loss of function, LOF). Sie wirken im Gegensatz zu Onkogenen normalerweise hemmend auf die Zellteilung und fördern die Zelldifferenzierung, verlieren diese Funktionen jedoch durch Mutation. Infolgedessen kann sich die Zelle schneller und häufiger teilen. Beispiele sind das p53-Gen und das Retinoblastom-Gen (Knippers 2001).

Nicht nur Mutationen, also Veränderungen der Reihenfolge der Basenpaare im Genom, können die Malignität von Zellen hervorrufen. Der bösartige Phänotyp von Tumorzellen kann ebenfalls durch epigenetische Veränderungen hervorgerufen werden. Dies betrifft all jene vererbaren Veränderungen der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst codiert sind. Durch diese Mechanismen können Gene abgeschaltet und infolgedessen der Phänotyp von Zellen verändert werden (Jones und Baylin 2007). Beispiele für solche Mechanismen sind die DNA-Methylierung sowie die Modifikation von Histonen.

Durch die Methylierung von DNA-Abschnitten können Gene abgeschaltet werden (engl. silencing). In Tumorzellen ist die DNA insgesamt eher hypomethyliert. Die verminderte Methylierung kann zu chromosomaler Instabilität führen (Eden et al. 2003). Einzelne Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotide (sogenannte CpG-Inseln) vor Promotorregionen sind jedoch vermehrt methyliert. Die entsprechenden Gene sind dadurch inaktiv (Jones und Baylin 2002). Handelt es sich bei dem entsprechenden Gen um ein Tumorsuppressorgen, kann dies zur Tumorentstehung beitragen. Dass diese Inaktivierung Wirkungen auf den Phänotyp von Tumorzellen besitzt, zeigt sich durch die Behandlung von Tumorzelllinien mit 5-aza-Cytidin oder verwandten Substanzen. Die DNA-Methylierung wird verringert und die Gene reaktiviert. Verminderte Proliferation, Apoptose und Verlust der Teilungsfähigkeit sind die Folge (Baylin und Ohm 2006).

Auch die Modifikation von Histonen kann Einfluss auf die Prozesse innerhalb der Zelle ausüben (Bernstein et al. 2007). Histone können durch Acetylierung und Methylierung modifiziert werden. Dadurch wird Einfluss auf die Kompaktierung bzw. Entfaltung des Chromatins und infolgedessen auch auf die Expression der betroffenen Gene ausgeübt. Es können die Zelldifferenzierung und die Ausbildung von Zelleigenschaften gesteuert werden (Wagener und Müller 2010).

Es zeigt sich, dass viele verschiedene Mechanismen zur Tumorentstehung beitragen können. Sowohl die beschriebenen genetischen als auch epigenetischen Veränderungen sind in der Lage, Tumoren zu verursachen. Damit aus einer Zelle tatsächlich ein Tumor entstehen kann, müssen jedoch verschiedene Veränderungen gleichzeitig in einer Zelle auftreten.

1.2.2 Mehrschrittkarzinogenese

Das Modell der Mehrschrittkarzinogenese geht davon aus, dass aus einer normalen Epithelzelle durch physiologische und unphysiologische Zellproliferation über das Stadium des Carcinoma in situ ein invasives Karzinom entstehen kann (s. Abb. 1.1). Das von Beckmann und Niederacher entwickelte Modell veranschaulicht diverse Faktoren, die dabei Einfluss auf die Krebsentstehung ausüben. Es wird deutlich, dass die Veränderungen der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden und die Entwicklung eines metastasierten Karzinoms über mehrere Zwischenschritte stattfindet (s. Abb. 1.1).

Die Zellen müssen Eigenschaften wie eine geringe Apoptoserate, Resistenz gegen Kontrollmechanismen des Wirtes sowie die Fähigkeiten zur Selbststimulation mit Wachstumssignalen und zur unbegrenzten Replikation entwickeln. Für die Entstehung von Metastasen ist außerdem die Invasion in andere Gewebe in Form von aktiver Fortbewegung und die Fähigkeit zur Angiogenese eine Grundvoraussetzung (Hanahan und Weinberg 2000).

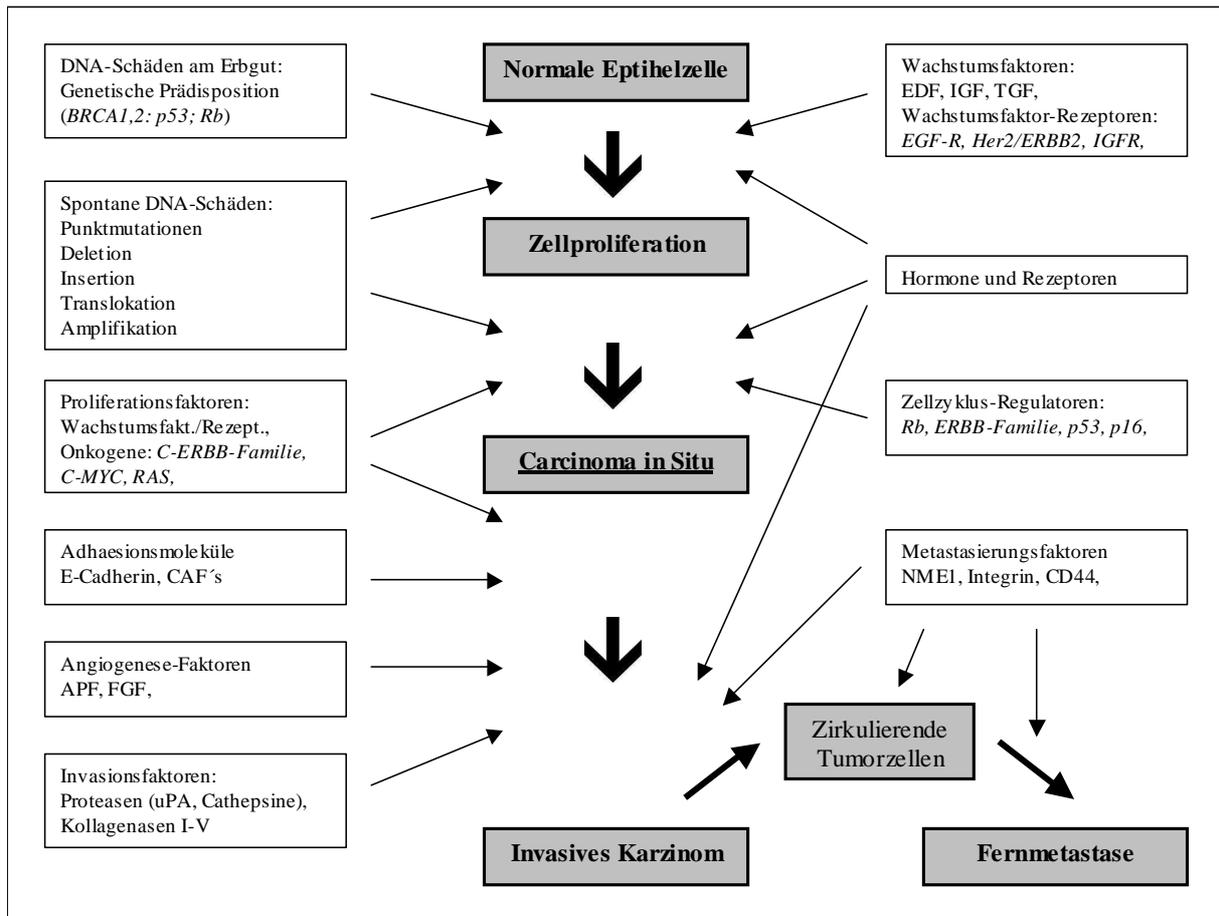


Abb. 1.1: Modell der Mehrschrittkarzinogenese (n. Beckmann und Niederacher 1997)

Ein Beispiel für die Mehrschrittkarzinogenese ist die Adenom-Karzinom-Sequenz bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms (Vogelstein et al. 1988). Vogelstein et al. vermuteten, dass die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome über Stufen genetischer Mutationen aus Adenomen entstehen. Nach diesem Modell entsteht durch Mutationen aus normalem Epithel hyperproliferatives Epithel, das sich weiter zu einem Adenom und später zu einem Karzinom entwickeln kann. Entscheidend ist jedoch die Akkumulation von verschiedenen Mutationen wie Onkogen-Aktivierung und Tumorsuppressorgen-Inaktivierung sowie die daraus entstehende genomische Instabilität (Vogelstein et al. 1988).

Bei bestimmten Tumorentitäten lassen sich die einzelnen Zwischenstufen häufiger beobachten (Kolonkarzinom, Cervixkarzinom). Durch Vorsorgeuntersuchungen und anatomische Gegebenheiten werden dort häufiger Zwischenstadien beobachtet. Beim Brustkrebs kennt man als Vorstufe hauptsächlich das duktales Carcinoma in Situ (DCIS) und das lobuläre Carcinoma in Situ (LCIS). Diese unterscheiden sich vom invasiven Karzinom dadurch, dass sie die Basalmembran als natürliche Grenze respektieren und nicht durchdringen. Das Malignitätskriterium des invasiven Wachstums wird von diesen Vorstufen des invasiven Mammakarzinoms

nicht erfüllt. Ob während der Entstehung eines Mammakarzinoms eine der Vorstufen DCIS oder LCIS durchlaufen werden muss, ist umstritten.

1.2.3 Metastatische Kaskade

Ist ein Karzinom entstanden, besteht die Möglichkeit, dass es metastatische Absiedlungen bildet. Dazu ist eine Kaskade von zusätzlichen Veränderungen der Zellen notwendig, die sie befähigt, Metastasen zu bilden (s. Abb. 1.1).

Mit zunehmendem Wachstum des Primärtumors sinkt ab einer bestimmten Größe die Sauerstoffversorgung der einzelnen Zellen. Infolgedessen findet entweder Gefäßeinsprossung statt oder die Tumorzellen bewegen sich in das umgebende Gewebe. Für die Migration sind dabei zwei Eigenschaften notwendig: die Fähigkeit zur Destruktion der Matrix (z.B. durch Matrix-Metalloproteinasen) und die Invasion. Zur Invasion in benachbarte Gewebe müssen die Zellen sich aktiv fortbewegen. Für die Fortbewegung sind Eigenschaften der Tumorzellen wie Zell-Matrix-Interaktionen, lokale Proteolyse zum Abbau von Adhäsionskontakten und ein dynamischer Umbau des Zytoskeletts erforderlich. Später können die Zellen durch Freisetzung von Botenstoffen wie z.B. VEGF Angiogenese verursachen, um die Neubildung von Blutgefäßen zu initiieren und so besser mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt zu werden (Wagner und Müller 2010).

Der erste Schritt der Metastasierung findet statt, wenn Tumorzellen in Lymphbahnen oder Blutgefäße einwachsen. Sie können sich vom Zellverband lösen und mit dem Blut oder der Lymphe fortgetragen werden. Normalerweise wird in Zellen, die den Substratkontakt verlieren, die Apoptose ausgelöst (Meredith et al. 1993). Befinden sich Tumorzellen frei in der Blutbahn müssen sie deshalb gegen proapoptotische Reize resistent sein. Zusätzlich befinden sich im Blut Zellen des Immunsystems, gegen deren proapoptotischen Signale sich die Tumorzelle ebenfalls schützen muss (Wagner und Müller 2010).

Um die Blutgefäße wieder verlassen zu können, müssen die Tumorzellen Adhärenzkontakte zum Endothel ausbilden oder durch Embolisierung im Kapillarbett hängen bleiben. Sie benötigen die Fähigkeit zur Extravasation (Verlassen des Blutgefäßes) .

Hat die Tumorzelle im Zielorgan das Blutgefäß verlassen, befindet sie sich im Organparenchym und kann durch Proliferation zu einer Metastase auswachsen. Man geht davon aus, dass einzelne Zellen nicht sofort mit der Zellteilung beginnen, sondern sich als Mikrometastasen in einem Latenzzustand befinden, der auch als „Tumor-Dormancy“ bezeichnet wird (Pantel et al. 1999).

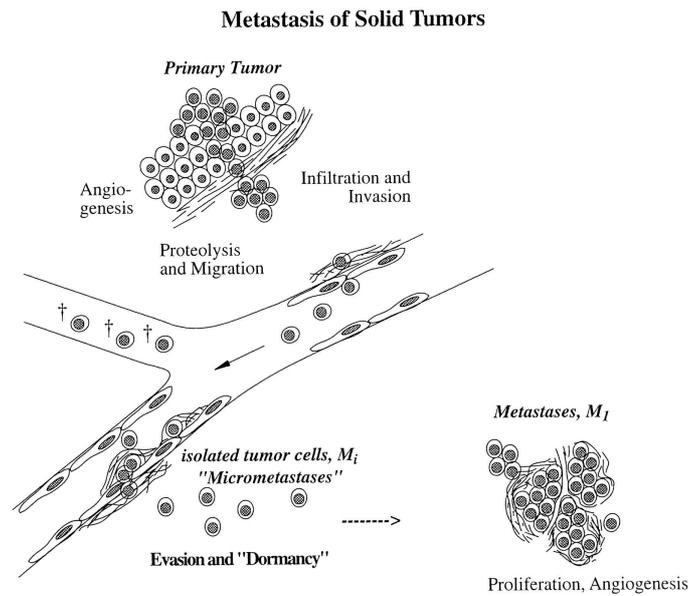


Abb. 1.2: Metastasierungskaskade nach Pantel et al. 1999

1.2.4 Minimale residuelle Krebserkrankung

Die Ausbreitung der Zellen über das Blut (Disseminierung) kann bei Krebserkrankungen bereits in frühen Stadien stattfinden. Durch technische Entwicklungen wurde es möglich, einzelne Krebszellen im Knochenmark und im Blut zu detektieren. Es stellte sich heraus, dass bereits Jahre vor dem Nachweis einer soliden Metastase einzelne Tumorzellen gefunden werden konnten. Existieren einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark, so wird dies als minimale residuale Krebserkrankung bezeichnet (Pantel et al. 2008). Entscheidend ist, dass beim Mammakarzinom der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark einen unabhängigen Prognosefaktor für ein kürzeres rezidivfreies Intervall und eine kürzere Gesamtüberlebenszeit darstellt (Braun et al. 2005). Die Zellen können über Jahre im Latenzzustand der „Tumor-Dormancy“ verharren und erst später aktiviert werden. Welche Mechanismen für die Aktivierung notwendig sind, ist Gegenstand intensiver Forschung (Wikman et al. 2008).

1.3 HPGD

1.3.1 Allgemeiner Signalweg

Die 15-Hydroxyprostaglandinhydrogenase (HPGD) ist ein 29 kD großes Enzym, das als Homodimer im Cytoplasma vorliegt. Es ist in den Abbau von Prostaglandin E₂ (PGE₂) involviert (s. Abb. 1.3). HPGD inaktiviert PGE₂ durch Oxidation der 15-Hydroxy-Gruppe zu einer Keto-Gruppe. Das entstandene Produkt besitzt eine sehr viel geringere Wirkung als die Ausgangssubstanz (Tai et al. 2006).

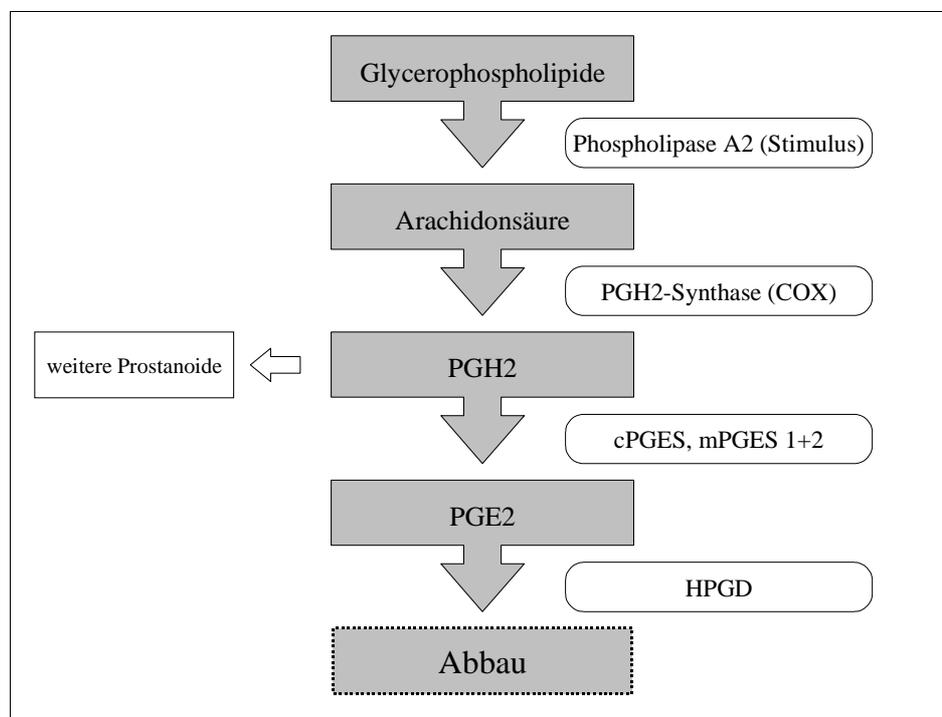


Abb. 1.3: Synthese und Abbau von Prostaglandin E₂

Die Phospholipase A2 katalysiert die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden in der Zellmembran. Die entstandene Arachidonsäure wird anschließend durch die PGH₂-Synthase zu Prostaglandin H₂ umgewandelt. Das Enzym PGH₂-Synthase ist besser bekannt unter dem Namen Cyclooxygenase (COX). Das entstandene PGH₂ wird weiter zu Prostanoiden (Thromboxane, Prostacycline und Prostaglandine, z.B. PGE₂) umgesetzt (Harris et al. 2005). Die Umwandlung in Prostaglandin E₂ findet durch Prostaglandin E₂-Synthasen statt (Samuelson et al. 2007). Das entstandene PGE₂ entfaltet seine unterschiedlichen Wirkungen.

Hat es seine Effekte verursacht, kann PGE_2 durch die 15-Hydroxyprostaglandin-dehydrogenase (HPGD) abgebaut werden.

Die Wirkungen von PGE_2 auf den Organismus sind vielfältig. Sie werden durch vier verschiedene PGE_2 -Rezeptoren (EP1-4) vermittelt (Samuelson et al. 2007). Es handelt sich dabei um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Je nach Subtyp aktivieren oder inhibieren die Rezeptoren die Adenylatzyklase oder sie erhöhen die cytosolische Calciumkonzentration. So werden durch den gleichen Reiz (Veränderung des Prostaglandin E2-Spiegels) unterschiedliche Reaktionen hervorgerufen (Rassow et al. 2006).

Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Entzündung, Fieber und Schmerz. So verursachen sie eine Erweiterung der Gefäße (Vasodilatation) und über die Erhöhung der Permeabilität der Kapillaren eine Schwellung und Rötung des betroffenen Areals. Über das Herabsetzen der Aktivierungsschwelle für Tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle zum einen und über die Stimulation der Weiterleitung von Schmerzreizen im Rückenmark und Gehirn zum anderen wird das Schmerzempfinden erhöht. Des Weiteren wird über EP3-Rezeptoren im Hypothalamus die Körpertemperatur hochgeregelt, es entsteht Fieber (Koolmann und Röhm 2009, Rassow et al. 2006).

Um den Spiegel an Prostaglandinen zu senken und so Entzündungen zu hemmen, Schmerzen zu lindern und Fieber zu senken werden COX-Hemmer (z.B. Acetylsalicylsäure) eingesetzt. Durch Hemmung der COX (PGH_2 -Synthase) entsteht weniger Prostaglandin H_2 , das die Vorstufe der Prostaglandine darstellt (s. Abb. 1.3).

Prostaglandine spielen zusätzlich eine wichtige Rolle für die Schleimsekretion im Magen und die Durchblutung der Nieren. Sie besitzen im Körper viele weitere physiologische Funktionen (Koolmann und Röhm 2009, Rassow et al. 2006).

1.3.2 Krebsentstehung und der COX-2/ PGE_2 -Signalweg

Damit aus einer gesunden Körperzelle eine Krebszelle entstehen kann, muss diese bestimmte Eigenschaften, die notwendig für die Tumorentwicklung sind, verändern. Zu diesen Eigenschaften zählen Verhinderung der Apoptose, Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Förderung der Angiogenese und Metastasierung. Der beschriebene COX-2/ PGE_2 -Signalweg hat Einfluss auf viele dieser Eigenschaften (Greenhough et al. 2009).

Erste Vermutungen, dass COX-2 die Apoptose beeinflussen könnte, entstanden, als dessen forcierte Überexpression zu höheren Spiegeln an überlebensfördernden Proteinen (BCL-2) und erhöhter Resistenz gegenüber proapoptischen Reizen führte (Tsujii und DuBois 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des EP4-Rezeptors zur Unterdrückung der Apoptose führte. Infolgedessen lässt sich davon ausgehen, dass über den COX-2/PGE₂-Signalweg die Apoptose gehemmt werden kann (Greenhough et al. 2009, Wang und DuBois 2006, Hawcroft et al. 2007). Tumorangiogenese kann durch die von COX-2 induzierte Produktion von VEGF hervorgerufen werden.

Die Selbststimulation mit Wachstumssignalen findet durch PGE₂ statt, das autokrin den PI3-Kinase- und MAP-Kinase-Signalweg aktivieren kann. Des Weiteren verursacht die Aktivierung der PGE₂-Rezeptoren EP1, EP2 und EP4 eine Aktivierung des EGFR-Signalweges (Wu et al. 2010). Alle diese Signalwege vermitteln wachstumsstimulierende Signale.

Einige Studien haben gezeigt, dass PGE₂ die Reorganisation des Cytoskeletts und dadurch die Migration von Krebszellen fördert. Dies ist eine essentielle Fähigkeit, die Tumorzellen erlangen müssen, um Metastasen bilden zu können (Hanahan und Weinberg 2000).

Es zeigt sich, dass viele der erforderlichen Eigenschaften, die eine Zelle zur Entwicklung von Malignität benötigt, vom COX-2/PGE₂-Signalweg beeinflusst werden können.

Da potente COX-Hemmer bereits vorhanden sind, untersuchte man die Wirkung dieser Arzneimittel auf die Rate der Malignome. Man fand heraus, dass das Risiko, bestimmte Tumoren zu bekommen, gesenkt werden kann, wenn die Probanden COX-Hemmer einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko, einen Tumor in Magen, Darm, Ösophagus, Prostata, Lunge oder in der Brust zu entwickeln, reduziert ist (Wang und DuBois 2006). Das Risiko, Darmkrebs zu bekommen, reduzierte sich beispielsweise durch die regelmäßige Einnahme von COX-Hemmern über 10-15 Jahre um 40 bis 50% (Smalley und DuBois 1997). Infolgedessen stellte sich die Frage, ob man die vermeintlich nebenwirkungsarmen selektiven COX-2-Hemmer präventiv verschreiben sollte. Aufgrund der erhöhten Rate an kardiovaskulären Ereignissen unter COX-2-Hemmer-Einnahme wurde dieser Gedanken jedoch verworfen (Bresalier et al. 2005).

1.3.3 Krebsentstehung und HPGD

Wie bereits dargestellt, konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass die COX und speziell deren Produkt PGE₂ in verschiedenen Tumoren vermehrt vorhanden sind. Die erhöhte Menge an PGE₂ führte man auf die vermehrte Synthese dieser Substanz zurück (Tai et al. 2007). Es ist jedoch auch möglich, dass durch geringeren Abbau der Substanz erhöhte Spiegel verur-

sacht werden. HPGD ist für den Abbau von PGE₂ unerlässlich und könnte dadurch Einfluss auf die Entstehung von Tumoren besitzen.

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die Menge an HPGD in Tumor-Gewebeproben häufig stark variiert. Sie war in 61% der nicht-kleinzelligen Lungentumoren im Vergleich zu umgebendem nichtmalignem Gewebe auf RNA-Ebene mehr als 10-fach verringert (n=19) (Ding et al. 2005). Des Weiteren fanden sich in 85% (n=23) der kolorektalen Tumorproben geringere HPGD-Mengen als im gesunden Gewebe (Backlund et al. 2005).

Mit Hilfe von Transfektions-Assays konnte außerdem gezeigt werden, dass die stabile Hochregulation von HPGD in MDA-MB-231-Zellen dazu führte, dass diese Zellen nach der Implantation in Mäuse häufiger die Fähigkeit verloren, Tumoren zu bilden. Die vorübergehende Hochregulation verursachte vermindertes klonales Wachstum (Wolf et al. 2006). Verschiedene Arbeiten kommen also zu dem Ergebnis, dass in Tumorzellen verschiedener Entität die Menge an HPGD verringert ist (Ding et al. 2005, Wolf et al. 2006, Backlund et al. 2005).

Im Gegensatz dazu stellte sich jedoch bei der Untersuchung von Prostatakarzinomen heraus, dass HPGD in metastasierten Tumoren auf hohem Niveau exprimiert wird (Vainio et al. 2011). In einer Untergruppe der Tumorproben war die HPGD-mRNA-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant erhöht, obwohl die durchschnittliche HPGD-mRNA-Expression unverändert war. Des Weiteren konnte Vainio zeigen, dass das Wachstum der Prostatakrebszelllinie LNCaP von der HPGD-Expression abhängt (Vainio et al. 2011).

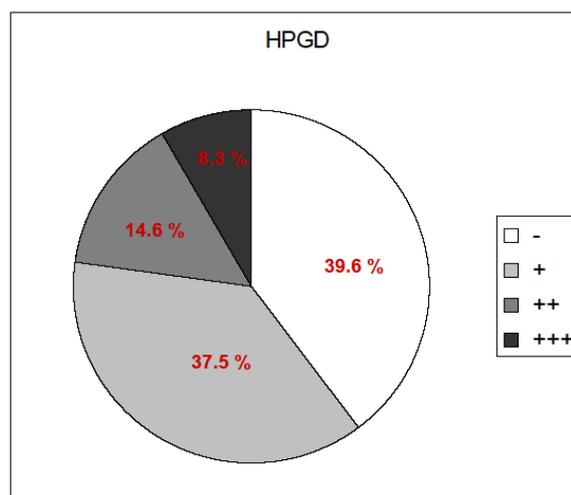


Abb. 1.4: Färbeintensität der Prostataumorproben (Lehtinen et al. 2012)

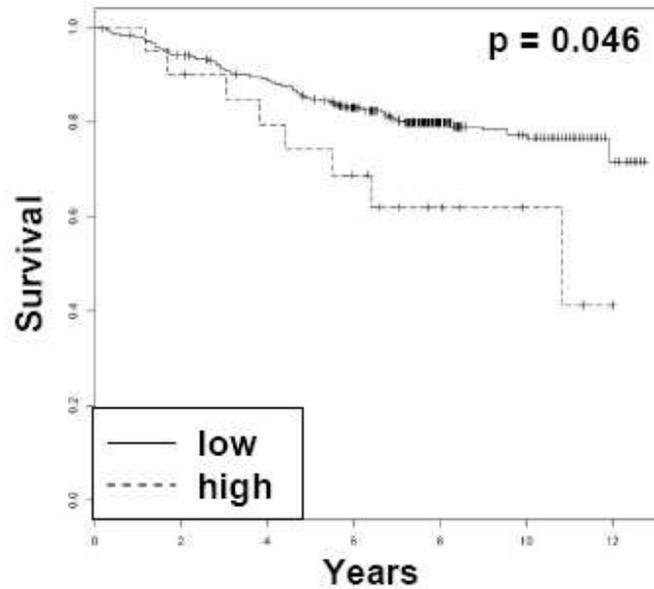


Abb. 1.5: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Brustkrebspatientinnen. Die Patientinnen wurden anhand der HPGD-Expression in zwei Gruppen eingeteilt (low und high) (Lehtinen et al. 2012)

Im Anschluss daran von Lehtinen durchgeführte *In-silico*-Genexpressionsanalysen kamen zum gleichen Ergebnis (Lehtinen et al. 2012). Es fanden sich mehrere Tumor-Typen (z.B. Brustkrebs), bei denen ein Teil der Proben sehr hohe Mengen an HPGD exprimierten. Die hohe HPGD-Expression war mit einer schlechten Prognose assoziiert.

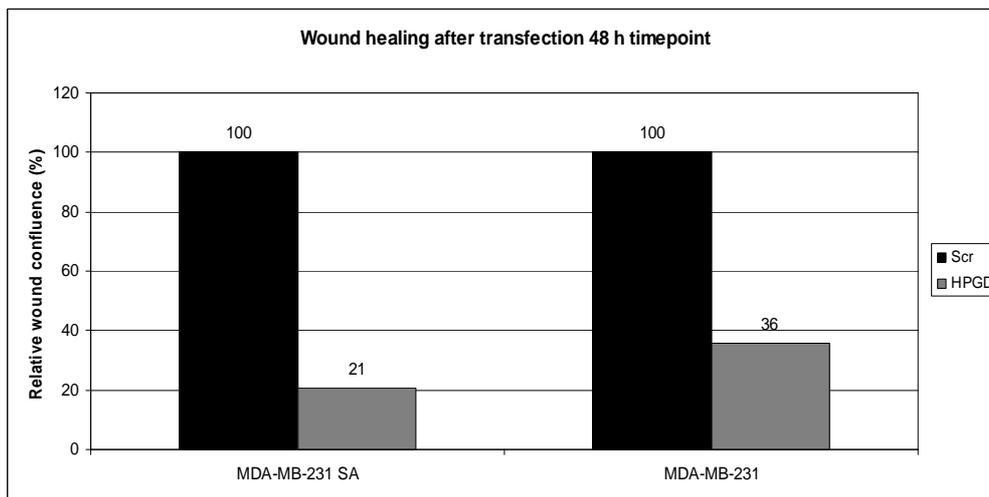


Abb. 1.6: Wundheilungsassay-Ergebnisse: Die kombinierte Proliferations- und Migrationsfähigkeit der Zellen wird untersucht. Die eingesetzten Zellen (MDA-MB-231 (SA) und MDA-MB-231) wurden entweder mit HPGD-siRNA („HPGD“) oder scrambled-RNA („Scr“) transfiziert. (Lehtinen et al. 2012)

Zusätzlich wurde die Migrations- und Proliferationsfähigkeit von Brustkrebszellen mit unterschiedlichen HPGD-Leveln per Wundheilungsassay untersucht. Es sollten Erkenntnisse über die Funktion und Wirkung von HPGD gewonnen werden. Es stellte sich heraus, dass die Fähigkeit der Zellen, eine künstlich zugefügte Wunde zu verschließen reduziert ist, wenn per HPGD-siRNA-Transfektion die HPGD-Menge in den Zellen verringert wird. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass HPGD für die Proliferation und Migration der Zellen eine wichtige Rolle spielt (Lehtinen et al. 2012). Durch die Herunterregulation der HPGD-Expression würden diese beiden Zellaktivitäten gestört und könnten die beobachteten Effekte verursachen. Diese Ergebnisse von Lehtinen implizieren, dass HPGD bei Brustkrebs eine andere Rolle spielen könnte als bei Darm- oder Lungenkrebs.

Es zeigt sich, dass die Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen HPGD und der Entstehung von Krebs nicht in Einklang zu bringen sind. Es ist möglich, dass die vermehrte Expression von HPGD bei Brustkrebs im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist.

1.4 Migrations-Assays

Durch das schnelle Wachstum von Tumoren werden Teile des Tumorgewebes vermindert mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Sind Tumorzellen zu weit von einem versorgenden Blutgefäß entfernt, können sie entweder durch die Stimulation von Gefäßeinsprossung oder durch die Invasion und Migration in andere Bereiche des Tumors der Unterversorgung entkommen. Zur lokalen Ausbreitung eines Tumors bewegen sich die Tumorzellen in Lymphspalten oder direkt in das umliegende Bindegewebe (Wagner und Müller 2010).

Es hat sich gezeigt, dass sich Zellen von Tumoren mit hoher Metastasierungstendenz schneller fortbewegen als Zellen von Tumoren mit niedrigerer Metastasierungstendenz. Diese Beobachtung unterstreicht, von welcher klinischen Relevanz das Migrationsverhalten der Tumorzellen ist. Die Migrationsfähigkeit ist für die maligne Progression und Metastasenentstehung eine wichtige Eigenschaft der Tumorzellen (Hanahan und Weinberg 2000).

Um die Migrationsfähigkeit von Zellen quantitativ und reproduzierbar zu untersuchen, wurden verschiedene Assays entwickelt. Die Zellen befinden sich meist in oder auf einer Matrix, die sie als Kontaktfläche zur Fortbewegung nutzen können. Das Wanderungsverhalten der Tumorzellen wird entweder kontinuierlich oder zu bestimmten Zeitpunkten detektiert. Die verschiedenen Assays unterscheiden sich hauptsächlich hinsichtlich der Anzahl der unter-

suchten Zellen (Einzelzell-Assays, Populations-Assays) und der Anzahl der beobachteten Ebenen (zweidimensional, dreidimensional) sowie des Beobachtungszeitraums (Start-End-Beobachtung, kontinuierlich). Es können zusätzlich Substanzgradienten angelegt werden, die die Zellen veranlassen, sich in eine bestimmte Richtung zu bewegen (Chemotaxis) (Entschladen et al. 2005).

Der Vorteil der Einzelzell-Assays gegenüber Populations-Assays besteht in der Möglichkeit, zwischen den Faktoren Migration und Proliferation der Zellen unterscheiden zu können, sowie Aussagen über einzelne Zellen treffen zu können (Decaestecker et al. 2007). Durch kontinuierliche Beobachtung der Zellen kann eine Aussage über den zeitlichen Verlauf getroffen werden. Ein angelegter Substanzgradient kann Erkenntnisse über Wirkungen liefern, ist jedoch auch sehr viel komplexer in der Durchführung und kann infolgedessen zu widersprüchlichen Ergebnissen führen (Entschladen et al. 2005).

Der von unseren Kooperationspartnern in Finnland durchgeführte Wundheilungs-Assay (s. Abb. 1.7) zählt zu den zweidimensionalen Populations-Assays. Nach dem Zufügen eines schmalen Ritzes in einen Zell-Monolayer wird zu einem bestimmten Zeitpunkt (hier nach 48 Stunden) überprüft, inwieweit sich die künstliche Wunde wieder verschlossen hat. Die Ergebnisse geben Auskunft über die kombinierte Proliferations- und Migrationsfähigkeit der eingesetzten Zellen.

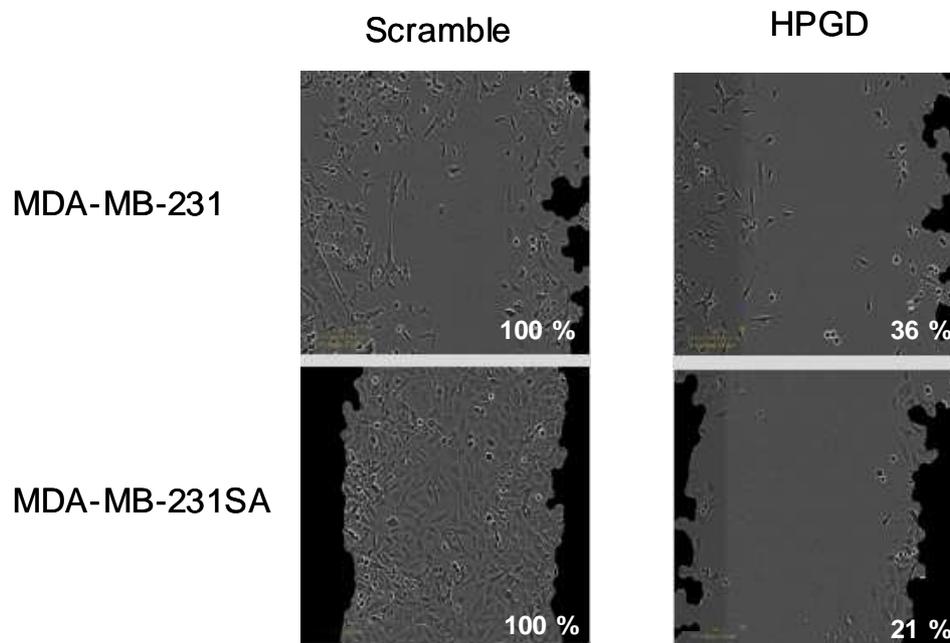


Abb. 1.7: Wundheilungsassay mit MDA-MB-231 und MDA-MB-231-(SA)-Zellen. Die Wundheilung ist nach der HPGD-siRNA-Transfektion gestört und verlangsamt. (Lehtinen et al. 2012)

Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Zell-Migrations-Assay handelt es sich um einen zwei-dimensionalen Einzelzell-Migrations-Assay. Das Migrationsverhalten einzelner Tumorzellen wurde in zwei Dimensionen kontinuierlich über 16 Stunden beobachtet und ausgewertet. Die eingesetzte Matrix bestand aus Typ-I-Kollagen (97%) und Typ-III-Kollagen und sollte das interstitielle Bindegewebe simulieren (Wagener und Müller 2010).

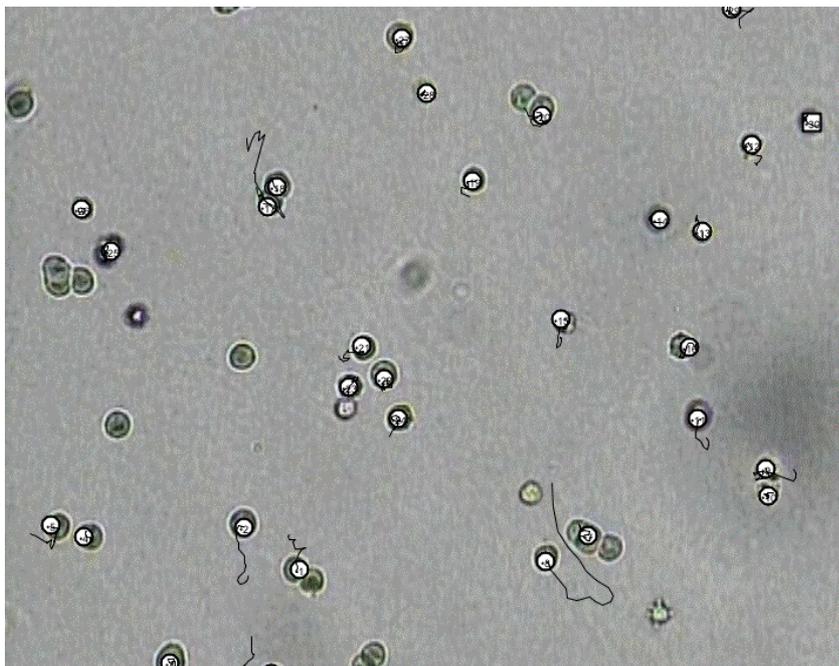


Abb. 1.8: In dieser Arbeit eingesetzter Zell-Migrations-Assay. Bild zu Beginn des Assays, die Linien stellen den später von den Zellen zurückgelegten Weg dar.

Die aus dem Migrations-Assay gewonnenen Ergebnisse geben eine Auskunft über die Beweglichkeit der einzelnen Zellen. In den eingesetzten Zellen wurde die HPGD-Proteinexpression variiert, um deren Einfluss auf die Zellmigration untersuchen zu können.

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit soll die Expression von HPGD in Brustkrebstumoren untersucht und anschließend mit klinischen Parametern der Patientinnen korreliert werden, um so eine statistische Aussage treffen zu können, welchen Einfluss die HPGD-Expression bei Mammakarzinompatientinnen besitzt.

Des Weiteren soll mit einem Einzelzell-Migrations-Assay der Einfluss von HPGD auf die Migrationsfähigkeit von Brustkrebszellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial und Patientendaten

Das Untersuchungsmaterial und die Patientendaten wurden in den Jahren von 1999 bis 2007 in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) gesammelt.

In diese Untersuchung wurden Tumorproben von Brustkrebspatientinnen eingeschlossen, die keine neoadjuvante Therapie vor der Operation bekommen haben. Eine stattgefundene neoadjuvante Therapie stellt aus diesem Grund ein Ausschlusskriterium dar.

Bei allen Patientinnen wurde eine Knochenmarkprobe entnommen, um die Bestimmung des Knochenmarkstatus zu ermöglichen.

Es handelt sich um 556 Proben von 411 Patientinnen. Bei 89 Patientinnen liegt zusätzlich zur Primärtumorprobe eine Lymphknotenprobe vor. Durch Doppelbestimmungen einiger Proben entsteht ein Gewebe-Microarray mit 556 Proben:

Tab. 2.1: Probenübersicht. Die Anzahl der Patientinnen und die Art und Menge der vorliegenden Proben sind dargestellt. Es ergibt sich die Anzahl der Stenzen auf dem Gewebe-Microarray.

Anzahl Patientinnen	Proben	Anzahl Stenzen
300	eine Tumorprobe	300
22	zwei Tumorproben	44
72	eine Tumor-, eine LK-Probe	144
17	zwei Tumor-, zwei LK-Proben	68
Summe: 411		556

Zusätzlich zu den Tumor- und Lymphknotenproben wurden Informationen über die Patientinnen erfasst, die ebenfalls für diese Studie genutzt werden dürfen. Es handelt sich um Angaben, die sich aus Aufnahme- und Kontrolluntersuchungen der Patientinnen ergaben. Diese umfassen neben dem Alter der Patientin Angaben über das Tumorstadium, das Vorliegen von Lymphknotenbefall oder Metastasen, Hormonrezeptorstatus und weitere Aussagen über molekulare Eigenschaften des Tumors. Des Weiteren liegen Informationen über das Überleben der Patientin sowie den Zeitpunkt einer möglichen Metastasen- oder Rezidivdiagnose vor.

Die wichtigsten klinischen Parameter der Patientinnen zum Operationszeitpunkt verteilen sich wie folgt:

Tab. 2.2: *Klinische Parameter der Patientinnen*

Histologie			Lymphknotenstatus			Metastasen		
	n	%		n	%		n	%
duktal	279	67,9	negativ	255	62,0	keine	386	93,9
lobulär	80	19,5	positiv	153	37,2	vorhanden	14	3,4
andere	52	12,7						
k. Angabe	0	0,0	k. Angabe	3	0,7	k. Angabe	11	2,7

Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug zum Operationszeitpunkt 57,7 Jahre. Die durchschnittliche Nachuntersuchungszeit („Follow-up-time“) betrug 54,5 Monate (0,1-105 Monate).

Die Patientinnen erklärten schriftlich ihr Einverständnis darüber, dass die erhobenen Daten und gewonnenen Gewebeproben zu Studienzwecken genutzt werden dürfen.

2.1.2 Materialien für die Zellkultur

2.1.2.1 Zellen

Für alle Versuche wurden Zellen der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231 (SA) eingesetzt. Diese sind eine speziell veränderte Unterform der MDA-MB-231 wt (Wildtyp) Zellen. Sie stellen eine aggressive Unterform der Wildtypzellen dar und besitzen die Eigenschaft, schnell in die Knochen zu metastasieren (Mbalaviele 1996).

Die Zellen wurden von Dr. Iljin, VTT Medical Biotechnology, Turku, Finnland zur Verfügung gestellt.

2.1.2.2 Standardzellkulturmedium

Das für die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (SA) eingesetzte Zellkulturmedium setzte sich wie folgt zusammen:

- 88% (v/v) DMEM Standard-Medium
- 10% (v/v) FCS, Hitze-inaktiviert (56°C, 30 min)

- 1% nicht-essentielle Aminosäuren
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 2 mM Glutamin

2.1.2.3 Kollagen-Matrix-Mix

Der 4x-Kollagen-Matrix-Mix für den Zell-Migrations-Assay setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 µl Minimum Essential Eagle Medium pH 5
- 27 µl Bicarbonat pH 8
- 375 µl Pure Col pH 2 (99,9%iges reinstes Rinderkollagen; 97% Typ-I-Kollagen, restlicher Teil: Typ-III-Kollagen)

2.1.2.4 Weitere Materialien und Medien

- FCS PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Trypsin/EDTA Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- L-Glutamin Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- DMSO Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Pure Col® Advanced Bio Matrix, San Diego, USA
- Bicarbonat Solution Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Standard-Medium)
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Minimum Essential Eagle Medium
Sigma Aldrich, St. Louis, USA

- Minimum Essential Eagle Medium Non-essential Amino-Acids
Gibco®, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- Opti – Minimum Essential Eagle Medium
Gibco®, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- HPGD-siRNA
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- scrambled RNA
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- SiLentFect
Bio-Rad, München

2.1.3 Materialien für molekularbiologische Methoden

2.1.3.1 RNA-Extraktions-Kit

Zur Gewinnung von RNA aus kultivierten humanen Krebszelllinien wurde das RNeasy Micro Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland eingesetzt. Zur Lyse der Zellen wurde eine QIAshredder spin column aus dem RNeasy Mini – QIAshredder Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt.

Soweit möglich sind die Zusammensetzungen der Puffer nach Angaben des Herstellers aufgeführt.

- RNeasy Micro Kit
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- RLT-Puffer
enthält Guanidiniumisothiocyanat
- RW-1-Puffer
Waschpuffer mit Salz und Ethanol
- RPE-Puffer
Waschpuffer mit Salz und Ethanol
- RDD-Puffer
keine Herstellerangaben
- RNeasy Mini - QIAshredder Kit
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

- DNase aus dem RNase-Free DNase Set von der Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.3.2 cDNA-Synthese-Kit

Zur cDNA-Synthese aus aufgereinigten mRNA-Proben wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas Life Sciences, Leon-Rot, Deutschland bezogen.

2.1.3.3 PCR-Primer und -Fertiglösungen

Die PCR-Primer wurden von der Firma Sigma Life Science, St. Louis, USA synthetisiert. Die PCR-Primer für das RPLP0-Gen wurden von der Firma TIB MOBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland synthetisiert.

- Primer *HPGD* f: CACGTGAACGGCAAAGTG
- Primer *HPGD* r: CTTCAAGATTCCAATCCACCA
- Primer *RPLP0* f: ACCCAGCTCTGGAGAAACTGC
- Primer *RPLP0* r: TGAGGTCCTCCTTGGTGAACA

Als PCR-Fertigreagenz wurde das MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay von der Firma Eurogentec, Seraing, Belgien bezogen. Dieses enthält nach Herstellerangaben:

- dNTPs (incl. dUTP)
- Meteor*Taq* DNA Polymerase
- MgCl₂ (4 mM)
- SYBR® Green I
- stabilizers and passive reference

2.1.4 Materialien für immunologische Methoden

2.1.4.1 Detection-Kit

Um die Paraffin-eingebetteten Gewebe-Microarrays immunohistochemisch anzufärben wurde das DAKO ChemMate Detection Kit (5001) der Firma DAKO, Glostrup, Dänemark eingesetzt. Dieses enthielt mehrere Lösungen, die sich nach Herstellerangaben folgendermaßen zusammensetzten:

- Lösung A: Biotinylierter Sekundärantikörper; Ziege-anti-Maus und Ziege-anti-Kaninchen, 100ml, in gepufferter Lösung
- Lösung B: Streptavidin Peroxidase (HRP); Streptavidin kombiniert mit Meerrettichperoxidase, 100ml, in gepufferter Lösung
- Lösung C: DAB+ Chromogen (3,3' Diaminobenzidintetrahydrochlorid), 5ml, 50-fach konzentriert,
- Lösung D: HRP-Substratpuffer, 250ml, enthält Wasserstoffperoxidase

2.1.4.2 Primärantikörper

Der Primärantikörper gegen HPGD wurde in Kaninchen produziert und von der Firma Sigma Life Science aus St. Louis, USA bezogen (HPA005679).

2.1.4.3 Weitere Materialien

Für die immunohistochemischen Anfärbungen wurden des Weiteren folgende Materialien eingesetzt:

- DAKO Real Antibody Diluent DAKO, Glostrup, Dänemark
- Mayers-Hemalaun-Lösung Merck, Darmstadt, Deutschland

- Alexa-Fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG

MoBiTec, Göttingen, Deutschland

- DAKO ChemMate Peroxidase-Blocking Solution

DAKO, Glostrup, Dänemark

- Albumin aus Rinderserum lyophilisiert (BSA)

Sigma Life Sciences, St. Louis, USA

2.1.5 Chemikalien

Alle Chemikalien sind, sofern nicht anders angegeben, Produkte der Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Roche (Mannheim).

2.1.6 Lösungen

10 x TBS-T

- 121,1 g Trisbase
- 175,3 g NaCl
- 1,7 l H₂O
- 10 ml Tween-20
- Titration mit 25% HCl auf pH 7,6

10 x Tris-EDTA-Puffer (pH 9)

- 800 ml H₂O
- 12,11 g Trisbase
- 3,72 g EDTA
- Titration mit 25% HCl auf pH 9
- auf 1000 ml mit H₂O auffüllen

PBS

- 1000 ml H₂O
- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na₂HPO₄
- 0,24 g KH₂PO₄

siRNA-Dilutions-Puffer

- 4,91 g KOAc
- 3,58 g HEPES
- 0,22 g MgOAc
- 450 ml H₂O
- pH mit KOH (1M) auf 7,4 einstellen
- mit H₂O auf ein Volumen von 500 ml auffüllen

2.1.7 Geräte

- Mikroskop (Migration-Assay): Leica, Solms, Deutschland (10)
- Mikroskop (Immunfluoreszenz): Zeiss, Jena, Deutschland (10,40)
- Mikroskop (Immunhistochemie): Leica, Solms, Deutschland (10,20,40)
- Pipetman Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Pipette 2,5µl Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipette 10µl Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipette 20µl Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipette 200µl Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipette 1000µl Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Zentrifuge (Zellkultur)	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge (normal)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- PCR-Bench	Hera Safe, Heraeus, Hanau, Deutschland
- PCR- Mastercycler realplex ⁴	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Vortex	B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Zellkultur-Arbeitsplatz	HeraSafe, Heraeus, Hanau, Deutschland
- Zellkultur-Inkubator	Flow Laboratories, Inglewood, USA
- NanoDrop® ND-100 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA
- Kamera	JVC, Yokohama, Japan
- Decloaking Chamber	Biocare medical, Concord, USA
- Heizlampe	IKEA, Leiden, Niederlande
- Heizplatte	Medite, Burgdorf, Deutschland
- Objektträger-Schnelltrockner	Medite, Burgdorf, Deutschland

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

- Handschuhe puderfrei	Peha-Soft, Hartmann, Heidenheim
- Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

- Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- 12-Loch-Platte	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
- Falcon-Tube 15ml	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
- Falcon-Tube 50ml	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
- Deckgläschen 22 x 22 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
- Objektträger	Elka Objektträger, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer	Superior, Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
- Paraffin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Vaseline	Roth, Karlsruhe, Deutschland
- PCR-Platte	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- PCR-Folie	Applied Biosystems, Foster City, USA
- Spritze	B.Braun, Melsungen, Deutschland
- sterile Filter	VWR International, West Chester, USA
- Fermacidal	IC Products SA, Minusio, Schweiz

2.1.9 Software

- Microsoft Office 2007 Microsoft D GmbH, Unterschleißheim

- ISIS Version 4.4.24, MetaSystems GmbH, Altlußheim, Deutschland

- SPSS Version 15, SPSS Inc., Delaware, USA

- Revolution Media Version 0-5-8 Okt 08, Copyright Bernd Niggeman

- Security Spy Version 1.5.3, Bensoftware, London, Großbritannien

- MedCalc Version 7.3, MedCalc Software, Mariakerke, Belgien

2.1.10 Hardware

- Laptop Piranha, OCTO IT, Appenweiler-Urloffen

- Computer (Videos) iMac 7.1, Apple Inc., Cupertino, USA

- Computer (PCR) DELL Optiplex, DELL Inc., Round Rock, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Standardzellkulturmethoden

Die Brustkrebszelllinie wurde in sterilen Gefäßen der Firmen Nunc (Wiesbaden) und Falcon (Heidelberg) kultiviert. Die Kultivierung fand in einem Inkubatorschrank in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 10% CO₂ statt. Die Zellen wurden, sobald sie konfluent wuchsen, passagiert. Dazu wurden sie mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend mit 0,05%igem Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) vom Boden gelöst. Durch Zugabe von FCS-haltigem Medium wurde der Vorgang gestoppt. Nach Zentrifugation für 3 Minuten mit 1200 rpm und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca. 10% wieder ausgesät.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die eingesetzten Zellen können durch Einfrieren bei -196°C in flüssigem Stickstoff längere Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Die Zellen wurden beim Einfrieren mit Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Dadurch wird den Zellen Wasser entzogen und die Bildung von Eiskristallen verhindert. Mindestens 2*10⁶ Zellen wurden nach Zentrifugation in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Dieses setzte sich zusammen aus 90% (v/v) DMEM-Standardmedium und 10% (v/v) DMSO. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt und 24 Stunden bei -80°C gelagert. Danach wurden die Röhrchen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie nach dem Auftauen (37°C, Wasserbad) mit Zellkulturmedium gewaschen. Mit diesem Schritt fand die Entfernung des toxischen DMSO statt. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.1.3 siRNA-Transfektion

Um die Funktion von Proteinen wie HPGD zu untersuchen, gibt es die Möglichkeit, durch die Transfektion mit small interfering RNAs (siRNAs) die Menge an Protein vorübergehend zu

senken. Aus dadurch veränderten Eigenschaften der behandelten Zellen lassen sich Rückschlüsse auf die Aufgaben und Funktionen des entsprechenden Proteins ziehen.

Bei siRNAs handelt es sich um kleine RNAs, die normalerweise die Regulation von Zellaktivitäten beeinflussen. Sie werden von Genen codiert und bewirken den Abbau anderer codierender RNA. Deren Menge kann so gesenkt werden. Infolgedessen sinkt die Menge an exprimiertem Protein.

In einem Eppendorfcup wurden bei Raumtemperatur 0,64 μl siRNA (20 μM) mit 160 μl siRNA-Dilution-Buffer verdünnt. Die entstandene Lösung wurde in ein Loch einer 12-Loch-Platte ausplattiert. Es wurden in einem weiteren Eppendorfcup 2,4 μl der Transfektionsreagenz SiLentFect mit 400 μl OptiMEM verdünnt und 10 Minuten inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf die Lösung, die sich bereits im Loch der 12-Loch-Platte befand, gegeben. Die neu hergestellte Lösung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde eine Zellsuspension mit 140.000 Zellen in 440 μl Zellkulturmedium hergestellt und ebenfalls ausplattiert. Die entstandene Suspension wurde 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

Es wurden biologische Triplikate und technische Duplikate erstellt. Der beschriebene Vorgang wurde entsprechend dreimal durchgeführt um über eine Erhöhung der Stichprobenanzahl Störfaktoren und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse zu minimieren. Die drei einzelnen Transfektionen werden im Folgenden als Experiment 1, Experiment 2 und Experiment 3 bezeichnet.

2.2.1.4 Zell-Migrations-Assay

Mit dem Zell-Migrations-Assay soll das Migrationsverhalten von MDA-MB-231 (SA)-Zellen untersucht werden. Die Zellen wurden in einer Kammer in eine 3D-Kollagenmatrix eingebettet. Die Zellen wurden 16 Stunden gefilmt. Das Migrationsverhalten konnte anschließend ausgewertet und interpretiert werden.

Der Zell-Migrations-Assay wurde nach dem an der Uni Witten/Herdecke von Dr. Bernd Niggemann entwickelten Protokoll durchgeführt (Niggemann et al. 2004).

Dazu wurden als erstes die zu untersuchenden Zellen in ihrer Zellkulturflasche mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 0,05%igem Trypsin/EDTA versetzt. Sobald sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde der Trypsin/EDTA-Verdau mit Zellkulturmedium gestoppt. Die Suspension wurde 3 Minuten mit 1200 rpm zentrifugiert und das Zell-

pellet in Zellkulturmedium resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt.

Es wurden 50.000 Zellen in 50 μ l Medium resuspendiert. Zu diesen Zellen wurden 100 μ l des 4x-Kollagen-Matrix-Mix gegeben. Die entstandene Suspension aus Zellen und Kollagen-Matrix-Mix wurde ohne Luftblasen zu erzeugen in eine vorbereitete Objektträgerkammer gegeben. Diese bestand aus einem an drei Seiten U-förmig mit Wachs an einem Objektträger befestigten Deckgläschen (s. Abb. 2.1). Der Wachs wurde im Gewichtsverhältnis 2:1 aus Paraffin und Vaseline hergestellt. Die Deckgläschen und Objektträger wurden vorher in 70%igem Ethanol desinfiziert. Der Abstand zwischen Objektträger und Deckgläschen betrug ungefähr 0,3 mm.

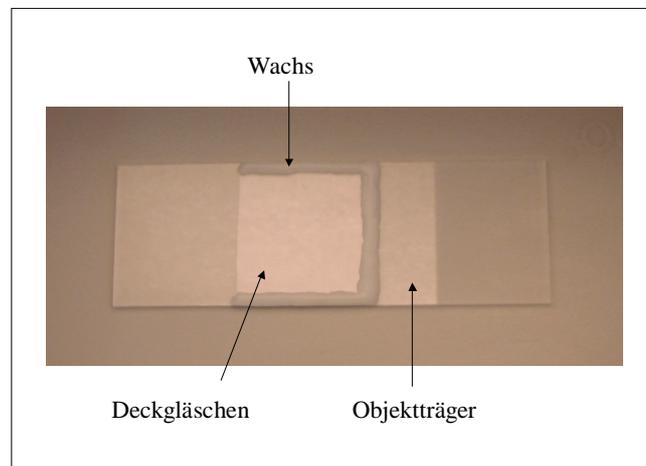


Abb. 2.1: Objektträgerkammer. Das Deckgläschen ist mit Wachs (weiss) am Objektträger fixiert. Die offene Seite wird später verschlossen.

Die zu einer Seite offene, beladene Objektträgerkammer wurde aufrecht für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Kollagen polymerisierte und bildete seine Struktur aus. Abschließend wurde die Matrix mit DMEM-Standardmedium überschichtet, um Verschiebungen der Matrix innerhalb der Kammer aufgrund von freien Räumen zu verhindern. Die vierte Seite der Kammer wurde mit Wachs verschlossen.

Die Zellen wurden 16 Stunden lang unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung mit dem Program Security Spy gefilmt. Dabei befanden sich die Kammern mit den Zellen unter zwei Heizlampen, die eine durchgehend konstante Temperatur von 37°C sicherstellten. Es wurde ein Bereich der Kammer im Gesichtsfeld eingestellt, in dem sich ca. 30 Zellen befanden, die einzeln und nicht in Gruppen vorlagen.

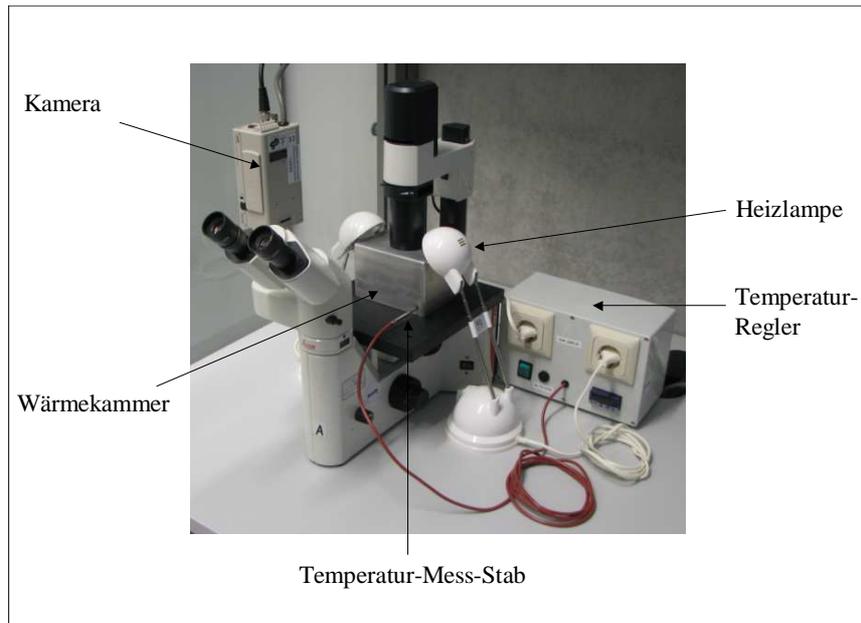


Abb. 2.2: Versuchsaufbau

Zur Auswertung wurde ein Video geladen. Die Zellen im Sichtfeld wurden anschließend durchnummeriert. Es wurden nur Zellen ausgewählt, die bis zum Ende des Videos nicht apoptotisch wurden. Danach wurde der Film beschleunigt in Zeitraffer abgespielt. Das Originalvideo mit einer Länge von 16 Stunden wurde in 10 Sekunden wiedergegeben. Das Video wurde entsprechend der Anzahl der beobachteten Zellen mehrfach abgespielt. Pro Durchlauf wurde eine Zelle per Computer-Maus verfolgt und der zurückgelegte Weg der einzelnen Zelle dadurch nachvollzogen. Es entstanden Bilder mit den Pfaden der Zellen (s. Abb. 2.3).

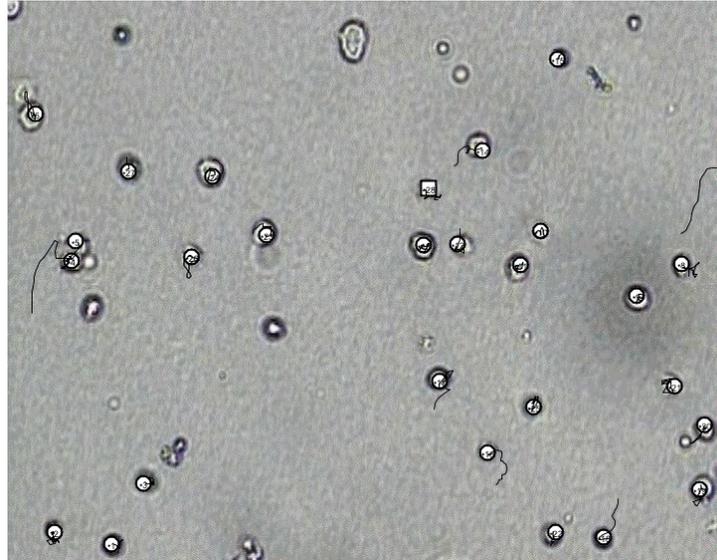


Abb. 2.3: Pfadbild mit eingezeichneten Wegen der Zellen. Es wurden 30 Zellen ausgewählt. Unmarkierte Zellen wurden zum Ende des Videos apoptotisch.

Der Migrations-Assay wurde mit den zwei verschiedenen Zellkolonien (HPGD-siRNA-transfiziert und scrambled-RNA-transfiziert) aus Experiment 2 und Experiment 3 jeweils zweimal durchgeführt. Es wurden technische Duplikate erstellt. Von den scrambled-RNA-transfizierten Zellen aus Experiment 1 wurden ebenfalls technische Duplikate erstellt.

Mit den HPGD-siRNA-transfizierten Zellen aus Experiment 1 hingegen wurde lediglich ein Migrations-Assay durchgeführt. Die Zellzahl war für einen zweiten Assay nicht ausreichend.

2.2.1.5 Herstellung von Zytospins

Ein Objektträger wurde mit einer Zellsuspension aus 20.000 Zellen beladen und zentrifugiert (3 Minuten, 1200 rpm). Die Zellen blieben nach der Zentrifugation auf dem Objektträger haften. Der Objektträger wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zellen befanden sich auf der Oberfläche des Objektträgers und waren so für weitere Untersuchungsmethoden zugänglich. Sie wurden anschließend per Immunfluoreszenzfärbung angefärbt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion aus der humanen Krebszelllinie MDA-MB-231 (SA) wurde das RNeasy Micro Kit von Qiagen aus Hilden, Deutschland eingesetzt und nach dessen Protokoll verfahren.

Die Zellen wurden nach Zentrifugation in Aliquots mit nicht mehr als $5 \cdot 10^5$ Zellen aufgeteilt und in 350 μ l RLT-Puffer resuspendiert. Die Probe wurde auf eine QIAshredder-Säule pipettiert und diese in einem 2 ml Sammeltube platziert. Nach 2 Minuten Fullspeed-Zentrifugation wurde das hergestellte Lysat mit gleichem Volumen 70%igem Ethanol versetzt. Dieses Lysat-Ethanol-Gemisch wurde auf eine RNeasy MinElute spin column transferiert und anschließend in einem 2 ml-Sammeltube bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert. Das entstandene Lysat wurde verworfen und auf die Säule wurden 350 μ l RW-1-Puffer gegeben. Nach Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm wurde das Lysat erneut verworfen. In einem Eppendorfcup wurden 10 μ l DNase I in 70 μ l RDD-Puffer verdünnt und gemixt. Die entstandene Lösung wurde auf die Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert.

Mit 350 μ l RW-1-Puffer, der auf die Säule gegeben wurde, und Zentrifugation für 15 Sekunden mit 10.000 rpm sollte die DNase aus der Säulenmembran gelöst werden. Das Lysat wurde verworfen und die Säule in einem neuen Sammeltube platziert. Es wurden 500 μ l RPE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut 15 Sekunden mit 10.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde mit 500 μ l 80%igem Ethanol und Zentrifugation für 2 Minuten mit 10.000 rpm bewirkt, dass die Membran durchlässiger und poröser wurde. Sammeltube und Lysat wurden verworfen. Die Säule wurde in einem neuen Sammeltube für 5 Minuten mit Fullspeed zentrifugiert. Das Sammeltube wurde mitsamt Lysat erneut verworfen. Die Säule wurde in einem neuen Sammeltube platziert. Es wurden 14 μ l RNase-freies Wasser aufgetragen und für 2 Minuten inkubiert. Mit diesem Schritt wurde die RNA von der Säule gelöst. Das nach Zentrifugation für 1 Minute mit Fullspeed entstandene Lysat enthielt die RNA. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 RNA-Konzentrationsmessung

Damit bei der sich anschließenden cDNA-Synthese 200 ng RNA eingesetzt werden konnten, musste deren Konzentration bestimmt werden. Um diese zu bestimmen, wurde die RNA-Konzentrationsmessung durchgeführt. Sie fand mit einem Nano-Drop-Gerät (Thermo Fisher Scientific) statt. Dazu wurde eine Probe von 1 μl aufgetragen und über die Messung der Extinktion der RNA-Gehalt bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260nm beträgt der Extinktionskoeffizient von RNA $0,027 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$. Um zusätzlich zur Menge die Reinheit der Probe messen zu können, wurde der Quotient aus den Extinktionen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen und errechnet. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.2.3 cDNA-Synthese

Um die ursprüngliche RNA-Menge später in der quantitativen PCR bestimmen zu können, muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Das später in der PCR eingesetzte Enzym *MeteorTaq* DNA Polymerase ist nicht in der Lage, einen RNA-Strang als Vorlage für einen DNA-Tochterstrang zu benutzen. Es benötigt cDNA, um einen zweiten Strang zu synthetisieren. Im Gegensatz dazu ist die bei der cDNA-Synthese eingesetzte reverse Transkriptase in der Lage, ausgehend von einem RNA-Strang einen cDNA-Strang zu synthetisieren. cDNA ist zusätzlich stabiler als RNA und für die längerfristige Lagerung der Proben vorteilhaft.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas Life Science aus Leon-Rot, Deutschland durchgeführt. Alle Schritte fanden, wenn nicht abweichend angegeben, auf Eis statt. Es wurden 200 ng RNA mit 1 μl Random-Primer versetzt und mit DEPC-behandeltem Wasser auf 11 μl aufgefüllt. Nach Inkubation für 5 Minuten bei 65°C wurden 4 μl 5xReaktionspuffer, 1 μl RiboLockTM RNaseInhibitor (20u/ μl) sowie 2 μl dNTP-Mix (10mM) und 2 μl M-MuLV Reverse Transkriptase (20u/ μl) zum RNA-Gemisch hinzugegeben.

Nach Inkubation für 5 Minuten bei 25°C folgte die Inkubation für 60 Minuten bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 5 Minuten beendet. Die entstandenen cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Um die spezifische Menge an mRNA in den Zellen zu messen, wurde die quantitative Realtime-PCR durchgeführt. Nachdem unspezifisch nicht nur die HPGD-mRNA bzw. RPLP0-mRNA, sondern sämtliche RNA aus den Zellen extrahiert (siehe 2.2.2.2) und in cDNA umgeschrieben wurde (siehe 2.2.2.3), fand durch die qPCR die spezifische Messung der HPGD-mRNA bzw. RPLP0-mRNA statt. Diese lässt grob auf die Menge an entsprechendem Protein in der Zelle schließen, da die Proteine an den Ribosomen anhand der mRNA synthetisiert werden.

Ein PCR-Zyklus unterteilt sich in die drei Schritte Denaturation (15 Sekunden, 95°C), Annealing (30 Sekunden, 60°C) und Elongation (30 Sekunden, 68°C). Während der Denaturation wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Nach dem Annealing, in dem sich die Primer an die DNA anlagern, findet die Elongation statt. Die DNA-Synthese erfolgt durch die DNA-Polymerase ausgehend von bereits vorhandenen Primern. Die verschiedenen Phasen können durch die Temperatur gesteuert werden. Läuft die PCR optimal, verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Menge des Abschnitts zwischen den Primern.

Die Menge an doppelsträngiger DNA lässt sich mit dem Farbstoff SYBR-Green I messen. Dieser bindet an doppelsträngige DNA und bildet einen Komplex aus, der Licht der Wellenlänge 494 nm absorbiert und Licht der Wellenlänge 521 nm emittiert. Dies lässt sich photometrisch messen. Am Ende eines jeden Zyklus wird so die Menge an doppelsträngiger DNA bestimmt.

Die Menge an DNA verdoppelt sich mit jedem Zyklus und erreicht irgendwann einen Schwellenwert. Der Schwellenwert meint den Zeitpunkt, zu dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant stärker ist als die Hintergrundfluoreszenz. Je nachdem, wie viel spezifische cDNA zu Beginn der qPCR eingesetzt wurde, wird dieser Schwellenwert früher oder später erreicht. Um die Zeitpunkte miteinander vergleichen zu können, wird der cycle threshold (ct-Wert) angegeben, der beschreibt, in welchem Zyklus der Schwellenwert erreicht wurde.

Zum Schluss der qPCR wird die Temperatur langsam von 60°C auf 95°C erhöht. Die Melting-Curve (*deutsch*: Schmelzkurve) und somit die Reinheit der analysierten Probe soll bestimmt werden. Lief die qPCR optimal, so liegt am Ende ein spezifisches PCR-Produkt in sehr großen Mengen vor. Es ist doppelsträngig und hat eine festgelegte Basenpaarlänge. Wird die Temperatur langsam erhöht, so trennen sich die Doppelstränge bei einer ganz bestimmten Temperatur in Einzelstränge auf. Wie hoch diese ist, hängt davon ab, wie lang das Fragment und wie hoch der Anteil an Guanin- und Cytosinbasen der eingesetzten DNA ist. Je länger

das Fragment ist und je höher der GC-Anteil des Basenabschnittes, desto höher muss die Temperatur sein, um den Doppelstrang aufzubrechen. Die Menge an doppelsträngiger DNA lässt sich mit SYBR Green I messen.

Nach einer optimalen PCR sollte bei einer bestimmten Temperatur ein Peak entstehen, der anzeigt, dass sich bei dieser Temperatur die Doppelstränge in Einzelstränge aufgeteilt haben. Sind bei der qPCR Nebenprodukte entstanden, so besitzen sie eine andere Basenpaarlänge als das Hauptprodukt und trennen sich bei einer anderen Temperatur in Einzelstränge auf. Es entstünden mehrere Peaks.

Die wie unter 2.2.2.3 beschriebenen synthetisierte cDNA wurde in der quantitativen Realtime-PCR eingesetzt. Alle Schritte fanden auf Eis statt. Die folgenden Bestandteile wurden in die einzelnen Löcher einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert:

Tab. 2.2: Zusammensetzung der PCR-Proben

	HPGD	RPLP0
2x SYBR	7,5 µl	7,5 µl
H ₂ O	1,7 µl	4,2 µl
HPGD Primer f	0,4 µl	-
HPGD Primer r	0,4 µl	-
RPLP0 Primer f	-	0,4 µl
RPLP0 Primer r	-	0,4 µl
cDNA 1/5 verdünnt	5 µl	2,5 µl
Summe	15 µl	15 µl

Als Negativkontrolle wurde in ein Loch der Platte anstatt cDNA H₂O gegeben. In dieser Probe entsteht kein PCR-Produkt, solange keine Kontamination mit DNA stattfand.

Danach wurde die Platte mit PCR-Folie verschlossen, um Evaporationen und dadurch den Verlust von einzelnen Bestandteilen des PCR-Mixes zu verhindern. Die Platte wurde im PCR-Cycler (Eppendorf) platziert und das PCR-Programm gestartet. Das Programm setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Tab. 2.3: PCR-Programm

Zeit (min)	Temperatur (°C)
2:00	55,0
10:00	95,0
0:15	95,0
0:30	60,0
0:30	68,0
0:15	95,0
	60,0
	95,0

} 35 x

(Innerhalb von 20:00 min (für Melting-Curve)

Die Auswertung fand mit dem zum qPCR-Cycler gehörenden Programm Realplex 2.0 von Eppendorf, Hamburg statt.

Sämtliche Messungen wurden an Triplikaten durchgeführt. Mögliche Messfehler sollten so vermieden werden. Stimmt die drei gemessenen Werte nicht überein, so wurde der am stärksten abweichende Wert nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Es wurden die Mengen von RPLP0-mRNA und HPGD-mRNA bestimmt. RPLP0 ist ein Protein, das kontinuierlich von Brustkrebszellen auf gleichbleibendem Niveau synthetisiert wird. RPLP0-mRNA sollte entsprechend in den verschiedenen Proben in gleicher Menge bezogen auf die Zellzahl vorhanden sein. Ausgehend davon wurde der Quotient aus RPLP0-mRNA-Menge und HPGD-mRNA-Menge gebildet. So sollten falsche Ergebnisse, die beispielsweise durch das Einsetzen verschiedener Mengen an cDNA verursacht werden können, vermieden werden.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Immunhistochemische Färbung (IHC)

Um mit der immunhistochemischen Färbung spezifisch eine Zielstruktur (z.B. ein Protein) anzufärben, existieren hauptsächlich zwei verschiedene Möglichkeiten. Einerseits ist es möglich, gegen die Zielstruktur gerichtete Antikörper einzusetzen, die bereits mit einem Farbstoff oder auf eine andere Art markiert sind (z.B. radioaktiv). Andererseits kann der Nachweis mit einem Primäantikörper stattfinden, der erst durch weitere Behandlungsschritte markiert wird (s. Abb. 2.4). In dieser Arbeit wurde die zweitgenannte Variante gewählt.

Der HPGD-Antikörper ist gegen HPGD-Proteine gerichtet und bindet sie spezifisch. Er wird auf die zu färbenden Schnitte aufgebracht. Der Nachweis dieses Antikörpers findet im Anschluss statt. Es werden mit Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Sie sind gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und binden diesen. Im Folgenden produziert die Peroxidase Wasserstoffperoxid, welches den vorher farblosen Farbstoff DAB oxidiert und so eine Färbung verursacht (Graham und Karnovsky 1966). Endogene Peroxidasen, die von Beginn an in der anzufärbenden Gewebeprobe vorhanden sind, würden eine Hintergrundfärbung (sog. Hintergrundrauschen) hervorrufen und werden deshalb mit Wasserstoffperoxid-Lösungen (H_2O_2) geblockt.

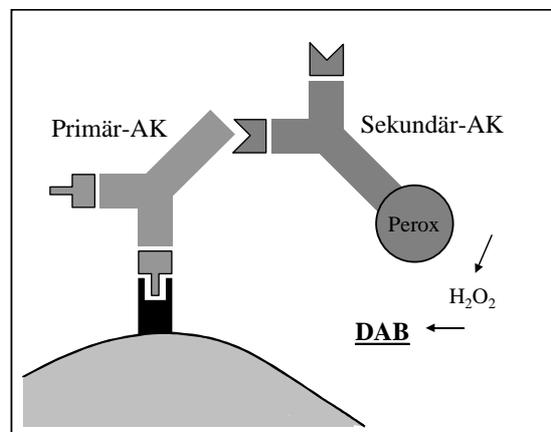


Abb. 2.4: Immunhistochemische Färbung (schematisch)

Die Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebe-Microarrays wurden zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe deparaffiniert und anschließend im Dampfdruckinkubator (Decloaking Chamber) für 5 Minuten in Tris-EDTA-Puffer (pH 9) bei $120^{\circ}C$ inkubiert. Durch Waschen mit TBST (3 x 3 Minuten) wurden die Gewebe-Microarrays abgekühlt. Daraufhin wurden sie über Nacht bei $4^{\circ}C$ mit dem Primärantikörper inkubiert (Verdünnung 1:100). Dieser wurde mit TBST (3 x 3 Minuten) abgewaschen. Es wurde nach dem Standardprotokoll DAKO ChemMate Detection Kit (#K 5001) weiter fortgefahren: Auf die Versetzung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (10 Minuten) und einem weiteren Waschschrift mit TBST (3 x 3 Minuten) folgte die Blockierung mit Peroxidase-Blocking Solution für 5 Minuten. Nachdem diese mit TBST (3 x 3 Minuten) entfernt wurde, fand die Inkubation mit Streptavidin Peroxidase (10 Minuten) statt. Nach weiterem Waschen konnte abschließend mit DAB spezifisch angefärbt werden.

Die Gegenfärbung der Zellkerne fand mit Mayers-Hemalaun-Lösung statt. Um die Gewebe-Microarrays danach zu konservieren, wurden sie in eine aufsteigende Alkoholreihe (80%,

96%, 100%, je 4 Minuten) eingebracht und am Ende in Xylol (2 x 10 Minuten) inkubiert. Zum Schluss wurden sie mit Eukitt und einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung (IHC)

Zur Auswertung der Tumorprobenfärbung wurde der HPGD-PT-Status bestimmt. Dieser setzte sich zusammen aus den Komponenten Intensität (I) und Anteil der angefärbten Zellen (P). Da es sich bei HPGD um ein zytoplasmatisches Protein handelt, wurde auch nur die zytoplasmatische Färbung beachtet und ausgewertet. Die Intensität wurde mit „0“ für keine Färbung, „1“ für schwache, „2“ für starke und „3“ für sehr starke Färbung codiert. Außerdem wurde der Anteil der Zellen ausgezählt, die mit der entsprechenden Intensität angefärbt wurden.

In einigen Fällen wurde der Tumor in mehreren verschiedenen Intensitätsgraden angefärbt. Es wurden die beiden stärksten Intensitäten und ihre einzelnen Prozentsätze angegeben. Für die Prozentsätze wurden wiederum Punkte vergeben:

Tab. 2.4: Auswertung der IHC. Bestimmung der Punkte aus dem Anteil der angefärbten Zellen

Prozentsatz	Punkte
0 %	0
1-29 %	1
30-69 %	2
70-89 %	3
90-100 %	4

Aus der Summe des Intensitätsgrades und den Punkten für den Prozentsatz ergab sich wie folgt der HPGD-PT-Status:

Abb. 2.5: Auswertung der IHC. Bestimmung des HPGD-PT-Status

P + I	HPGD-PT-Status
0-4	negativ
5-7	positiv

Wurde ein Tumor mit zwei verschiedenen Intensitätsgraden angefärbt, wurden für die Prozentwerte einzelne Punkte vergeben und diese zum höheren Intensitätsgrad addiert. Der niedrigere Intensitätsgrad wurde nicht mit in die Addition einbezogen.

Es folgen zwei Berechnungsbeispiele.

Sind in einer Tumorprobe alle Zellen schwach angefärbt, wird er mit (1-100) beschrieben. Für 100% gefärbte Zellen werden 4 Punkte vergeben. Es ergibt sich: $I + P = 1 + 4 = 5 \Rightarrow$ HPGD-PT-Status = 1.

Sind in einem Tumor 30% der Zellen stark angefärbt und die restlichen 70% der Zellen schwach angefärbt, wird dies mit (2-30, 1-70) beschrieben. Für die einzelnen Prozentwerte werden Punkte vergeben, der niedrigere Intensitätsgrad wird nicht in die Addition mit einbezogen. $I + P_1 + P_2 = 2 + 2 + 3 = 7 \Rightarrow$ HPGD-PT-Status = 1

Bei den Lymphknotenproben wurde die Bestimmung des HPGD-LK-Status auf die gleiche Art und Weise durchgeführt.

Wurden von einem Tumor oder Lymphknoten zwei Proben angefärbt und stimmten die Färbeargebnisse nicht überein, so wurde das Ergebnis reevaluiert. Bei fortbestehenden unterschiedlichen Intensitätsgraden und Anteilen wurde nur die Probe mit der intensiveren Anfärbung in die Auswertung einbezogen.

Die Bestimmung der Status fand verblindet statt und wurde parallel durch eine Pathologin kontrolliert (Dr. R. Issa, Universitätsklinikum Eppendorf).

2.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Per Immunfluoreszenzfärbung sollte kontrolliert werden, ob die Herunterregulation von HPGD durch HPGD-siRNA-Transfektion in MDA-MB-231 (SA)-Zellen erfolgreich war. Als Vergleich dienten scrambled-RNA-transfizierte Zellen und MDA-MB-231 (SA)-Wildtyp-Zellen.

Durch die Immunfluoreszenzfärbung soll das Protein HPGD spezifisch angefärbt und nachgewiesen werden. Die Zellkerne werden mit DAPI blau angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop lassen sich die Zellen anhand der DAPI-Färbung voneinander unterscheiden und durch die fluoreszenzmarkierten HPGD-Antikörperkomplexe lässt sich der HPGD-Gehalt der einzelnen Zellen einschätzen.

Es wurden wie bereits unter 2.2.1.5 beschrieben Zytospins mit unterschiedlich vorbehandelten MDA-MB-231 (SA)-Zellen hergestellt. Diese wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und zur Fixierung mit 4% Formaldehyd in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur inku-

biert. Das Formaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden durch das Aufbringen von 0,2% Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert. 0,2% Triton X-100 wurde wiederum mit PBS (3x) abgewaschen. Durch Aufbringen von Blockierungslösung für 30 Minuten wurden unspezifische Bindungen blockiert. Danach wurde der HPGD-Antikörper bei Raumtemperatur für 90 Minuten zu den Zellen gegeben. Er war im Verhältnis 1:250 in Blockierungslösung verdünnt. Die Blockierungslösung setzte sich zusammen aus 1% (w/v) BSA in PBS. Es schloss sich viermaliges Waschen mit PBS an. Der Sekundär-Antikörper (1:500 in Blockierungslösung) wurde für 90 Minuten aufgetragen und im Dunkeln inkubiert. Durch Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper entfernt. Die Kernfärbung fand mit DAPI (1 Minute) statt. Dieses wurde mit PBS (3x) abgewaschen. Die Slides wurden mit Mowiol eingedeckelt.

Die Auswertung fand unter einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss aus Jena mit einem 40-fach vergrößern Objektiv statt.

2.2.4 Herstellung eines Gewebe-Microarrays

Mit Hilfe der Gewebe-Microarray-Technik (TMA) können bis zu 1000 Gewebeproben gleichzeitig auf einem Objektträger untersucht werden. Dazu werden aus den in Paraffinblöcken eingebetteten Gewebeproben rohrförmige Stanzen (sog. Gewebezylinder) entnommen und parallel angeordnet in einen neuen Paraffinblock eingesetzt (Kononen et al. 1998). Die Gewebezylinder werden mit einer Hohlnadel, die einen Innendurchmesser von 0,6 mm besitzt, aus dem Spenderblock entnommen. In den Empfängerblock werden mit einem 0,6 mm dicken Bohrer Löcher gebohrt, in die diese Stanzen hineinpassen. So können bis zu 1000 Stanzen in einen Block gesetzt werden. Von diesem Block wiederum werden Paraffinschnitte angefertigt, auf denen entsprechend alle Gewebeproben vorhanden sind. Um sich auf diesen Schnitten besser orientieren zu können, werden die Gewebezylinder in Quadranten angeordnet. Entlang einer gedachten x- und y-Achse werden die Proben einer Zahl und einem Buchstaben zugeordnet, die deren genaue Position im TMA widerspiegeln. So ist sichergestellt, dass sich die Proben zuordnen lassen und keine Verwechslungen stattfinden.

Mit den hergestellten Schnitten, die viele Tumورproben auf einmal enthalten, lassen sich die Proben sehr viel einfacher und kostengünstiger untersuchen, als wenn sie sich einzeln auf Objektträgern befänden.

In dieser Arbeit wurden die Gewebe-Microarrays anschließend immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen das Protein HPGD angefärbt. Die ausführliche Beschreibung des Pa-

tientinnenkollektivs, das mit dem Gewebe-Microarray untersucht wurde ist unter 2.1.1 zu finden.

2.2.5 Statistik

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbeergebnisse und der Daten der Patientinnen wurde mit den Programmen SPSS Version 15 und Microsoft Excel 2000 gearbeitet. Mit SPSS wurden statistische Tests und die Bestimmung des Signifikanzniveaus durchgeführt. Microsoft Excel diente zur Aufarbeitung der Daten und zur Erstellung von Statistiken und Diagrammen.

Der per Immunhistochemie bestimmte Status der einzelnen Tumorproben (s. 2.2.3.2) wurde mit den klinischen Parametern der Patientinnen korreliert. Die p-Werte wurden mit dem Programm SPSS Version 15 bestimmt.

Bei klinischen Parametern mit zwei Ausprägungsmöglichkeiten (z.B. ER-Status negativ oder positiv) wurde der p-Wert per univariater logistischer Regressionsanalyse berechnet. Für klinische Parameter mit mehr als zwei Ausprägungsmöglichkeiten (z.B. prae-, peri- und postmenopausal) wurde der zweiseitige Korrelationstest nach Pearson verwendet.

In der multivariaten logistischen Regressionsanalyse wurde der HPGD-Status der Tumoren hinsichtlich der Prognosefaktoren „Rückfall“ und „krankheitsfreies Überleben“ der entsprechenden Patientinnen untersucht. Als Kovariaten wurden klinische Parameter der Patientinnen eingesetzt, die in der univariaten binär logistischen Regressionsanalyse einen signifikanten Zusammenhang mit den genannten Eigenschaften „Rückfall“ und „krankheitsfreies Überleben“ zeigten.

Mit dem Programm MedCalc 7.3 wurden die Kaplan-Meyer-Überlebenskurven erstellt. Mit ihnen soll die Überlebenswahrscheinlichkeit im zeitlichen Verlauf abgeschätzt werden. Zur Berechnung der Überlebenskurven wurden die Ausschlusskriterien der Patientinnen erweitert. Patientinnen, die bei Diagnosestellung Metastasen aufwiesen, sowie Patientinnen, die bereits weniger als vier Monate nach der Operation verstarben, wurden nicht in die Berechnung der Kaplan-Meyer-Kurven einbezogen.

Die hergestellten Videos des Migrations-Assays wurden mit der Software Revolution Media (Version 0-5-8 Okt. 08) ausgewertet. Das aufgezeichnete Video wurde in 22 Abschnitte unterteilt. Es ergaben sich sogenannte Tackingzeitpunkte. Das Programm bestimmte die Strecke,

die eine Zelle im Zeitraum zwischen zwei Zeitpunkten zurückgelegt hatte. Die gewonnenen Daten konnten in das Programm Excel 2000 exportiert und als Tabelle eingefügt werden.

Mit dem Programm Excel 2000 fand die ausführliche Datenanalyse statt. Es wurde die absolute Distanz berechnet, die eine Zelle zurückgelegt hatte. Diese Strecke wurde in Relation zur Zeit gesetzt und dadurch die Durchschnittsgeschwindigkeit bestimmt. Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil der Zeitpunkte, zu denen sich die Zelle bewegte, bestimmt. Dieser entspricht der Anzahl der Zeiträume zwischen zwei Tackingzeitpunkten, in denen eine Distanz zurückgelegt wurde, bezogen auf die Anzahl aller Zeiträume.

Aus den erhaltenen Werten (Distanz, Geschwindigkeit, Anteil der Zeitpunkte mit Migrationsaktivität) für die einzelnen Zellen wurden Durchschnittswerte und Standardabweichungen für die sechs Einzelmessungen berechnet. Mit dem t-Test wurde der p-Wert für die Paare (HPGD-siRNA-transfiziert versus scrambled-RNA-transfiziert) bestimmt.

Anschließend wurden die Werte aus den je drei Einzelmessungen zusammengefügt und erneut Durchschnitt, Standardabweichung und p-Wert berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant, p-Werte unter 0,01 als hoch signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der HPGD-Proteinexpression in Brustkrebsgewebe

3.1.1 Patientenkollektiv und immunhistochemische Färbung

Zum Nachweis der HPGD-Expression in Brustkrebstumoren wurden Tumorproben auf einem Tissue-Microarray (TMA, *deutsch*: Gewebe-Microarray) per Immunhistochemie angefärbt. Das Ziel bestand darin, eine mögliche Korrelation zwischen Proteinnachweis und klinischen Parametern sowie dem weiteren Krankheitsverlauf der Patientinnen zu überprüfen.

Von den 556 angefärbten Tumor- bzw. Lymphknotenproben löste sich bei 100 Proben während der immunhistochemischen Anfärbung die Tumorprobe vom Objektträger oder lag gefaltet vor. Über die Anfärbbarkeit von 51 Spots konnte keine Aussage getroffen werden, weil sich in der Schnittebene der Gewebeprobe keine Tumorzellen befanden. Aufgrund von Doppelbestimmungen konnten mit den 405 auswertbaren Spots Aussagen über 371 Proben getroffen werden. Diese setzten sich zusammen aus 295 Tumorproben und 76 Lymphknotenproben. Bei 50 Patientinnen lagen gleichzeitig Ergebnisse für die Proben aus Primärtumor und Lymphknoten vor. Die klinischen Parameter aller Patientinnen waren in Erst- und Follow-up-Untersuchungen erfasst worden und lagen zur Auswertung vor. Das Patientenkollektiv ist in Tab. 3.5 dargestellt.

Für jede Tumor- und Lymphknotenprobe wurde aus der Intensität der Färbung sowie dem Anteil der gefärbten Tumorzellen wie unter 2.2.3.2 beschrieben der entsprechende HPGD-Status bestimmt. Ein negativer HPGD-Status entspricht Gewebeproben, in denen die Tumorzellen sich nicht anfärbten oder sich ein geringer Anteil der Tumorzellen wenig intensiv anfärbte. Ein positiver HPGD-Status wurde Gewebeproben zugeordnet, in denen sich ein größerer Anteil der Tumorzellen mit stärkerer Intensität anfärbte.

Im Folgenden wird der Begriff „HPGD-PT-Status“ für den HPGD-Status einer Primärtumorprobe verwendet. „HPGD-LK-Status“ steht für den HPGD-Status einer Lymphknotenprobe.

Um die Färbeergebnisse zu veranschaulichen, ist im Folgenden stellvertretend für die Gesamtheit an Tumorproben je eine Gewebeprobe des entsprechenden Intensitätsgrades abgebildet

(Abb. 3.1 bis Abb. 3.7). Dabei ist zu beachten, dass die dargestellten Gewebeproben stellvertretend für einen Intensitätsgrad der Färbung stehen, der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen variiert. Keine der Lymphknotenproben zeigte eine Färbung im Intensitätsgrad 3.

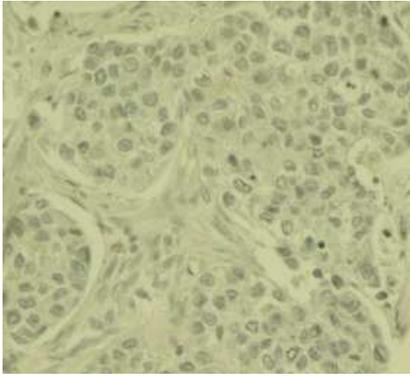


Abb. 3.1: Tumorprobe, Intensitätsgrad 0: invasiv duktal, pT2, N3, M0, GIII (20-fache Vergrößerung)

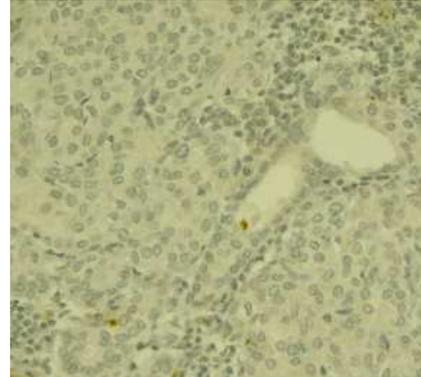


Abb. 3.2: Lymphknotenprobe, Intensitätsgrad 0: duktulo-lobulär, pT1, N1, M0, GII (20-fache Vergrößerung)

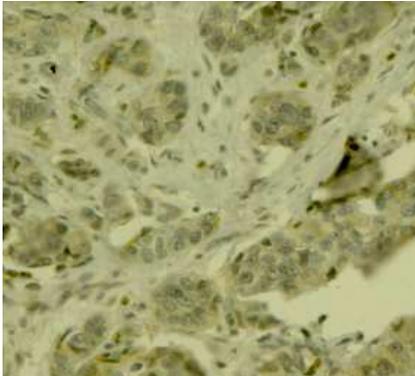


Abb. 3.3: Tumorprobe, Intensitätsgrad 1: invasiv duktal, pT2, N1, M0, GIII (20-fache Vergrößerung)

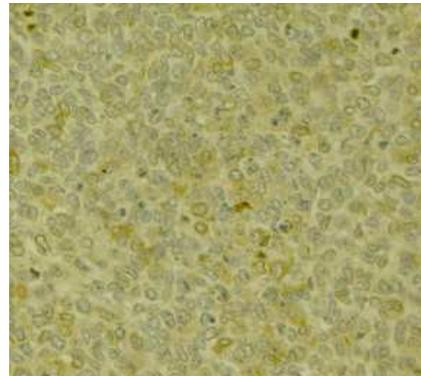
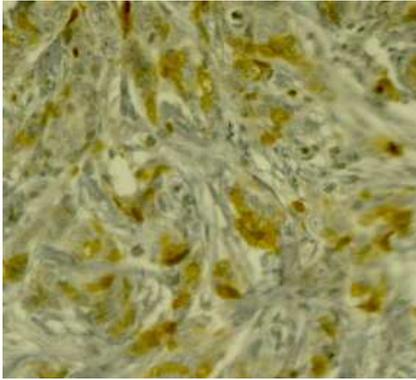
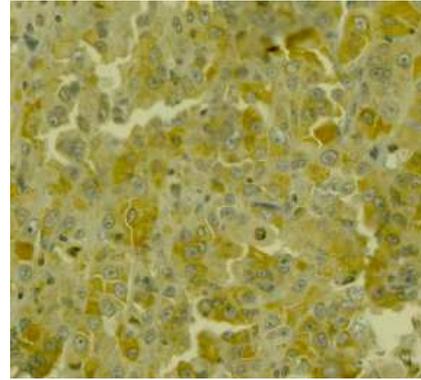


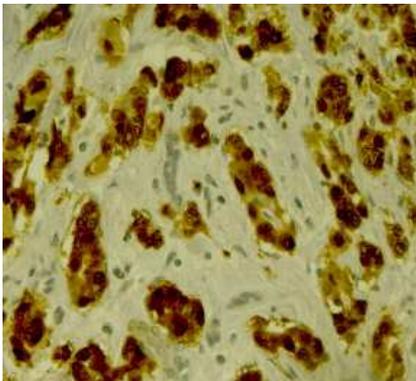
Abb. 3.4: Lymphknotenprobe, Intensitätsgrad 1: invasiv duktal, pT2, N1, M0, GIII (20-fache Vergrößerung)



*Abb. 3.5: Tumorprobe, Intensitätsgrad 2:
invasiv duktal, pT1, N0, M0, GII
(20-fache Vergrößerung)*



*Abb. 3.6: Lymphknotenprobe,
Intensitätsgrade 1 und 2 (Mischform):
invasiv duktal, pT2, N2, M0, GIII
(20-fache Vergrößerung)*



*Abb. 3.7: Tumorprobe, Intensitätsgrad 3:
invasiv duktal, pT1, N0, M0, GII
(20-fache Vergrößerung)*

Die Positivkontrolle mit gesundem Kolongewebe färbte sich intensiv an (s. Abb. 3.8). Als Negativkontrolle eingesetztes gesundes Lymphknotengewebe zeigte keine Färbung (s. Abb. 3.9). In Abb. 3.10 sind metastasierte Tumorzellen mit dem Färbeintensitätsgrad 1 zu erkennen, die sich in Lymphknotengewebe befinden.

Des Weiteren färbten sich in wenigen Gewebeproben einzelne verteilt im Bindegewebe liegende Zellen an, die als Makrophagen identifiziert wurden.

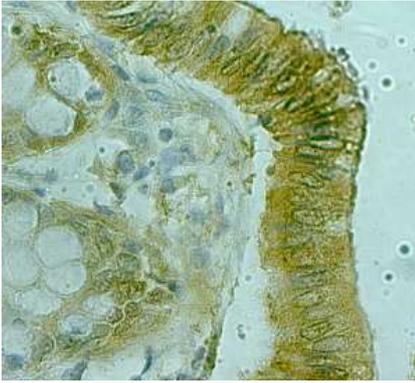


Abb. 3.8: gesundes Kolongewebe, Positivkontrolle (40-fache Vergrößerung)

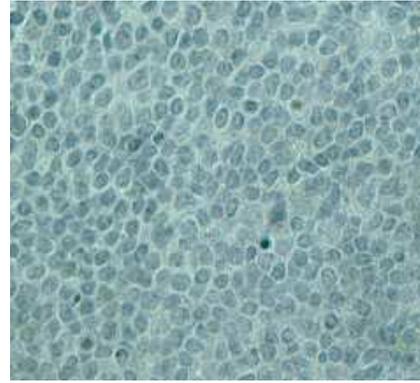


Abb. 3.9: gesundes Lymphknotengewebe, Negativkontrolle (40-fache Vergrößerung)

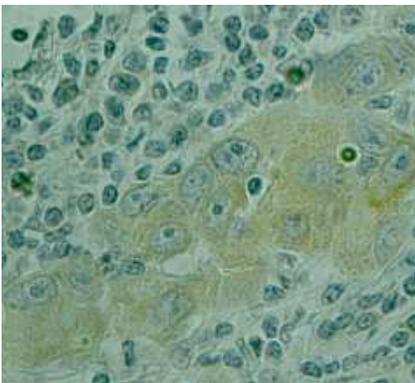


Abb. 3.10: metastasierte Tumorzellen in Lymphknotengewebe (40-fache Vergrößerung)

In der sich anschließenden Bestimmung des HPGD-PT-Status zeigte sich, dass 61 der 295 angefärbten Primärtumoren (21%) einen positiven HPGD-PT-Status erhielten. Den übrigen 234 Primärtumoren (79%) wurde ein negativer HPGD-PT-Status zugeordnet (s.Tab. 3.1).

Von den 76 Gewebeproben aus den Lymphknotenmetastasen erhielten 12 Proben den positiven HPGD-LK-Status (16%) und 64 Proben den negativen (84%). (s.Tab. 3.2)

Tab. 3.1: Färbeergebnis der immunhistochemischen Primärtumorfärbung

		HPGD-PT-Status			
		negativ		positiv	
	total	n	%	n	%
Primärtumoren	295	234	79	61	21

Tab. 3.2: Färbeergebnis der immunhistochemischen Lymphknotenfärbung

		HPGD-LK-Status			
		negativ		positiv	
	total	n	%	n	%
Lymphknotenmetastasen	76	64	84	12	16

Bei 50 Patientinnen lagen gleichzeitig Ergebnisse für die Proben aus Primärtumor und Lymphknoten vor (s.Tab. 3.3). Bei 39 dieser 50 Patientinnen (78%) stimmten HPGD-PT-Status und HPGD-LK-Status überein. Bei sieben Patientinnen (14%) hingegen war der HPGD-PT-Status positiv und im Gegensatz dazu der HPGD-LK-Status negativ. Bei vier Patientinnen (8%) erhielt der Primärtumor einen negativen HPGD-PT-Status während die Lymphknotenfärbung einen positiven HPGD-LK-Status ergab.

Tab. 3.3: Färbeergebnisse bei Patientinnen, für die sowohl ein Ergebnis der Primärtumorfärbung als auch der Lymphknotenfärbung vorlag.

		HPGD-LK-Status	
		negativ	positiv
HPGD-PT-Status	negativ	36	4
	positiv	7	3

3.1.2 HPGD-Expression: Korrelation mit klinischen Parametern

Die Korrelation mit klinischen Parametern ist in Tabelle 3.4 dargestellt. Unterschiedliche Fallzahlen kommen zustande, wenn bei einem Teil der Patientinnen die entsprechende klinische Angabe nicht bekannt ist. Die p-Werte wurden durch univariate logistische Regressions-

analyse (Eigenschaften mit zwei möglichen Ausprägungsformen, z.B. ER-Status) oder mit dem zweiseitigen Korrelationstest nach Pearson (Eigenschaften mit drei möglichen Ausprägungsformen, z.B. Tumorstadium) bestimmt.

Die berechnete Odd's Ratio (OR) bezeichnet das relative Risiko, das eine Patientinnengruppe gegenüber der anderen hinsichtlich eines bestimmten Ereignisses besitzt. So beträgt das Risiko einer Patientin mit positivem HPGD-Status, einen Rückfall zu erleiden, das 2,5-fache des Risikos, das eine Patientin mit negativem HPGD-Status besitzt. Das Konfidenzintervall (KI: 1,3-4,9) gibt den Bereich an, in dem das relative Risiko (OR) mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt.

Tab. 3.4: Korrelation der Färbeergebnisse mit klinischen Parametern. In der linken Spalte befinden sich die Ergebnisse der Primärtumorfärbungen, in der rechten Spalte die Ergebnisse der Lymphknotenfärbungen, „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

	HPGD-PT-Status						HPGD-LK-Status					
	tot n	negativ n %	positiv n %	p- Wert	Odds Ratio		tot n	negativ n %	positiv n %	p- Wert	Odds Ratio	
Histologie												
Duktal	206	160 77,7	46 22,3	n.s.		45	37 82,2	8 17,8	n.s.			
Lobulär	55	49 89,1	6 10,9			18	16 88,9	2 11,1				
Andere	34	25 73,5	9 26,5			13	11 84,6	2 15,4				
Alter												
unter Durchschnitt	143	110 76,9	33 23,1	n.s.		41	31 75,6	10 24,4	0,04	0,19		
über Durchschnitt	152	124 81,6	28 18,4			35	33 94,3	2 5,7		(0,04-0,9)		
Tumorstadium												
pT1	154	115 74,7	39 25,3	0,05		27	25 92,6	2 7,4	n.s.			
pT2	114	97 85,1	17 14,9			32	26 81,3	6 18,8				
pT3+4	26	22 84,6	4 15,4			17	13 76,5	4 23,5				
Lymphknotenstatus												
pNeg	185	148 80	37 20	n.s.								
pNpos	108	85 78,7	23 21,3									
Metastasen												
M0	276	220 79,7	56 20,3	n.s.		64	57 89,1	7 10,9	n.s.			
M1	11	9 81,8	2 18,2			8	5 62,5	3 37,5				
Grading												
GI	16	9 56,3	7 43,8	0,04		2	2 100	0 0	n.s.			
GII	161	126 78,3	35 21,7			37	32 86,5	5 13,5				
GIII	112	93 83	19 17			35	29 82,9	6 17,1				
Knochenmarkstatus												
negativ	207	163 78,7	44 21,3	n.s.		54	44 81,5	10 18,5	n.s.			
positiv	79	63 79,7	16 20,3			20	18 90	2 10				
Tumorgroße												
unter Durchschnitt	182	139 76,4	43 23,6	n.s.		34	32 94,1	2 5,9	n.s.			
über Durchschnitt	103	86 83,5	17 16,5			40	32 80	8 20				
Menopausaler Status												
perimenopausal	16	11 68,8	5 31,3	n.s.		4	3 75	1 25	n.s.			
prämenopausal	80	62 77,5	18 22,5			25	19 76	6 24				
postmenopausal	192	154 80,2	38 19,8			45	40 88,9	5 11,1				
Hormonrezeptoren												
negativ	54	44 81,5	10 18,5	n.s.		17	11 64,7	6 35,3	0,02	0,2		
positiv	241	190 78,8	51 21,2			59	53 89,8	6 10,2		(0,06-0,8)		
Her-2-Status												
negativ	63	50 79,4	13 20,6	n.s.		22	19 86,4	3 13,6	n.s.			
positiv	202	158 78,2	44 21,8			46	38 82,6	8 17,4				
Ki-67												
<20%	159	123 77,4	36 22,6	n.s.		40	34 85	6 15	n.s.			
>20%	106	85 80,2	21 19,8			27	22 81,5	5 18,5				
Rückfall												
nein	237	195 82,3	42 17,7	0,01	2,5	50	43 86	7 14	n.s.			
ja	49	32 65,3	17 34,7		(1,3-4,9)	24	19 79,2	5 20,8				
Krankheitsverlauf												
überlebt	256	209 81,6	47 18,4	0,07	2,2	58	50 86,2	8 13,8	n.s.			
gestorben	27	18 66,7	9 33,3	(n.s.)	(0,9-5,3)	16	13 81,3	3 18,8				
Krankheitsfreiheit												
ja	233	192 82,4	41 17,6	0,008	2,6	46	39 84,8	7 15,2	ns			
nein	45	29 64,4	16 35,6		(1,3-5,2)	21	19 90,5	2 9,52				

Es zeigt sich, dass die Tumoren von Patientinnen in Tumorstadium pT1 häufiger einen positiven HPGD-PT-Status haben (25,3%) als Tumoren von Patientinnen mit den prognostisch schlechteren Tumorstadien pT2 (14,9%) und pT3+4 (15,4%). Diese Unterschiede sind in der univariaten Analyse signifikant ($p = 0,05$).

Ähnliche Ergebnisse sind hinsichtlich des Gradings zu beobachten. In 43,8% der Tumoren mit Grade I ist der HPGD-Nachweis im Primärtumor positiv. In Tumoren mit dem prognostisch schlechteren Grade II (21,7%) und Grade III (17,0%) liegt dieser Anteil niedriger. Auch hier zeigt die univariate Analyse, dass die Beobachtungen signifikant sind ($p = 0,04$).

Des Weiteren ist zu beobachten, dass von den Patientinnen, die im weiteren Verlauf der Krankheit ein Rezidiv entwickelten 34,7% einen positiven HPGD-PT-Status besitzen. Bei den Patientinnen, die später kein Rezidiv bekommen haben, beträgt der Wert 17,7%. Diese Beobachtung ist signifikant ($p=0,01$). Die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu bekommen ist bei Patientinnen mit positivem HPGD-Nachweis im Primärtumor 2,5-fach (KI: 1,3-4,9) erhöht.

In Hinblick auf tödliche Verläufe zeigt die Statistik Parallelen. 33,3% der im Krankheitsverlauf sterbenden Patientinnen des untersuchten Kollektivs haben einen positiven HPGD-PT-Status, wohingegen dieser Prozentwert bei den überlebenden Patientinnen 18,4% beträgt. Diese Beobachtung ist jedoch nicht signifikant ($p = 0,07$).

Die Analyse kommt zu einem ähnlichen Ergebnis hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens der Patientinnen. Krankheitsfreies Überleben meint, dass die Patientinnen weder einen Rückfall hatten noch gestorben sind. Es stellt sich heraus, dass 35,6% der Patientinnen, die im weiteren Verlauf der Untersuchung entweder einen Rückfall bekommen oder versterben, einen positiven HPGD-Nachweis in der Primärtumorprobe besitzen. Dieser Prozentsatz liegt bei Patientinnen, die krankheitsfrei überleben mit 17,6% niedriger. Die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu bekommen oder im weiteren Verlauf der Krankheit zu sterben ist bei Patientinnen mit positivem HPGD-Nachweis im Primärtumor 2,6-fach erhöht (KI: 1,3-5,2). Diese Beobachtung ist hoch signifikant ($p = 0,008$).

Die Korrelation der restlichen klinischen Parameter mit dem HPGD-PT-Status zeigt keine signifikanten Zusammenhänge.

In den Lymphknotenmetastasen ist der HPGD-Nachweis in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen und vom Hormonrezeptorstatus der Tumoren verändert. Bei 24,4% der Patientinnen, deren Alter unter dem Durchschnitt der untersuchten Kohorte liegt ist der HPGD-Nachweis in den Lymphknotenmetastasen positiv. Bei den älteren Patientinnen ist dieser Prozentwert mit 5,7% niedriger. Diese Beobachtung ist signifikant ($p = 0,04$).

Außerdem zeigt sich, dass, während von den Hormonrezeptor-negativen Patientinnen 35,3% einen positiven HPGD-LK-Status haben, dieser Wert bei den Hormonrezeptor-positiven Patientinnen 10,2% beträgt. Auch diese Beobachtung ist signifikant ($p = 0,02$)

Die Korrelation der restlichen klinischen Parameter mit dem Ergebnis der Lymphknotenfärbung zeigt keine weiteren signifikanten Zusammenhänge.

In der multivariaten Analyse wurden im Anschluss diejenigen klinischen Parameter untersucht, die in der univariaten Analyse einen signifikanten Zusammenhang mit dem HPGD-Status aufwiesen. (s.Tab. 3.5)

Tab. 3.5: Multivariate Analyse der klinischen Parameter „Rückfall“ und „Krankheitsfreiheit“.

	HPGD-PT-Status						
	tot n	negativ		positiv		p-Wert	Odds Ratio
	n	%	n	%			
Rückfall							
nein	237	195	82,3	42	17,7	0,001	3,8
ja	49	32	65,3	17	34,7		(1,7-8,1)
Krankheitsfreiheit							
ja	233	192	82,4	41	17,6	0,001	3,7
nein	45	29	64,4	16	35,6		(1,7-8,1)

In der multivariaten Analyse wurden für das Ereignis „Rückfall“ als Kovariaten die klinischen Parameter Tumorstaging (T), Lymphknotenstatus (N), Metastasenstatus (M) und Tumorgröße eingesetzt, weil diese in der univariaten Analyse einen signifikanten Zusammenhang mit dem Ereignis „Rückfall“ zeigten. Es stellt sich in der multivariaten Analyse heraus, dass Patientinnen mit einem positiven HPGD-Nachweis im Primärtumor eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit haben, einen Rückfall zu erleiden ($p=0,001$). Die Wahrscheinlichkeit war im Vergleich zu Patientinnen mit einem negativen HPGD-Nachweis im Primärtumor 3,8-fach erhöht (KI: 1,7-8,1).

Die multivariate Analyse des Parameters „krankheitsfreies Überleben“ wurde mit den Kovariaten Tumorstaging (T), Lymphknotenstatus (N), Metastasenstatus (M), Grading (G) und Tumorgröße durchgeführt. Diese wurden eingesetzt, weil sie in der univariaten Analyse einen signifikanten Zusammenhang mit dem krankheitsfreien Überleben der Patientinnen aufwiesen. In der multivariaten Analyse zeigt sich, dass Patientinnen mit einem positiven HPGD-Nachweis im Primärtumor eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, zu sterben oder

einen Rückfall zu erleiden ($p=0,001$). Ihr Risiko ist im Vergleich zu Patientinnen mit negativem HPGD-Nachweis im Primärtumor 3,7-fach erhöht (KI: 1,7-8,1).

Die multivariate Analyse der erhobenen Daten kommt zusammenfassend zu dem Schluss, dass ein positiver HPGD-Nachweis im Primärtumor einen unabhängigen Risikofaktor für einen Rückfall darstellt. Des Weiteren ist der positive HPGD-Nachweis im Primärtumor ebenfalls ein unabhängiger Risikofaktor dafür, dass die Patientinnen den Brustkrebs nicht krankheitsfrei überleben.

3.1.3 HPGD-Expression und der weitere Krankheitsverlauf

Um zu überprüfen, ob der HPGD-Status in Zusammenhang mit einem kürzeren Überleben oder einem früheren Rückfall steht wurden die Kaplan-Meyer-Kurven berechnet. Dazu wurden die Patientinnen anhand des durchgeführten HPGD-Nachweises in zwei Gruppen unterteilt. Es existieren Angaben über alle 321 Patientinnen aus Follow-up-Untersuchungen über die Dauer des Überlebens und der Rezidivfreiheit. Aus der Kombination dieser Informationen ist es möglich, Überlebenskurven und Rückfallkurven zu bestimmen.

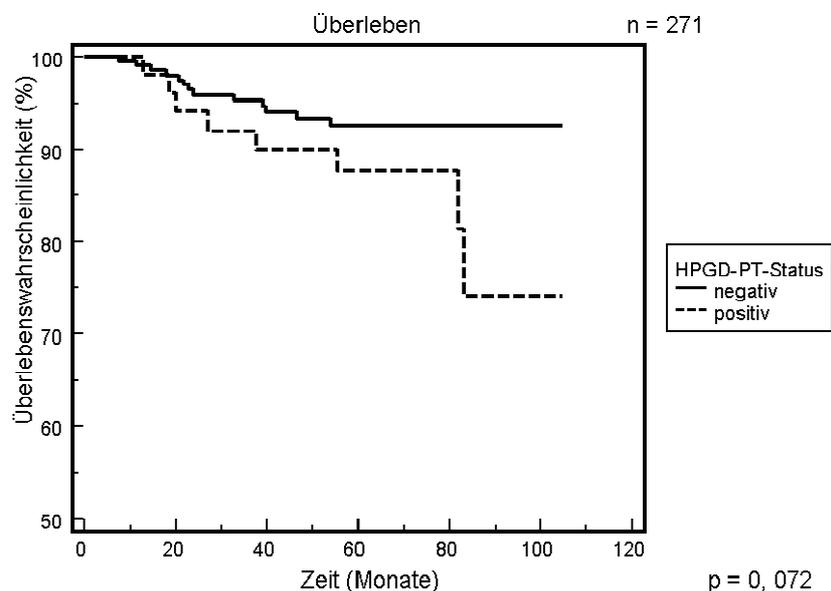


Abb. 3.11: Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen in Abhängigkeit des HPGD-PT-Status

In den Kaplan-Meyer-Überlebenskurven des Patientenkollektivs zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im Verlauf der Kurven (s. Abb. 3.11). In der Patientinnengruppe mit einem positiven HPGD-PT-Status sind zwei Jahre nach Diagnosestellung (24 Monate)

92% der Patientinnen am Leben. In der Patientinnengruppe mit negativem HPGD-PT-Status beträgt dieser Wert 95%. Nach fünf Jahren (60 Monate) leben noch 88% (positiver HPGD-PT-Status) bzw. 93% der Patientinnen (negativer HPGD-PT-Status). Am Ende des Beobachtungszeitraumes von 100 Monaten haben von den Patientinnen mit positivem Status 73% überlebt. Bei den Patientinnen mit negativem Status liegt dieser Prozentwert mit 93% deutlich höher.

Die beschriebenen Beobachtungen sind nicht signifikant ($p = 0,072$).

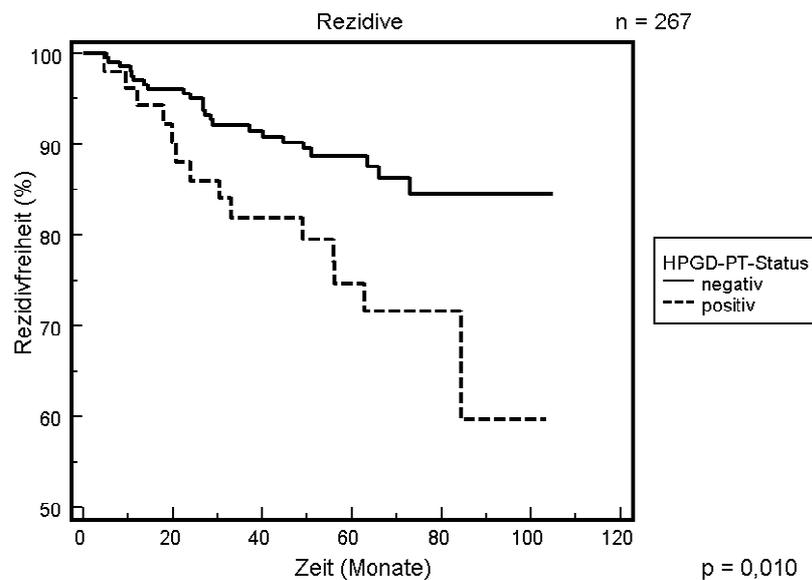


Abb. 3.12: Rezidivfreiheit in Abhängigkeit des HPGD-PT-Status

Die Analyse der Rezidivfreiheit in Abhängigkeit vom HPGD-PT-Status zeigt, dass Patientinnen mit einem positiven Status häufiger und früher Rezidive bekommen (s. Abb. 3.12). Nach 2 Jahren haben 86% der Patientinnen mit positivem HPGD-PT-Status kein Rezidiv entwickelt. In der Patientinnengruppe mit negativem HPGD-PT-Status liegt dieser Wert mit 93% höher. Es haben also zwei Jahre nach Diagnosestellung 14% der Patientinnen mit positivem und 7% der Patientinnen mit negativem HPGD-PT-Status ein Rezidiv entwickelt. Nach fünf Jahren haben 74% der Patientinnen mit positivem HPGD-PT-Status kein Rezidiv entwickelt. Bei Patientinnen mit negativem HPGD-PT-Status beträgt dieser Wert 89%. Nach 100 Monaten haben 60% der Patientinnen mit positivem Farbeergebnis kein Rezidiv entwickelt im Vergleich zu 85% der Patientinnen mit negativem Farbeergebnis. Diese Beobachtung ist signifikant ($p = 0,010$).

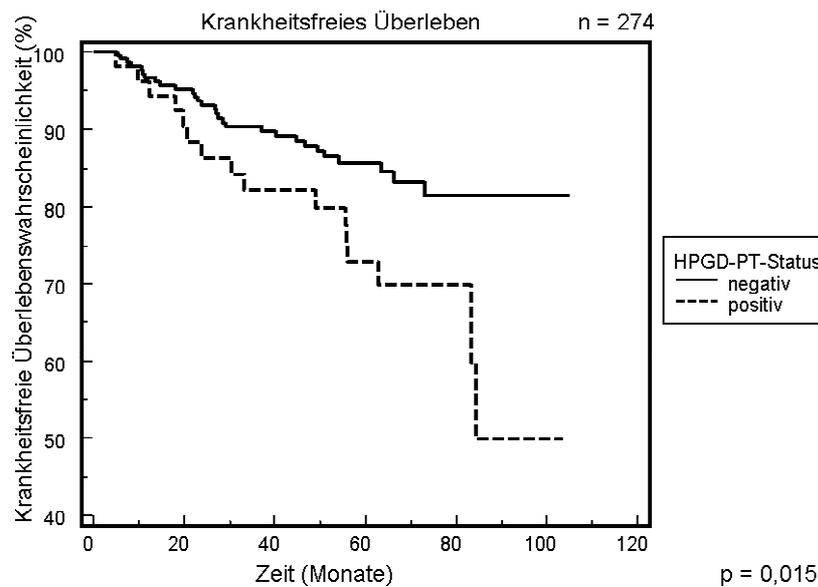


Abb. 3.13: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom HPGD-PT-Status

Werden die vorherigen beiden Analysen kombiniert, lässt sich eine Aussage darüber treffen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Patientinnen sowohl überleben als auch rezidivfrei sind. Es stellt sich heraus, dass auch hier die Patientinnen mit einem positiven HPGD-Nachweis eine schlechtere Prognose besitzen (s. Abb. 3.13). Nach zwei Jahren haben 84% der Patientinnen mit positivem HPGD-PT-Status überlebt und zusätzlich keinen Rückfall erlitten. Dieser Wert beträgt bei Patientinnen mit negativem HPGD-PT-Status 90%. Fünf Jahre nach der Operation haben 73% der Patientinnen mit positivem HPGD-PT-Status rezidivfrei überlebt im Gegensatz zu 85% der Patientinnen mit negativem HPGD-PT-Status. Am Ende des Beobachtungszeitraumes von 100 Monaten sind noch 50% der Patientinnen mit positivem HPGD-PT-Status am Leben und haben kein Rezidiv entwickelt. Dieser Wert liegt bei den Patientinnen mit negativem HPGD-Nachweis deutlich höher (80%). Diese Beobachtung ist ebenfalls signifikant ($p = 0,015$).

Es zeigt sich, dass die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu entwickeln oder zu sterben, bei Patientinnen mit einem positiven HPGD-PT-Status höher ist als in der Gruppe der Patientinnen mit negativem HPGD-PT-Status.

Die Analyse der Lymphknotenfärbung erlaubt ebenfalls, die Kaplan-Meier-Kurven für das Überleben, die Rezidivfreiheit sowie das krankheitsfreie Überleben zu bestimmen. In die Berechnung wurden dabei alle Patientinnen eingeschlossen, für die der HPGD-LK-Status be-

stimmt werden konnte (n=76) und für die Angaben über den entsprechenden klinischen Parameter vorlagen.

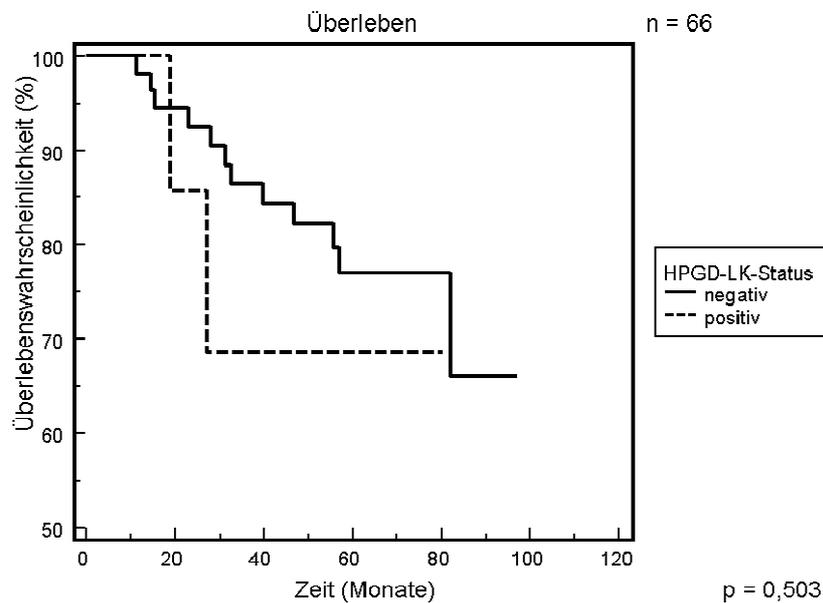


Abb. 3.14: Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen in Abhängigkeit vom HPGD-LK-Status

Es zeigt sich, dass am Ende des Beobachtungszeitraumes der Anteil der überlebenden Patientinnen in beiden Gruppen ungefähr gleich hoch ist (s. Abb. 3.14). Des Weiteren zeigt die Überlebenskurve für Patientinnen mit positivem HPGD-Status sehr große Stufen. In der Gruppe der Patientinnen mit negativem HPGD-Status sind diese kleiner. Die großen Stufen entstehen aufgrund der geringen Anzahl an Patientinnen in der untersuchten Gruppe.

Die Beobachtungen treffen ebenfalls für die Kurven der Rezidivfreiheit und des krankheitsfreien Überlebens zu (s. Abb. 3.15 und Abb. 3.16).

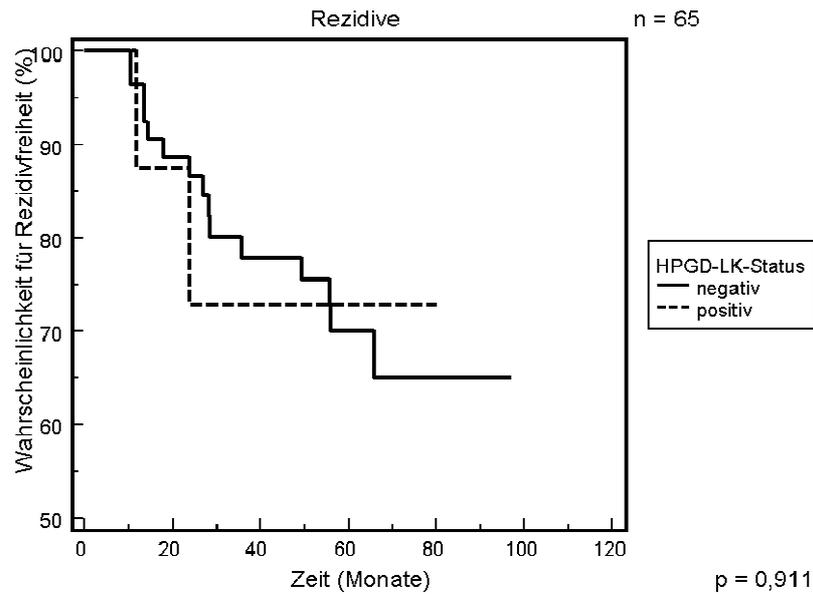


Abb. 3.15: Wahrscheinlichkeit für Rezidivfreiheit der Patientinnen in Abhängigkeit vom HPGD-LK-Status

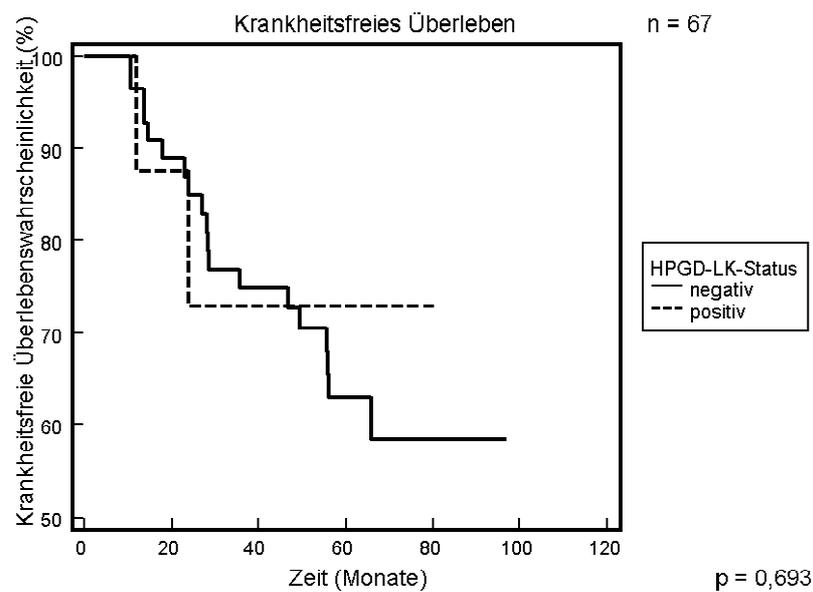


Abb. 3.16: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom HPGD-LK-Status

Es ist zu beobachten, dass die Patientinnen mit positivem HPGD-Nachweis in der Lymphknotenprobe keine signifikant veränderte Überlebens- oder Rezidivwahrscheinlichkeit haben (s. Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Die Wahrscheinlichkeit für krankheitsfreies Überleben ist ebenfalls nicht signifikant verändert (s. Abb. 3.16).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vermehrte Mengen an HPGD-Protein in den Primärtumorzellen im untersuchten Kollektiv signifikant häufiger bei Patientinnen mit dem prognostisch günstigeren Tumorstadium pT1 und Grade I gefunden wurden. Außerdem zeigte sich, dass Patientinnen, die im weiteren Krankheitsverlauf einen Rückfall erlitten oder nicht krankheitsfrei überlebten, signifikant häufiger einen positiven HPGD-Nachweis im Tumor besaßen. Die Kaplan-Meyer-Überlebenskurven zeigen ebenfalls, dass Patientinnen mit positivem HPGD-Nachweis signifikant häufiger und früher Rezidive erleiden oder nicht krankheitsfrei überleben.

Der positive HPGD-Nachweis stellt sich in der multivariaten Analyse als unabhängiger Risikofaktor für einen schlechteren Krankheitsverlauf dar (Rezidivfreiheit, krankheitsfreies Überleben).

Die Analyse der Lymphknotenfärbung zeigt einen signifikanten Zusammenhang mit jüngem Alter der Patientinnen und negativem Hormonrezeptorstatus.

3.2 Migrationsverhalten von Brustkrebszelllinien mit reduzierter HPGD-Expression

Um die Funktionen, die das Protein HPGD in der Zelle ausübt genauer zu untersuchen wurde ein Migrations-Assay durchgeführt. Der HPGD-Gehalt von Brustkrebszellen wurde reduziert und im Anschluss die Migrationsfähigkeit der so behandelten Zellen untersucht. Als Vergleich wurden unbehandelte Brustkrebszellen eingesetzt. Die Reduktion der Proteinmenge wurde durch quantitative Realtime-PCR und Immunfluoreszenzfärbung kontrolliert.

Es wurde die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (SA) gewählt, weil diese in vorangegangenen Experimenten eine hohe Beweglichkeit zeigte und HPGD exprimiert (Lehtinen et al. 2012).

3.2.1 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe dieser Färbemethode lassen sich spezifisch Proteine anfärben und nachweisen. In dieser Arbeit wurden vorhandene HPGD-Proteine mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert (Alexa-Fluor 488) und erscheinen infolgedessen unter dem Mikroskop grün. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und erscheinen blau. Aus der Intensität der Fluoreszenzfärbung lassen sich somit Rückschlüsse auf die Menge an vorhandenem HPGD-Protein ziehen.

Jeweils zwei Zytospins mit MDA-MB-231 (SA)-Wildtypzellen, HPGD-siRNA-transfizierten Zellen und scrambled-RNA-transfizierten Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt (s. Abb. 3.17 - 3.19).

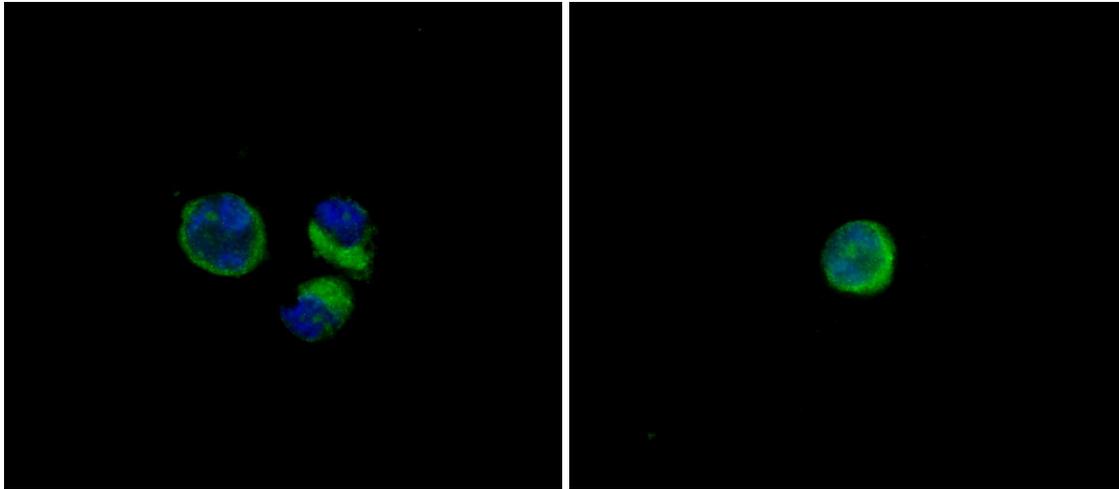


Abb. 3.17: MDA-MB-231 (SA) (Wildtyp, unbehandelt), Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI und HPGD-Antikörper mit Alexa-Fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG

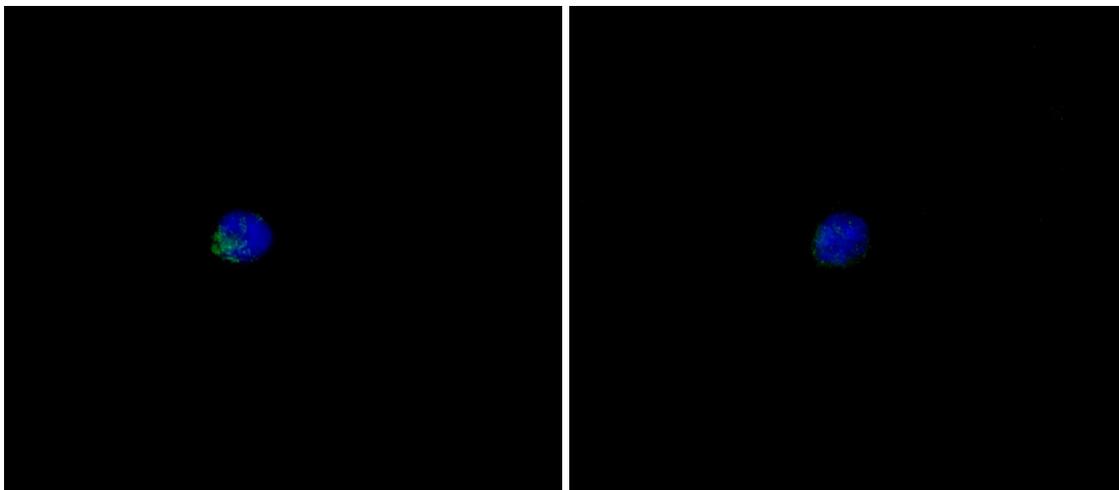


Abb. 3.18: MDA-MB-231 (SA) nach HPGD-siRNA-Transfektion, Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI und HPGD-Antikörper mit Alexa-Fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG

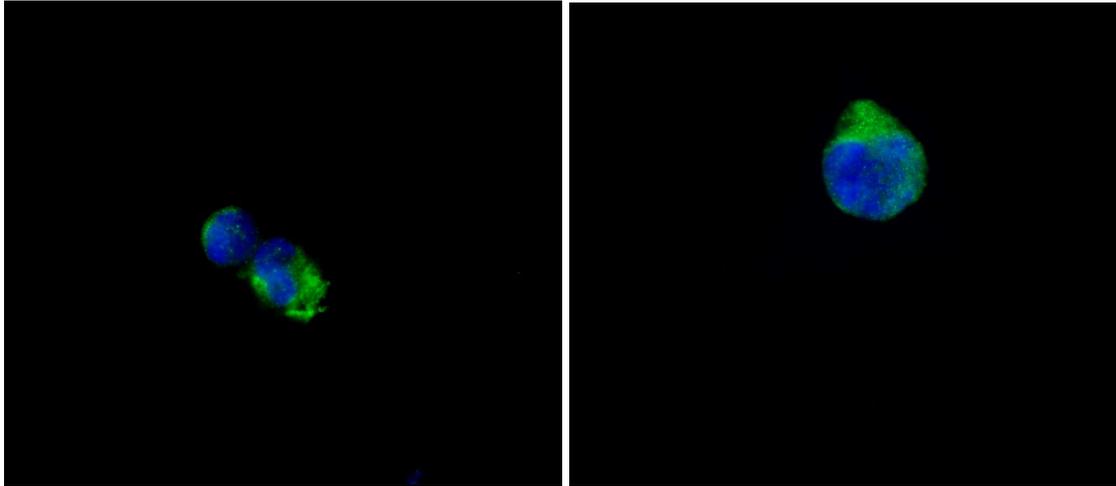


Abb. 3.19: MDA-MB-231 (SA) nach scrambled-RNA-Transfektion, Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI und HPGD-Antikörper mit Alexa-Fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG

In unbehandelten MDA-MB-231 (SA) Wildtyp-Zellen erscheinen die Kerne blau und das Zytoplasma intensiv grün (s. Abb. 3.17). Die Grünfärbung deutet auf reichlich vorhandenes HPGD im Zytoplasma hin. Der HPGD-Gehalt dieser Zellen ist entsprechend hoch.

Im Unterschied dazu zeigen die Brustkrebszellen, in denen per HPGD-siRNA-Transfektion der HPGD-Gehalt reduziert werden sollte keine oder eine schwache Grünfärbung des Zytoplasmas (s. Abb. 3.18). Die Menge an HPGD in diesen Zellen ist im Vergleich zu den Wildtypzellen reduziert.

In scrambled-RNA-transfizierten Brustkrebszellen erscheint das Zytoplasma grün. Die Intensität ist ähnlich stark wie in den Wildtypzellen (s. Abb. 3.19). Dies spricht dafür, dass in den scrambled-RNA-transfizierten Zellen und Wildtypzellen gleich viel HPGD-Protein vorhanden war.

3.2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Nachdem mittels RNA-Extraktion die gesamte RNA-Menge aus den Zellen extrahiert wurde (Standardprotokoll RNeasy Micro Kit, Qiagen) fand das Umschreiben in cDNA statt.

Zu Beginn wurde aus jeweils bis zu $5 \cdot 10^5$ Zellen die RNA gewonnen. Die gemessenen RNA-Konzentrationen betragen zwischen 24,4 und 183,6 ng/ μ l. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm lag bei allen Einzelmessungen zwischen 1,8 und 2,0.

Um vergleichbare Ergebnisse zu garantieren, wurden in der sich anschließenden cDNA-Synthese immer gleiche Mengen an RNA eingesetzt (200 ng). Das Umschreiben in cDNA

wurde nach dem Standardprotokoll (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas Life Sciences) durchgeführt.

3.2.3 Quantitative Realtime-PCR

Der Erfolg der siRNA-Transfektion wurde zusätzlich durch quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) kontrolliert. Es sollte gemessen werden, wie viel HPGD-mRNA nach der siRNA-Transfektion in den Zellen existierte.

Dazu wurde in der quantitativen Realtime-PCR die Menge an HPGD-mRNA und RPLP0-mRNA in den Zellen bestimmt. HPGD ist das Protein, dessen mRNA-Konzentration in den Zellen gemessen werden soll. RPLP0 ist ein Protein, das als Vergleichsparameter dient. Es stellt einen Teil der 60S-Untereinheit der Ribosomen in humanen Zellen dar und wird deshalb in den verschiedenen Körperzellen auf konstantem Niveau synthetisiert (Gabrielsson et al. 2005). Anhand der Menge an RPLP0-mRNA lässt sich die Anzahl der zu Beginn eingesetzten Zellen abschätzen. Eventuell voneinander abweichende Ausgangsmengen können bestimmt werden und aus falschen Anzahlen resultierende Fehler können vermieden werden. Die relative HPGD-Menge wurde also durch die Messung der RPLP0-Menge als Skalierungsparameter und anschließende Nutzung der ΔC_t -Methode bestimmt.

Es wurden von allen Messungen Triplikate erstellt, um eine möglichst hohe Genauigkeit sicherzustellen. Bei nicht übereinstimmenden Werten wurde der am stärksten abweichende Wert nicht in die weiteren Berechnungen einbezogen.

Die Ergebnisse der durchgeführten quantitativen Realtime-PCR sind tabellarisch zusammengefasst (s. Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Messergebnisse der Realtime-PCR

Probe	Mittelwert RPLP0	St.-abw. RPLP0	Mittelwert HPGD	St.-abw. HPGD	Differenz ΔC_t	$2^{\text{Differenz}}$	Quotient si./Kon.	<u>Ergebnis:</u> HPGD%
siRNA (exp1)	17,3	0,1	31,0	0,1	13,6	12766	11,4	8,8
Kontrolle (exp1)	17,9	0,0	28,0	0,4	10,1	1121		
siRNA (exp2)	25,0	0,2	36,8	0,0	11,7	3373	64,4	1,6
Kontrolle (exp2)	20,2	0,0	25,9	0,8	5,7	52		
siRNA (exp3)	20,9	0,1	29,9	0,0	9,0	516	263,2	0,4
Kontrolle (exp3)	27,2	0,2	28,1	0,3	1,0	2		

Die Menge an HPGD-mRNA konnte durch die Transfektion mit siRNA erfolgreich verringert werden. In den Experimenten 1, 2 und 3 waren 8,8%, 1,6% bzw. 0,4% der ursprünglichen Menge an HPGD-mRNA vorhanden.

Um die Reinheit der Proben hinsichtlich des PCR-Produktes zu untersuchen wurde die Melting-Curve gemessen. Diese zeigt einen einzelnen Peak. Es ist ein PCR-Produkt synthetisiert worden (s. Abb. 3.20). Die Primer haben spezifisch gebunden, es sind keine Nebenprodukte entstanden. Die Quantifikations-Analysen beziehen sich auf HPGD-mRNA bzw. HPGD-cDNA und nicht auf ein Nebenprodukt aus der qRT-PCR.

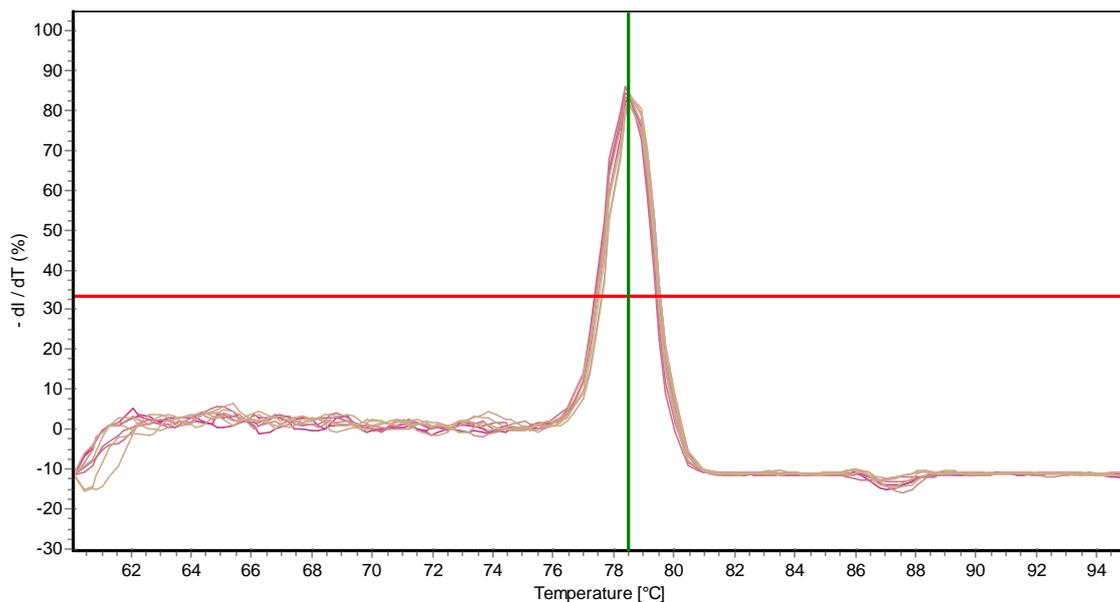


Abb. 3.20: Melting-Curve von vier qPCR-Produkten nach RPLP0-cDNA-qPCR. Es entsteht ein Peak bei 78,5 °C.

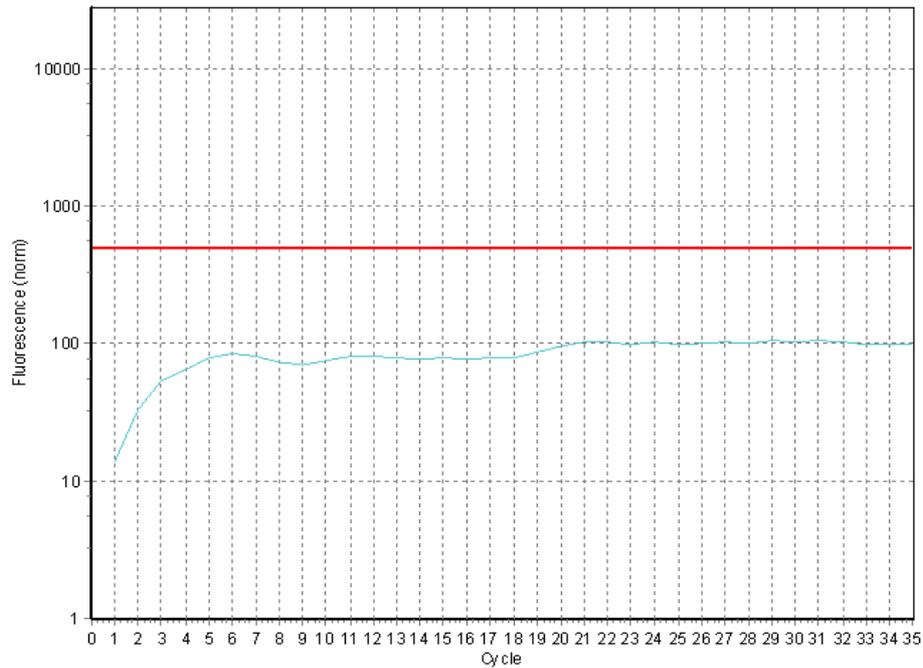


Abb. 3.21: Negativprobe mit H_2O . Der Schwellenwert wird nicht erreicht.

In der Negativprobe mit H_2O entstand kein PCR-Produkt (s. Abb. 3.21). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Proben und eingesetzten Substanzen nicht mit fremd-DNA kontaminiert waren. Die gemessenen Mengen an cDNA entsprechen den in den Zellen tatsächlich vorliegenden Mengen und wurden nicht durch später ungewollt hinzugefügte RNA oder DNA verfälscht.

In der quantitativen Realtime-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die Menge an HPGD-mRNA erfolgreich gesenkt werden konnte. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte zusätzlich bestätigt werden, dass auch die Menge an HPGD-Protein in den HPGD-siRNA-transfizierten Zellen reduziert ist.

3.2.4 Einzelzell-Migrations-Assay

Nach der erfolgreichen Reduktion der Menge an HPGD-Protein in den Brustkrebszellen wurde mit diesen der Einzelzell-Migrations-Assay durchgeführt um die Migrationsfähigkeit der Zellen zu untersuchen. Da die Zellen während der siRNA-Transfektion zur Reduktion der HPGD-Menge unterschiedlichen Chemikalien und Medien ausgesetzt wurden, die möglicherweise die Proteinexpression beeinflussen können, wurden alle Messungen zum Vergleich ebenfalls an Kontrollzellen durchgeführt. Die Kontrollzellen erfuhren die gleichen Behand-

lungsschritte wie die zu untersuchenden Zellen, jedoch wurde anstelle der HPGD-siRNA bei den Kontrollzellen scrambled-RNA eingesetzt. Diese besteht aus zufällig aneinandergereihten Basenpaaren und entwickelt keine Wirkungen. Somit kann ein möglicher Effekt der siRNA-Transfektionsmedien auf die Eigenschaften der Zellen kontrolliert werden.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt und in jedem Durchgang wurden, abgesehen von einem siRNA-Experiment, biologische Duplikate erstellt.

Das Verhalten der über einen Zeitraum von 16 Stunden per Videokamera beobachteten Zellen konnte im Anschluss analysiert werden.

Von den ca. 30 Zellen, die sich in einem Gesichtsfeld befanden, wurden bis zum Ende des Beobachtungszeitraums im Mittel ca. vier bis sechs Zellen apoptotisch. Die restlichen Zellen überlebten den Zeitraum. Die einzelnen Zellen wiesen ein sehr unterschiedliches Migrationsverhalten auf. Sowohl bei den HPGD-siRNA-transfizierten Zellen als auch bei den scrambled-RNA-transfizierten Kontrollzellen fanden sich Zellen, die sich wenig bewegten und Zellen, die größere Distanzen zurücklegten.

Das Gesichtsfeld zu Beginn des Migrations-Assays ist in Abb. 3.22 dargestellt. Die Zellen sind nummeriert und die im Beobachtungszeitraum von den einzelnen Zellen zurückgelegten Pfade mit Linien dargestellt.

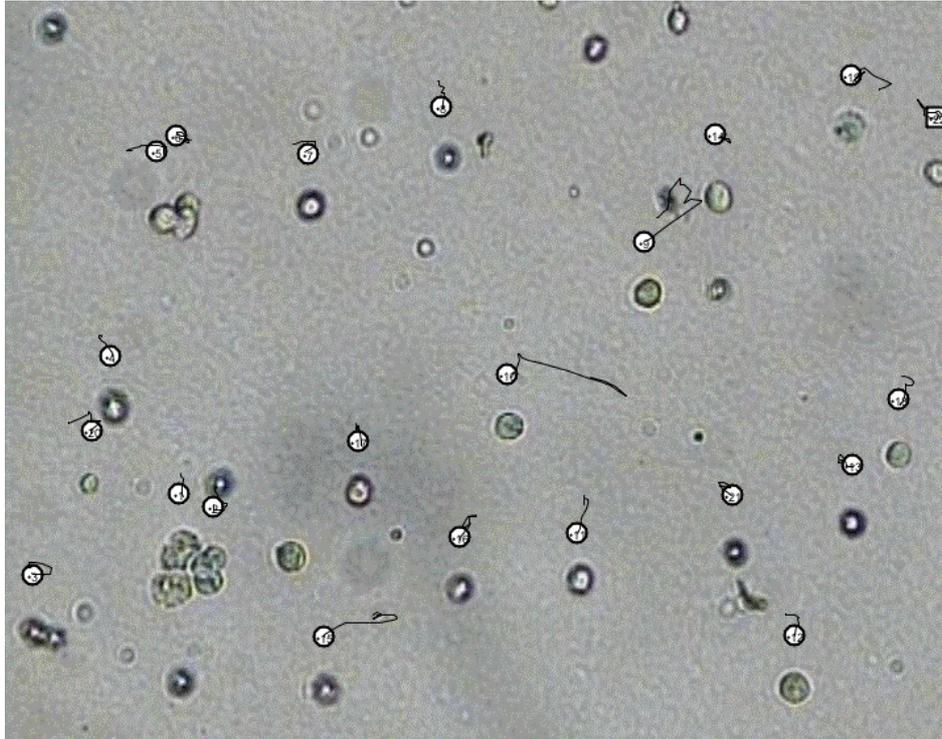


Abb. 3.22: *scrambled-RNA transfizierte MDA-MB-231 (SA), Experiment 3 (Kontrolle), Bild zu Beginn des Beobachtungszeitraumes, danach zurückgelegte Pfade sind eingezeichnet.*

3.2.5 Statistische Auswertung

Die per Computermaus nachvollzogenen Wege wurden in tabellarische Form überführt und die gewonnenen Daten ausgewertet. Das Programm Revolution Media teilte die Videos in 22 Tackingzeitpunkte auf. Es lieferte zu jeder einzelnen Zelle Informationen darüber, welche Strecke sie im Zeitraum zwischen zwei Tackingzeitpunkten zurückgelegt hatte. Aus der Summe aller einzelnen Streckenabschnitte ergab sich die zurückgelegte Distanz. Die Distanz dividiert durch die Dauer der Beobachtungszeit ergab die Durchschnittsgeschwindigkeit. Der Anteil der Zeitpunkte mit Migrationsaktivität ergab sich durch das Verhältnis der Zeiträume, in denen die zurückgelegte Distanz nicht null betrug zur Anzahl aller Zeiträume.

Im Folgenden sind die berechneten Werte in Übersichtstabellen (s. Tab. 3.7 - 3.9) und Abbildungen (s. Abb. 3.23.1 - 3.25.2) dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Zellen aus den Experimenten sind im Anhang zu finden (s. Tab. 6.1 - 6.3).

Tab. 3.7: Zurückgelegte Distanz der Zellen aus den drei Einzelmessungen und kombiniert: Mittelwerte und Standardabweichung, p-Wert aus t-Test

	Distanz		
	Mittelwert	St.-abw.	p-Wert
siRNA1	31,17	15,61	<0,01
cntrl1	59,92	18,19	
siRNA2	32,16	19,76	<0,01
cntrl2	51,09	20,00	
siRNA3	32,64	19,03	0,012
cntrl3	47,04	31,10	
alle siRNA	32,19	18,67	<0,01
alle cntrl	51,23	24,84	

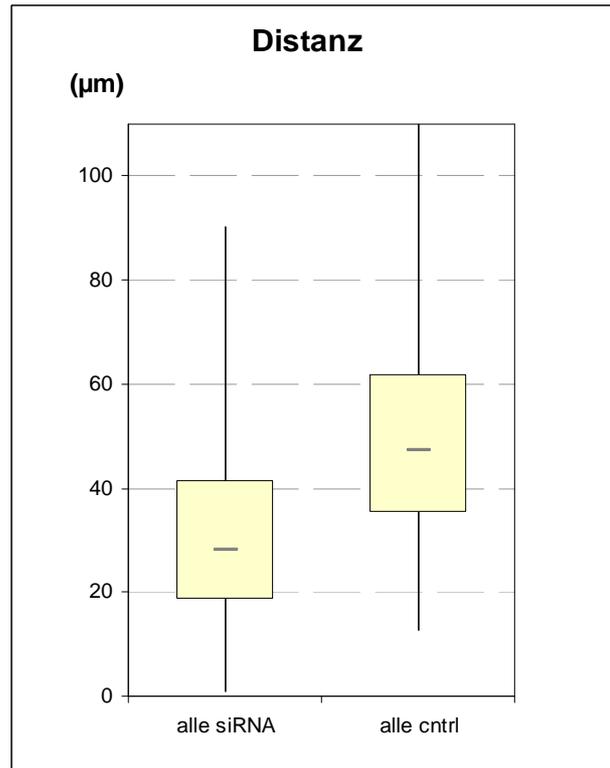


Abb. 3.23.1: Kombinierte Analyse der zurückgelegten Distanz

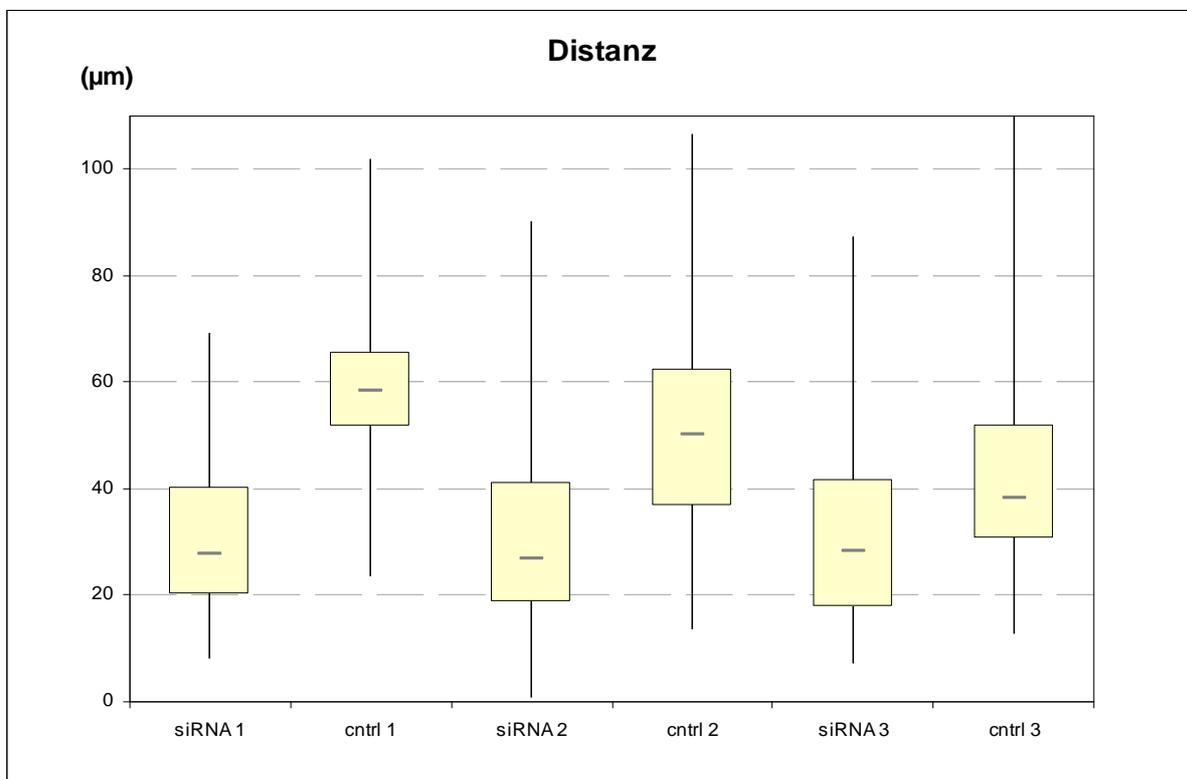


Abb. 3.23.2: Ergebnisse der Einzelmessungen der zurückgelegten Distanz

Tab. 3.8: Durchschnittsgeschwindigkeit der Zellen aus den drei Einzelmessungen und kombiniert: Mittelwerte und Standardabweichung, p-Wert aus t-Test

	Geschwindigkeit		
	Mittelwert	St.-abw.	p-Wert
siRNA1	1,30	0,65	<0,01
cntrl1	2,50	0,76	
siRNA2	1,89	1,16	<0,01
cntrl2	3,01	1,18	
siRNA3	1,59	0,93	<0,01
cntrl3	2,29	1,52	
alle siRNA	1,66	1,01	<0,01
alle cntrl	2,64	1,29	

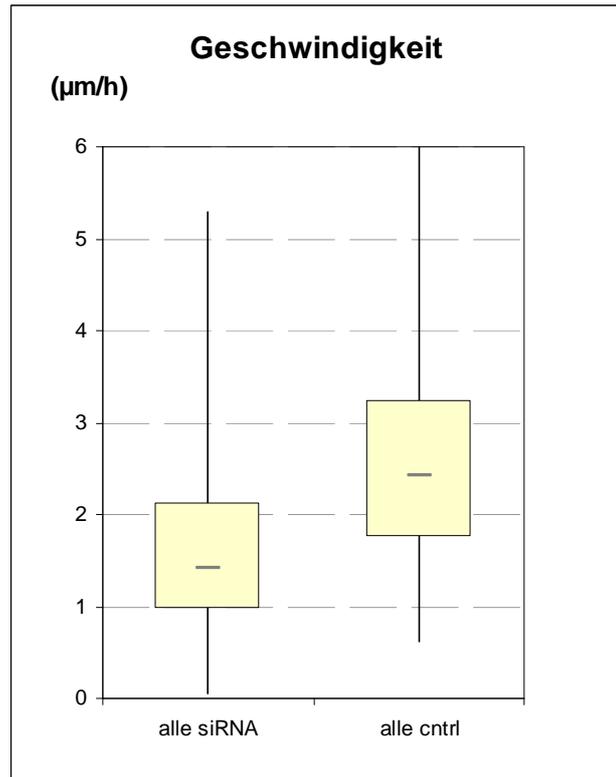


Abb. 3.24.1: Kombinierte Analyse der Durchschnittsgeschwindigkeit

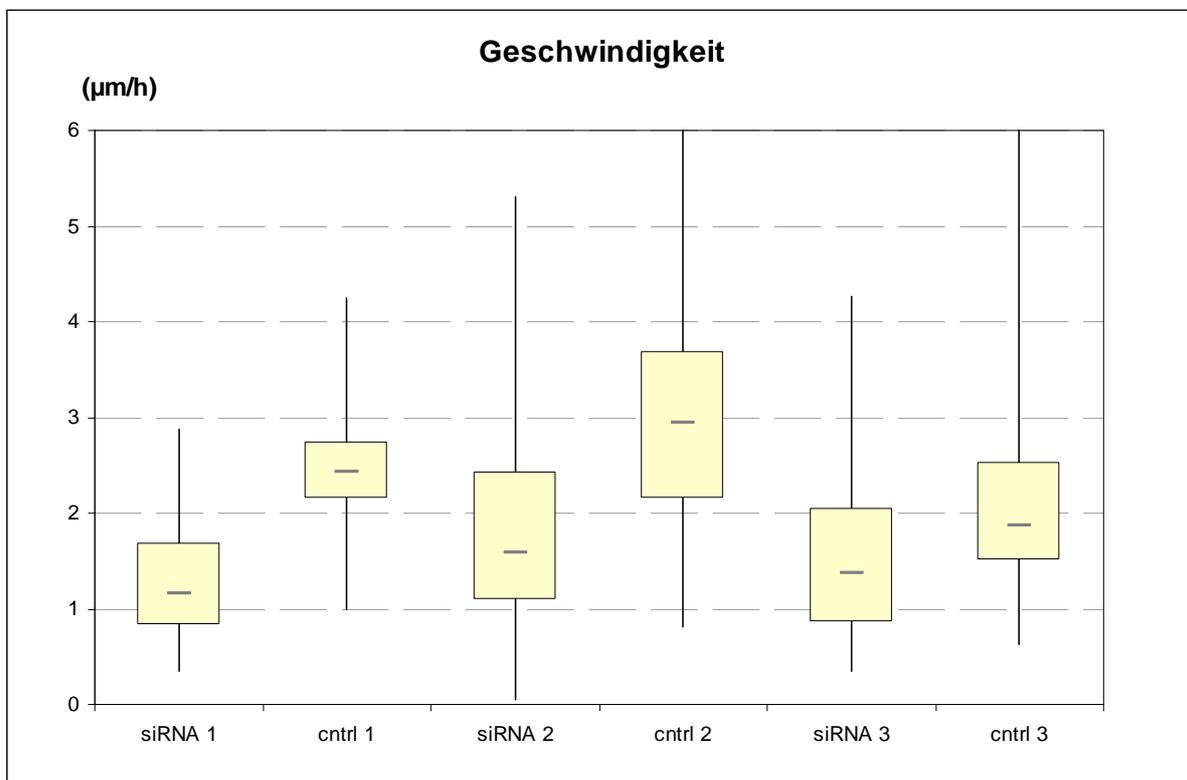


Abb. 3.24.2: Ergebnisse der Einzelmessungen der Durchschnittsgeschwindigkeit

Tab. 3.9: Anteil der Zeitpunkte mit Migrationsaktivität aus den drei Einzelmessungen und kombiniert: Mittelwerte und Standardabweichung, p-Wert aus t-Test

	Zeitpunkte mit Migrationsaktivität		
	Mittelwert	St.-abw.	p-Wert
siRNA1	0,65	0,20	<0,01
cntrl1	0,91	0,09	
siRNA2	0,67	0,21	<0,01
cntrl2	0,78	0,14	
siRNA3	0,64	0,20	0,015
cntrl3	0,74	0,16	
alle siRNA	0,65	0,20	<0,01
alle cntrl	0,79	0,15	

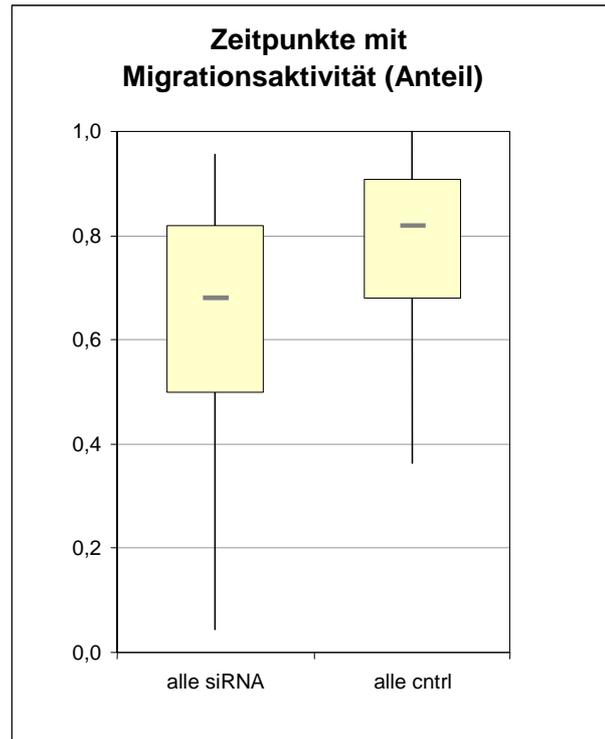


Abb. 3.25.1: Kombinierte Analyse der Zeitpunkte mit Migrationsaktivität (Anteil)

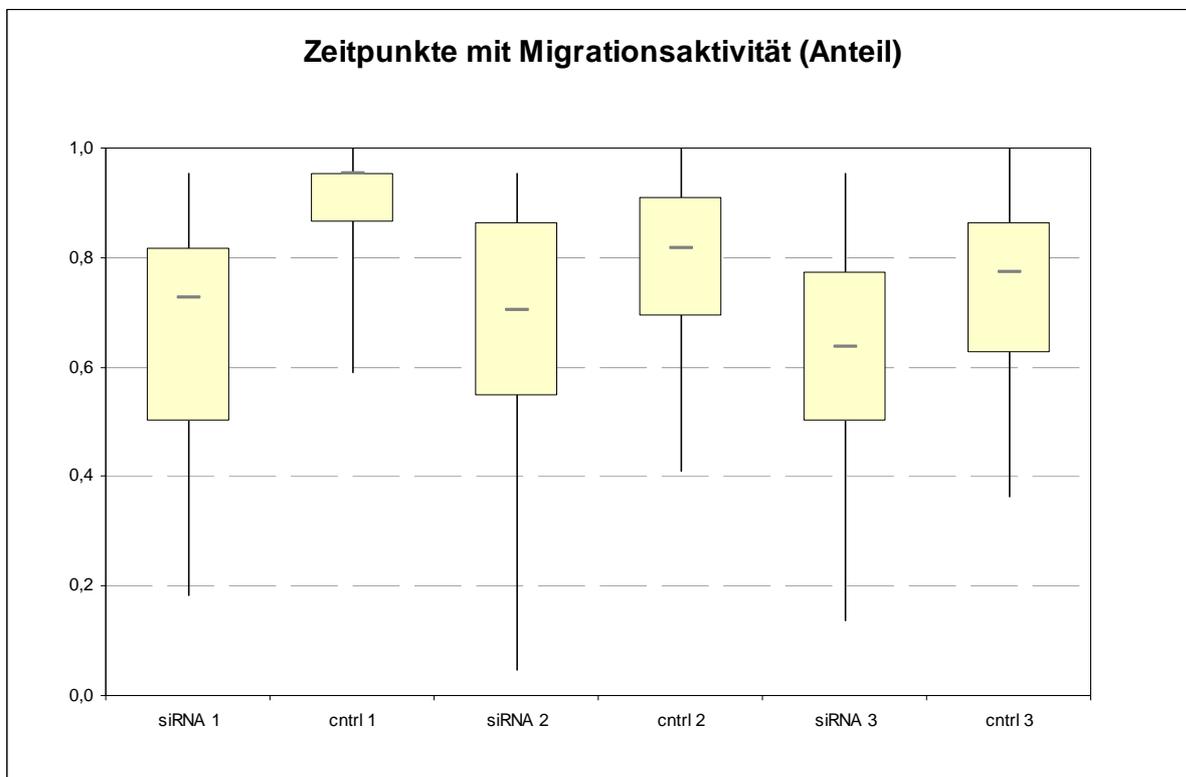


Abb. 3.25.2: Ergebnisse der Einzelmessungen der Zeitpunkte mit Migrationsaktivität (Anteil)

Die analysierten Parameter Distanz, Geschwindigkeit und Zeitpunkte mit Migrationsaktivität zeigen einen Zusammenhang mit der Art der eingesetzten Zellen.

So ist die zurückgelegte Distanz der Kontrollzellen mit $\sim 51\mu\text{m}$ größer als bei HPGD-siRNA-transfizierten Zellen ($\sim 32\mu\text{m}$). Die Kontrollzellen haben also eine größere Strecke zurückgelegt als die HPGD-siRNA-transfizierten Zellen. In den Boxplots der drei Einzelexperimente (s. Abb. 3.23.2) ist zu erkennen, dass in jeder einzelnen Messung die durchschnittlich von den Kontrollzellen überwundene Distanz größer war als die der HPGD-siRNA-transfizierten Zellen. Der Unterschied ist in den Einzelexperimenten eins und zwei hoch signifikant und in Experiment drei signifikant (s. Tab. 3.8). In der kombinierten Analyse der drei Einzelexperimente ist ebenfalls zu erkennen, dass die Kontrollzellen weiter wanderten (s. Abb. 3.23.1), auch hier ist der beobachtete Unterschied hoch signifikant (s. Tab. 3.7).

Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Kontrollzellen war mit $\sim 2,6\mu\text{m/h}$ ebenfalls höher als die der HPGD-siRNA-transfizierten Zellen mit $\sim 1,7\mu\text{m/h}$. In den Einzelexperimenten war die Geschwindigkeit der Kontrollzellen höher als die Geschwindigkeit der HPGD-siRNA-transfizierten Zellen (s. Abb. 3.24.2). Die beobachteten Unterschiede sind hoch signifikant (s. Tab. 3.8). In den Boxplots der kombinierten Analyse (s. Abb. 3.24.1) ist zu erkennen, dass die Kontrollzellen durchschnittlich schneller wanderten als die HPGD-siRNA-transfizierten Zellen. Auch dieser Unterschied ist hoch signifikant (s. Tab. 3.8).

Der Anteil der Zeitpunkte mit Migrationsaktivität beträgt bei den Kontrollzellen 79%. Sie bewegten sich während der Beobachtungsphase im Durchschnitt zu 79% der Zeitpunkte. Die siRNA-transfizierten Zellen zeigten in 65% der Zeitpunkte eine Migrationsaktivität und bewegten sich entsprechend seltener. In der kombinierten Analyse und in den Einzelexperimenten ist der beschriebene Gradient zu beobachten (s. Abb. 3.25.1 und Abb. 3.25.2). Der veränderte Anteil an Zeitpunkten mit Migrationsaktivität ist in den Experimenten 1 und 2 sowie in der kombinierten Analyse hoch signifikant verändert. In Experiment 3 ist er signifikant verändert (s. Tab. 3.9). In der kombinierten Analyse zeigt sich, dass sich die HPGD-siRNA-transfizierten Zellen hoch signifikant seltener bewegten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die HPGD-siRNA-transfizierten Zellen im Durchschnitt langsamer, über eine geringere Distanz und seltener als die Kontrollzellen bewegten. Die Mittelwerte sind entsprechend verschoben. In keiner der elf Einzelmessungen

bewegten sich die HPGD-siRNA-transfizierten Zellen durchschnittlich schneller oder weiter als die Kontrollzellen.

Der mit dem t-Test berechnete p-Wert ist in fast allen Vergleichen kleiner als 0,01 und in den restlichen Messungen geringer als 0,05. Die Veränderungen sind also entweder hochsignifikant ($<0,01$) oder signifikant ($<0,05$). Alle beobachteten Eigenschaften der unterschiedlich behandelten Zellen stellen sich bei kombinierter Analyse der Messergebnisse als hoch signifikant dar.

4 Diskussion

Brustkrebs ist mit weltweit mehr als 1,3 Millionen neuen Fällen pro Jahr eine der häufigsten Krebserkrankungen der Frau (Ferlay et al. 2010). Das Auftreten von Fernmetastasen stellt im Krankheitsverlauf ein kritisches Ereignis dar. Die durchschnittliche Überlebensprognose von Brustkrebspatientinnen wird durch vorhandene Fernmetastasen stark reduziert und beträgt nach dem ersten Auftreten von Knochenmetastasen noch ca. 20 Monate (Coleman und Rubens 1987). Aus diesem Grund wird ein besseres Verständnis der zur Metastasenentstehung beitragenden biologischen Prozesse angestrebt.

Die entscheidende Herausforderung bei der Behandlung von Brustkrebspatientinnen bleibt weiterhin, für jede einzelne Patientin die für sie optimale Therapie auszuwählen. Die große Variabilität der Brustkrebstumoren untereinander macht es erforderlich, spezielle Therapie-Schemata zu entwickeln. Um die wegweisende Entscheidung, welche Patientin welche Therapie erhält, zu optimieren und dadurch unnötiges Leid zu mindern, ist es erforderlich, weitere prädiktive Faktoren zu identifizieren, die eine Therapieempfehlung ermöglichen. Einige prädiktive Faktoren, die mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert sind, wurden bereits entdeckt (z.B. positiver Lymphknotenstatus, schlechte histologische Differenzierung, Größe des Tumors) (Valagussa et al. 1978, Kollias et al. 1997). Welche Eigenschaften der Tumoren darüber hinaus einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf besitzen und dadurch eine optimale Therapieempfehlung ermöglichen, ist Gegenstand intensiver Forschung.

In sich zum Teil widersprechenden Untersuchungsergebnissen stellte sich heraus, dass die Eigenschaften der 15-Hydroxyprostaglandinhydrogenase (HPGD) sie zu einem Protein mit möglichem Einfluss auf den Krankheitsverlauf machen. Es wird vermutet, dass die Hauptaufgabe der HPGD im Abbau von Prostaglandin E₂ (PGE₂) zu inaktiven Metaboliten besteht (Tai et al. 2007, Tatsuwaki et al. 2009). Der Gegenspieler der HPGD, die Cyclooxygenase 2 (COX-2), ist an der Bildung von PGE₂ beteiligt. Über diese Funktionen sind beide Enzyme in den COX-2/PGE₂-Signalweg eingebunden (Tai et al. 2006). Welche Funktionen die HPGD darüber hinaus besitzt, ist nicht geklärt.

Da die Rolle des COX-2/PGE₂-Signalweges in der Krebsentstehung bereits seit längerer Zeit Gegenstand intensiver Forschung ist und einige der gewonnenen Ergebnisse nur schwer miteinander zu vereinbaren sind, scheint weitergehende Forschung dringend notwendig. In vie-

len Arbeiten wurden die Einflüsse des COX-2/PGE₂-Signalweges auf die Karzinogenese bereits untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt häufig auf den Wirkungen von COX-2 und PGE₂ (Sheng et al. 2001). In wenigen Arbeiten stand dagegen jedoch die Rolle der HPGD im Fokus (Tai et al. 2007). Der Effekt der HPGD auf die Krebsentstehung ist weiterhin unklar, weil bisher nur einige kleinere Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt wurden. Diese beziehen sich zum großen Teil auf Tumoren anderer Entitäten. Außerdem existieren keine Studien zur prognostischen Relevanz mit größeren Fallzahlen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die HPGD auf die Entstehung und Progression von Brustkrebs ausübt. Per immunhistochemischem Nachweis in Brustkrebstumorproben an einem großen Patientenkollektiv sowie anschließender Korrelation mit klinischen Parametern sollte eine mögliche prognostische Relevanz veränderter HPGD-Mengen untersucht werden. Zusätzlich wurde in Brustkrebszellen, die sehr beweglich und entsprechend aggressiv sind, die HPGD-Menge reduziert, um im Anschluss einen möglichen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen zu kontrollieren. Die Fähigkeit zur Migration lag im Fokus, weil sie eine kritische Eigenschaft darstellt, die Tumorzellen erlangen müssen, um Metastasen auslösen zu können. Tumorzellen müssen sich von einem Ort im Körper zu einem anderen bewegen können, wenn sie sich vom Primärtumor lösen und an einem anderen Ort anwachsen wollen.

In der durchgeführten immunhistochemischen Anfärbung von HPGD-Proteinen in 295 Tumorproben zeigte sich, dass 21% der Primärtumoren HPGD auf hohem Niveau exprimieren. Im gesunden Brustgewebe der Proben konnte HPGD nicht nachgewiesen werden. Lediglich einzelne als Makrophagen identifizierte Zellen im umliegenden Gewebe färbten sich an. Als Negativkontrollen eingesetztes gesundes Lymphknotengewebe zeigte keinen Proteinnachweis, die mit gesundem Kolongewebe durchgeführte Positivkontrolle färbte sich intensiv an. Da HPGD ein zytoplasmatisches Enzym ist, war die intensive Färbung in den meisten Tumorproben tatsächlich auf das Zytoplasma beschränkt.

Die im Anschluss durchgeführte Korrelation mit klinischen Parametern der Patientinnen zeigte, dass das Auftreten von HPGD in den Tumorzellen hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens und des Auftretens von Rezidiven mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Für Patientinnen mit einem positiven HPGD-Nachweis war die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu bekommen oder nicht krankheitsfrei zu überleben, signifikant erhöht. Auch bezüglich des

Gesamtüberlebens hatten die Patientinnen mit HPGD-positiven Tumoren insgesamt ungünstige Krankheitsverläufe, die Unterschiede stellten sich jedoch als nicht signifikant heraus. In der multivariaten Analyse der Daten zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu bekommen, für Patientinnen, die an einem HPGD exprimierenden Tumor erkrankt waren 3,8-fach (KI: 1,7-8,1) erhöht ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht krankheitsfrei überleben ist ebenfalls 3,7-fach (KI: 1,7-8,1) erhöht. Diese erstmals an einem großen Patientenkollektiv gewonnenen Daten deuten an, dass HPGD bei Brustkrebs die Funktion eines Onkogens besitzt.

Diese Beobachtungen können ebenfalls durch die Ergebnisse der Lymphknotenfärbung gestützt werden. Es zeigt sich, dass das Vorliegen von HPGD in der Lymphknotenprobe signifikant mit prognostisch ungünstigen Faktoren (negativer Hormonrezeptorstatus und niedriges Erkrankungsalter) assoziiert ist und somit einen Hinweis auf das Vorliegen eines aggressiven Tumors gibt.

Überraschenderweise stellte sich in der univariaten Analyse der Daten aus den Primärtumoren heraus, dass das Vorliegen von HPGD in den Primärtumorzellen grenzwertig signifikant ($p=0,05$) mit niedrigem Tumorstadium und signifikant ($p=0,04$) mit dem niedrigen Grade I assoziiert ist. Es wäre zu erwarten, dass die positive HPGD-Expression entweder einen Zusammenhang mit prognostisch ungünstigen Eigenschaften oder keinen Zusammenhang zeigt. Niedriges Tumorstadium und niedriges Grade sind hingegen prognostisch günstige Eigenschaften. Es ist möglich, dass die HPGD in stark dedifferenzierten Zellen (Grade III) in geringen Mengen vorliegt, weil die zur Erhöhung der HPGD-Menge notwendigen Substanzen und Enzyme nicht mehr exprimiert werden.

Bei 50 Patientinnen war es möglich, sowohl den HPGD-LK-Status als auch den HPGD-PT-Status zu bestimmen. In 78% der Fälle stimmten die beiden Eigenschaften überein. Die von den Primärtumoren in die Lymphknoten gewanderten Zellen veränderten in diesen Fällen ihre Eigenschaften hinsichtlich der HPGD-Expression nicht. Bei 8% (4/50) der untersuchten Proben wurde HPGD in den Lymphknotenmetastasen exprimiert, nicht jedoch im Primärtumor. Es ist möglich, dass jene Zellen, die HPGD in hohem Maße exprimieren, eher zur Migration fähig waren und deshalb in die Lymphknoten wandern konnten. Die so befähigten Zellen machen nur einen Teil des Primärtumors aus, der deshalb einen negativen HPGD-PT-Status erhält. Bei 14% (7/50) der Probenpaare fand sich HPGD im Primärtumor, nicht jedoch in den Lymphknotenproben. Eine mögliche Erklärung ist, dass die durch HPGD besser zur Migration befähigten Tumorzellen in die Lymphknoten metastasierten und dass dort die Verringerung des HPGD-Spiegels einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen mit sich brachte.

Ein niedrigerer Anteil HPGD-positiver Tumorzellen und deshalb negativer HPGD-LK-Status wäre die Folge.

Zur HPGD-Expression bei Brustkrebstumoren existieren nach unserem Kenntnisstand derzeit drei Studien. In einer großen *in silico* Datenanalyse wurde die HPGD-mRNA-Menge in normalem Brustgewebe (n=13) und Brusttumorproben (n=957) untersucht (Lehtinen et al. 2012). Es zeigte sich, dass HPGD in einer Untergruppe der Tumoren in hohem Maße exprimiert wurde. Die zusätzlich bestimmten Kaplan-Meyer-Kurven zeigten ein signifikant schlechteres Überleben für Patientinnen mit hoher HPGD-Expression (p=0,029). Die hier vorgelegte Arbeit ist Teil der Studie von Lehtinen et al. 2012, die genannten Daten basieren jedoch auf einem anderen Patientenkollektiv und wurden ebenfalls unabhängig von den hier gewonnenen Ergebnissen erhoben und ausgewertet.

In einer anderen kleineren Untersuchung von Mammakarzinomproben (n=19) und gesundem Brustgewebe (n=21) stellte sich heraus, dass die HPGD-Proteinexpressionsraten in Brustkrebsgewebe signifikant höher sind als in normalem Gewebe (Thill et al. 2010).

Im Gegensatz dazu zeigte sich in einer kleinen Studie, dass in 36% der untersuchten Mammakarzinome (n=26) eine auf unter 50% der Kontrollen reduzierte HPGD-mRNA-Expression vorlag (Wolf et al. 2006). Die hohe HPGD-mRNA-Expression war signifikant mit prognostisch günstigen Faktoren (positiver ER-Status und niedriges Staging) assoziiert.

Die Hypothese, dass das Vorhandensein von HPGD einen ungünstigen Einfluss auf die Prognose der Patientinnen besitzt, wird auch durch neue an Prostatakarzinomen gewonnene Ergebnisse bekräftigt (Vainio et al. 2011). In dieser Studie zeigten Vainio et al. (2011), dass HPGD in fortgeschrittenen und metastasierten Prostatakarzinomen überexprimiert wird. Bei 23% der Patienten (11/47) mit metastasiertem Prostatakarzinom konnte eine starke HPGD-Proteinexpression nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich, dass das Wachstum sowie das Überleben der Prostatakrebs-Zelllinie LNCaP von HPGD abhängen. Diese Ergebnisse deuten auf einen wachstumsstimulierenden sowie antiapoptotischen Effekt von HPGD hin.

Die Rolle von HPGD ist ebenfalls in anderen Geweben untersucht worden. In 19 Paaren von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und gesundem Lungengewebe war die HPGD-mRNA-Menge auf unter 50% des Normalgewebes reduziert (Ding et al. 2005), während bei Darmkrebstumoren in 85% der untersuchten Kolonkarzinomproben (n=23) im Vergleich zu nicht-

malignem Darmgewebe sowohl die HPGD-mRNA-Menge (Northern-Blot) als auch die HPGD-Proteinexpression (Western-Blot) reduziert war (Backlund et al. 2005).

Des Weiteren existieren drei Untersuchungen zur Rolle von HPGD bei Magenkarzinomen (Jang et al. 2008, Kim et al. 2011 und Tatsuwaki et al. 2009). Sie kommen zu dem Ergebnis, dass die HPGD-Menge in den untersuchten Magentumoren reduziert ist. So war die HPGD-Proteinmenge in Tumorproben (n=28) im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant geringer (Jang et al. 2008) während in 74% der Magenkarzinomproben (n=70) HPGD-Proteine nicht nachgewiesen werden konnten (Kim et al. 2011). Außerdem war im Vergleich zu gesundem Gewebe der HPGD-Spiegel in Magenadenomen (n=4) verringert und in Magenkarzinomen (n=4) zusätzlich reduziert (Kim et al. 2011).

In der bisher größten veröffentlichten Studie zeigten Tatsuwaki et al. (2009), dass in 65% der Magenkarzinomproben (n=210) keine HPGD-Expression nachgewiesen werden konnte und dass in Magenkarzinomproben (n=26) im Vergleich zu gesundem Gewebe 5-fach niedrigere HPGD-mRNA-Mengen vorliegen (Tatsuwaki et al. 2009). Außerdem war der immunhistochemische Nachweis von HPGD-Protein (n=71) bei 49% der Proben negativ und mit kürzerem Überleben assoziiert ($p=0,005$) (Tatsuwaki et al. 2009).

Auf den ersten Blick widersprechen einige dieser Daten den hier gewonnenen Ergebnissen. Bei genauer Betrachtung zeigt sich jedoch, dass bei einer Aussage über hohe oder niedrige HPGD-Mengen der Vergleichsparameter entscheidend ist. Während in den angeführten Arbeiten die HPGD-Menge in den Tumoren meist mit Normalgewebe verglichen wurde, fand hier eine Unterscheidung der Tumoren untereinander statt. In dieser Arbeit wurde in der Gesamtheit der untersuchten Mammakarzinome eine Gruppe von Tumoren identifiziert, die HPGD auf einem höheren Niveau synthetisieren als die anderen Tumoren. Inwiefern sich die Tumoren mit niedrigen HPGD-Mengen vom umgebenden gesunden Gewebe unterscheiden, war im Unterschied zu den genannten Arbeiten anderer Gruppen nicht Gegenstand der Untersuchung.

Unsere Ergebnisse sind überraschend angesichts der Vermutung, dass die Haupteffekte von HPGD wahrscheinlich über den Abbau von PGE_2 vermittelt werden (Ding et al. 2005). PGE_2 wurde in einigen vorangehenden Studien als Onkogen beschrieben. Erhöhte Mengen HPGD würden den Abbau dieser Substanz fördern und die Onkogenität senken. Die durch vermehrt im Gewebe vorhandenes PGE_2 hervorgerufenen Effekte stimmen mit vielen der von Hanahan

und Weinberg eingeführten „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan und Weinberg 2000) überein. So kann PGE₂ die Apoptose hemmen (Sheng et al. 1998) und die Selbstversorgung der Zellen mit Wachstumssignalen (Greenhough et al. 2009) sowie proangiogenetische Wirkung (Fukuda et al. 2003) fördern. Die Toleranz gegenüber proapoptischen Signalen (Tsuji und DuBois 1995) und die Fähigkeit zur Invasion und Migration (Sheng et al. 2001) wird durch PGE₂ ebenfalls unterstützt.

Welche Wirkungen HPGD jedoch - abgesehen von dem Effekt auf den PGE₂-Spiegel - besitzt, ist weiterhin ungeklärt. Es ist möglich, dass HPGD, sobald es in hohen Mengen vorliegt, einen anderen Einfluss auf die Zellen ausübt als bei physiologischen Gewebespiegeln. Um diese Hypothese zu überprüfen, führten unsere Kooperationspartner einen Wundheilungsassay durch, der Rückschlüsse auf die Migrations- und Proliferationsfähigkeit von Zellen zulässt (Lehtinen et al. 2012). Einer konfluent wachsenden Zellkolonie wurde eine künstliche Wunde zugefügt; im Anschluss wurde die Heilungsfähigkeit der umgebenden Zellen beobachtet. Sind diese in der Lage, sich fortzubewegen und zu teilen, wird die Wunde schnell verschlossen. Die Migrations- und Proliferationsfähigkeit kann eingeschätzt werden. Brustkrebszellen mit per HPGD-siRNA-Transfektion reduzierten HPGD-Spiegeln wurden mit Kontrollzellen verglichen. Zellen mit verringerten HPGD-Mengen waren signifikant weniger in der Lage, zu wandern und sich zu teilen, um die Wundfläche wieder zu verschließen. Weil die Unterscheidung zwischen Zellteilung und -proliferation mit dieser Untersuchungsmethode nicht möglich ist, wurde in dieser Arbeit ein Einzelzell-Migrations-Assay durchgeführt, der diese Trennung zulässt.

Die Migrationsfähigkeit ist für Tumorzellen Voraussetzung dafür, Fernmetastasen auszubilden und deshalb aus therapeutischer Sicht ein kritisches Ereignis. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen wurde ein Migrations-Assay mit Brustkrebszellen durchgeführt. Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um die hochaggressive Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (SA). Der HPGD-Gehalt der Zellen wurde vorübergehend per siRNA-Transfektion verringert und der Erfolg der Transfektion mittels Immunfluoreszenz (s. Abb. 3.17 bis 3.19) und quantitativer Realtime-PCR (s. Tab. 3.6) kontrolliert. Es stellte sich heraus, dass sich die Zellen mit höherem HPGD-Spiegel hoch signifikant öfter, schneller und über eine längere Distanz bewegten.

Diese Beobachtung stützt die Ergebnisse des in einer anderen Studie durchgeführten Wundheilungsassays (Lehtinen et al. 2012) und die Vermutung, dass HPGD eine Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) spielt (Lehtinen et al. 2012). Ihre Untersuchungsergebnisse lassen annehmen, dass HPGD die EMT fördert. Der Gewebespiegel an mesenchymalen Markern war auf Grund der Herunterregulation von HPGD reduziert. Erhöhte HPGD-Mengen würden also eine Zunahme an mesenchymalen Markern und darüber die epithelial-mesenchymale Transition fördern.

Die EMT ist für Epithelzellen wichtig, um die Fähigkeit zur Migration und Invasion zu erlangen (Behrens et al. 1989). Sie verändern ihre Morphologie von epithelial zu mesenchymal, verlieren also ihre basal-apikale Polarität und lösen Zellkontakte auf, um die Fähigkeit zur Migration zu erlangen (Thiery 2003). Die so veränderten Zellen sind eher in der Lage, an einen anderen Ort des Körpers zu gelangen und Metastasen zu bilden. Im Migrations-Assay zeigte sich, dass Zellen mit hohem HPGD-Gehalt stärker zur Migration befähigt sind als Zellen mit niedrigem HPGD-Gehalt. Aus diesem Grund kann die Beobachtung aus der immunhistochemischen Färbung, dass Patientinnen, die Tumoren mit hohem HPGD-Gehalt haben, eine schlechtere Prognose besitzen, durch die Ergebnisse des Migrations-Assays untermauert werden. Schließlich kann ein Primärtumor, in dem sich Zellen mit hoher Beweglichkeit befinden, eher Metastasen auslösen und so die Prognose der betroffenen Patientin verschlechtern als ein Tumor, der diese Eigenschaften nicht besitzt.

Ähnliche Ergebnisse wurden an Lungentumorzellen beschrieben (Tai et al. 2007). Es wurde der Effekt von HPGD auf die Zellmorphologie analysiert. Eingesetzte Lungen-Adenokarzinom-Zellen (A549-Zellen) veränderten ihre Morphologie von epithelial zu mesenchymal sobald sie HPGD überexprimierten. Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen HPGD-Expression und mesenchymalen Markern auf den Zellen (N-cadherin und Fibronectin) sowie eine inverse Korrelation mit epithelialen Markern (E-cadherin und β -catenin). Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate von Lehtinen und sind ein Hinweis darauf, dass HPGD in die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in fördernder Weise involviert ist.

Weitere Arbeiten zu den Wirkungen von HPGD auf die Zellmigration existieren derzeit noch nicht; in zwei Arbeiten wurden dagegen die Effekte von PGE_2 auf die Migrationsfähigkeit untersucht (Sheng et al. 2001, Buchanan et al. 2003). Die Wirkung von PGE_2 auf die Morpho-

logie von Kolonkarzinomzellen (LS-174) wurde analysiert. Es stellte sich heraus, dass sie vermehrt Zellfortsätze und -ausläufer bilden, eine erhöhte Beweglichkeit besitzen und die Organisation der Zellen in Kolonien gestört wird (Sheng et al. 2001). Des Weiteren waren mit PGE₂ inkubierte Zellen häufiger in der Lage, sich zu bewegen und eine Distanz zu überwinden (Buchanan et al. 2003).

Bei den eingesetzten Zellen handelte es sich in beiden Fällen um Kolonkarzinomzellen und nicht, wie in dieser Arbeit, um Mammakarzinomzellen. Es ist möglich, dass PGE₂ in Abhängigkeit vom Gewebetyp verschiedene Wirkungen verursacht. Des Weiteren ist nicht zufriedenstellend geklärt, inwiefern HPGD Wirkungen besitzt, die unabhängig von PGE₂ vermittelt werden.

Dass die Rolle des COX-2/PGE₂-Signalweges kompliziert und nicht komplett verstanden ist, wird durch eine zunehmende Anzahl von Erkenntnissen, die noch nicht in Einklang miteinander zu bringen sind, gestützt. So zeigte sich, dass die Anzahl und Größe der intestinalen Tumoren bei Mäusen reduziert war, wenn ihnen regelmäßig das PGE₂-Analogon 16,16-dimethyl-PGE₂ injiziert wurde (Wilson und Potten 2000). Des Weiteren zeigte sich an COX-2-überexprimierenden transgenen Mäusen, die infolgedessen erhöhte PGE₂-Spiegel im Hautgewebe besaßen, dass sie resistenter gegenüber tumorinduzierenden Maßnahmen waren (Bol et al. 2002). Wenn PGE₂ also tumorinhibierende Wirkungen besitzt, wie diese beiden Arbeiten nachweisen konnten, wären erhöhte HPGD-Spiegel mit dem Auftreten von Tumoren vergesellschaftet.

Eine Vielzahl an Veröffentlichungen geht davon aus, dass HPGD ein Tumorsuppressor ist. Diese Annahme beruht auf diversen Experimenten, jedoch auch auf der Beobachtung, dass die Wirkungen von PGE₂ eher als tumorinduzierend und wachstumsfördernd eingeordnet werden können, denn als tumorunterdrückend. Der erhöhte Spiegel an PGE₂ wird dabei meist auf eine Überexpression von COX-2 zurückgeführt, sodass sich die Tumor-reduzierende Wirkung von selektiven COX-2-Hemmern erklären ließe. Dass das Abbauenzym von PGE₂ zur Regulation des PGE₂-Gewebespiegels beiträgt, wurde dabei lange außer Acht gelassen. Außerdem zeigt sich, dass Arbeiten zum COX-2/PGE₂-Signalweg existieren, die zu dem Ergebnis kommen, dass die Wirkungen von PGE₂ nicht so einfach wie anfangs vermutet sind und dass entsprechend die Komplexität dieses Signalweges nicht zu unterschätzen ist. Welche Wirkungen HPGD ausübt, die nicht mit einer Veränderung des PGE₂-Spiegels zusammenhängen, ist weiterhin ungeklärt. Zusätzlich hängt die Wirkung der einzelnen beteiligten En-

zyme und Metabolite womöglich von weiteren bisher unbekanntem Faktoren ab (z.B. Art des Gewebes, Hypoxie). Über zahlenmäßig größere Untersuchungen der HPGD-Menge in Tumoren verschiedener Entitäten und ihren Einfluss auf die Prognose der entsprechenden PatientInnen lässt sich hoffentlich die prognostische und womöglich therapeutische Relevanz dieses Enzyms besser einschätzen. Um den Signalweg besser verstehen und gegebenenfalls zielgerichtete Medikamente entwickeln zu können, die über eine Beeinflussung des COX-2/PGE₂-Signalweges oder die Aktivität der HPGD wirken, ist weitere Forschung auf diesem Gebiet notwendig.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die Hydroxyprostaglandinhydrogenase (HPGD) einen Einfluss auf die Entstehung und die Progression des Mammakarzinoms ausübt. Dazu wurde ein Tissue-Microarray mit Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen erstellt. Dieser enthielt sowohl Proben aus den Primärtumoren als auch aus den Lymphknoten der Patientinnen. Die vorhandene Menge an HPGD-Protein in den unterschiedlichen Geweben wurde immunhistochemisch bestimmt; in der sich anschließenden statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wurde die prognostische Relevanz der HPGD genauer analysiert.

Des Weiteren sollte der Einfluss der HPGD auf die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen genauer untersucht werden. Dazu wurde die Menge an HPGD-Protein in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (SA) per siRNA-Transfektion vorübergehend gesenkt und der Erfolg dieser Reduktion mittels Realtime-PCR sowie Immunfluoreszenzfärbung kontrolliert. Im Anschluss fand die Bestimmung der Migrationsfähigkeit der so vorbehandelten Zellen in einem Einzelzell-Migrationsassay statt.

Die durchgeführte immunhistochemische Färbung zeigte in 21 % der 295 Tumorproben sowie in 16 % der 76 Lymphknotenproben eine hohe HPGD-Proteinkonzentration in den Krebszellen (s. Tab. 3.1 und Tab. 3.2). Für 50 Patientinnen lag sowohl ein Ergebnis für die Primärtumor- als auch für die Lymphknotenprobe vor. Bei 78 % dieser Proben stimmten die beiden Ergebnisse überein (s. Tab. 3.3).

Die statistische Aufarbeitung der gewonnenen Daten zeigte, dass der Nachweis von HPGD-Protein in den Primärtumorzellen signifikant mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert ist (s. Tab. 3.4). Patientinnen, die im weiteren Krankheitsverlauf keinen Rückfall erlitten, besaßen in 18 % der Fälle einen positiven HPGD-Nachweis. Bei Patientinnen mit Rückfall war dieser Anteil auf 35 % erhöht. Dieser Unterschied ist sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse der Daten signifikant (s. Tab. 3.4 und 3.5). Ein ähnlicher Zusammenhang findet sich in Bezug auf die Krankheitsfreiheit. Patientinnen, die im weiteren Krankheitsverlauf sowohl überlebten als auch krankheitsfrei blieben, hatten in 18 % der Fälle einen positiven HPGD-Nachweis. Bei den anderen Patientinnen waren 36 % der Primärtumorproben HPGD-positiv. Auch dieser Unterschied erweist sich in der univariaten und der multivariaten Analyse als signifikant (s. Tab. 3.4 und 3.5). Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen, dass Patientinnen mit Primärtumoren, die HPGD auf niedrigem Niveau exprimieren, signifikant seltener und später Rezidive erleiden und zusätzlich länger

krankheitsfrei überleben (s. Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HPGD bei Mammakarzinomen die Funktion eines Onkogens besitzt.

Im zusätzlich durchgeführten Migrationsassay konnte außerdem gezeigt werden, dass HPGD die Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration fördert. Nachdem per Realtime-PCR (s. Tab. 3.6) und Immunfluoreszenzfärbung (s. 3.2.1) die erfolgreiche Reduktion der HPGD-Mengen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich im Migrationsassay, dass die Zellen mit hohem HPGD-Gehalt in großem Maße in der Lage waren, sich zu bewegen. Sie wanderten weiter (s. Abb. 3.23.1) und schneller (s. Abb. 3.24.1) und bewegten sich häufiger (s. Abb. 3.25.1). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die Überexpression von HPGD die Mobilität und darüber hinaus das Metastasierungspotenzial von Brustkrebszellen erhöht. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Verschlechterung der Prognose von Patientinnen mit hohen HPGD-Spiegeln stellt das durch HPGD gesteigerte Metastasierungspotenzial der Brustkrebszellen dar. Ist in den Primärtumoren der Patientinnen vermehrt HPGD vorhanden, so kann die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen gefördert werden und die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Metastasen ist erhöht. Die Prognose der Patientinnen wird dadurch ungünstiger.

Es ist möglich, dass HPGD seine Wirkungen über veränderte PGE₂-Spiegel vermittelt. Inwiefern HPGD darüber hinaus Einfluss auf die Zelle ausübt, ist weiterhin nur unzureichend geklärt. Es wäre aus diesem Grund interessant zu untersuchen, inwiefern veränderte HPGD-Mengen einen Einfluss auf den PGE₂-Spiegel der eingesetzten Zellen und Tumorproben haben. In sich anschließenden weiteren klinischen und laborexperimentellen Untersuchungen könnte dieser Zusammenhang untersucht werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse deuten an, dass gegen HPGD gerichtete Medikamente für Patientinnen, die unter einem Mammakarzinom leiden, vorteilhaft sein könnten.

6 Anhang**6.1 Einzelzell-Migrations-Assay: Ergebnisse der Einzelexperimente**Tab. 6.1: Zurückgelegte Distanz der Zellen in μm .

Distanz

	siRNA 21.5.D	siRNA 14.6.A	siRNA 14.6.D	siRNA 21.6.A	siRNA 21.6.D	cnt 21.5.B	cnt 21.5.C	cnt 14.6.B	cnt 14.6.C	cnt 21.6.B	cnt 21.6.C
Zelle 1	39,1	17,3	26,4	25,5	31,9	60,1	51,0	33,7	30,0	47,3	16,4
Zelle 2	69,2	19,1	47,3	17,3	28,2	76,4	89,2	54,6	77,4	65,5	30,9
Zelle 3	20,0	24,6	30,9	71,9	87,4	49,1	101,0	30,9	46,4	38,2	42,8
Zelle 4	22,8	23,7	5,5	28,2	14,6	71,0	37,3	106,5	92,8	12,7	22,8
Zelle 5	36,4	20,0	22,8	29,1	41,9	54,6	63,7	64,6	58,2	51,9	34,6
Zelle 6	58,2	28,2	57,3	41,0	15,5	62,8	43,7	61,9	66,4	65,5	31,9
Zelle 7	23,7	10,0	27,3	10,0	60,1	58,2	53,7	89,2	57,3	41,0	26,4
Zelle 8	10,9	28,2	26,4	31,9	38,2	58,2	59,2	57,3	51,0	179,3	24,6
Zelle 9	51,0	10,9	34,6	13,7	28,2	101,9	59,2	24,6	56,4	80,1	117,4
Zelle 10	25,5	29,1	39,1	33,7	22,8	41,0	58,2	36,4	32,8	30,0	127,4
Zelle 11	30,0	61,0	38,2	12,7	35,5	55,5	72,8	28,2	67,3	40,0	35,5
Zelle 12	41,0	15,5	19,1	40,0	22,8		36,4	47,3	62,8	39,1	24,6
Zelle 13	49,1	90,1	49,1	41,0	28,2		66,4	44,6	35,5	41,0	28,2
Zelle 14	27,3	17,3	36,4	18,2	20,0		53,7	49,1	48,2	17,3	17,3
Zelle 15	45,5	25,5	13,7	51,0	15,5		23,7	20,9	19,1	41,9	88,3
Zelle 16	31,9	69,2	16,4	9,1	26,4			51,9	28,2	38,2	43,7
Zelle 17	40,0	80,1	41,0	50,1	71,9			78,3	45,5	108,3	25,5
Zelle 18	10,9	0,9	67,3	22,8	27,3			54,6	48,2	86,5	31,9
Zelle 19	20,0	43,7	13,7	27,3	67,3			51,9	37,3	34,6	61,9
Zelle 20	17,3	26,4	28,2	7,3	64,6			41,0	64,6	61,9	44,6
Zelle 21	8,2	45,5	22,8	14,6	21,8			70,1	83,7	38,2	32,8
Zelle 22	26,4	12,7	17,3	51,0	72,8			17,3	87,4	36,4	51,9
Zelle 23	28,2	9,1	29,1	49,1	43,7			38,2	58,2	44,6	
Zelle 24	15,5	46,4	86,5	30,0	35,5			61,0	23,7	35,5	
Zelle 25		24,6	52,8	22,8	24,6			44,6	61,9	39,1	
Zelle 26		20,0	21,8	62,8	20,9			59,2	40,0	17,3	
Zelle 27			41,9	45,5	8,2			13,7	31,9	31,9	
Zelle 28			30,9	15,5	14,6			41,9	65,5	23,7	
Zelle 29			41,0	7,3	41,9				42,8	61,9	
Zelle 30			17,3	13,7					69,2	36,4	
Mittelwert:	31,2	30,7	33,4	29,8	35,6	62,6	57,9	49,0	53,0	49,5	43,7
Standardabw.:	15,6	22,5	17,4	17,3	20,6	16,2	19,8	21,2	19,0	32,1	30,1

Tab. 6.2: Geschwindigkeit der einzelnen Zellen in $\mu\text{m}/\text{h}$.

Geschwindigkeit

	siRNA 21.5.D	siRNA 14.6.A	siRNA 14.6.D	siRNA 21.6.A	siRNA 21.6.D	cnt 21.5.B	cnt 21.5.C	cnt 14.6.B	cnt 14.6.C	cnt 21.6.B	cnt 21.6.C
Zelle 1	1,6	1,0	1,6	1,2	1,6	2,5	2,1	2,0	1,8	2,3	0,8
Zelle 2	2,9	1,1	2,8	0,8	1,4	3,2	3,7	3,2	4,6	3,2	1,5
Zelle 3	0,8	1,4	1,8	3,5	4,3	2,0	4,2	1,8	2,7	1,9	2,1
Zelle 4	0,9	1,4	0,3	1,4	0,7	3,0	1,6	6,3	5,5	0,6	1,1
Zelle 5	1,5	1,2	1,3	1,4	2,0	2,3	2,7	3,8	3,4	2,5	1,7
Zelle 6	2,4	1,7	3,4	2,0	0,8	2,6	1,8	3,6	3,9	3,2	1,6
Zelle 7	1,0	0,6	1,6	0,5	2,9	2,4	2,2	5,2	3,4	2,0	1,3
Zelle 8	0,5	1,7	1,6	1,6	1,9	2,4	2,5	3,4	3,0	8,7	1,2
Zelle 9	2,1	0,6	2,0	0,7	1,4	4,2	2,5	1,4	3,3	3,9	5,7
Zelle 10	1,1	1,7	2,3	1,6	1,1	1,7	2,4	2,1	1,9	1,5	6,2
Zelle 11	1,3	3,6	2,2	0,6	1,7	2,3	3,0	1,7	4,0	2,0	1,7
Zelle 12	1,7	0,9	1,1	2,0	1,1		1,5	2,8	3,7	1,9	1,2
Zelle 13	2,0	5,3	2,9	2,0	1,4		2,8	2,6	2,1	2,0	1,4
Zelle 14	1,1	1,0	2,1	0,9	1,0		2,2	2,9	2,8	0,8	0,8
Zelle 15	1,9	1,5	0,8	2,5	0,8		1,0	1,2	1,1	2,0	4,3
Zelle 16	1,3	4,1	1,0	0,4	1,3			3,1	1,7	1,9	2,1
Zelle 17	1,7	4,7	2,4	2,4	3,5			4,6	2,7	5,3	1,2
Zelle 18	0,5	0,1	4,0	1,1	1,3			3,2	2,8	4,2	1,6
Zelle 19	0,8	2,6	0,8	1,3	3,3			3,1	2,2	1,7	3,0
Zelle 20	0,7	1,6	1,7	0,4	3,2			2,4	3,8	3,0	2,2
Zelle 21	0,3	2,7	1,3	0,7	1,1			4,1	4,9	1,9	1,6
Zelle 22	1,1	0,7	1,0	2,5	3,6			1,0	5,1	1,8	2,5
Zelle 23	1,2	0,5	1,7	2,4	2,1			2,2	3,4	2,2	
Zelle 24	0,6	2,7	5,1	1,5	1,7			3,6	1,4	1,7	
Zelle 25		1,4	3,1	1,1	1,2			2,6	3,6	1,9	
Zelle 26		1,2	1,3	3,1	1,0			3,5	2,4	0,8	
Zelle 27			2,5	2,2	0,4			0,8	1,9	1,6	
Zelle 28			1,8	0,8	0,7			2,5	3,9	1,2	
Zelle 29			2,4	0,4	2,0				2,5	3,0	
Zelle 30			1,0	0,7					4,1	1,8	
Mittelwert:	1,3	1,8	2,0	1,5	1,7	2,6	2,4	2,9	3,1	2,4	2,1
Standardabw.:	1,3	1,0	0,8	1,0	0,7	0,8	1,2	1,1	1,6	1,5	1,5

Tab. 6.3: Anteil der Zeitpunkte mit Migrationsaktivität der einzelnen Zellen

Zeitpunkte mit Migrationsaktivität (Anteil)

	siRNA 21.5.D	siRNA 14.6.A	siRNA 14.6.D	siRNA 21.6.A	siRNA 21.6.D	cnt 21.5.B	cnt 21.5.C	cnt 14.6.B	cnt 14.6.C	cnt 21.6.B	cnt 21.6.C
Zelle 1	0,73	0,64	0,77	0,5	0,73	0,95	0,95	0,8	0,73	0,86	0,41
Zelle 2	0,86	0,59	0,86	0,5	0,73	1,00	0,95	1,0	0,91	0,91	0,82
Zelle 3	0,41	0,55	0,86	0,9	0,95	0,95	0,95	0,7	0,86	0,86	0,77
Zelle 4	0,50	0,82	0,23	0,6	0,55	1,00	0,86	0,9	0,91	0,45	0,55
Zelle 5	0,64	0,59	0,55	0,5	0,77	0,95	0,86	0,9	0,73	0,82	0,73
Zelle 6	0,82	0,68	0,91	0,8	0,55	1,00	0,77	0,9	0,95	0,82	0,68
Zelle 7	0,50	0,32	0,73	0,5	0,86	0,95	0,82	1,0	0,86	0,82	0,45
Zelle 8	0,36	0,77	0,73	0,7	0,59	1,00	0,91	0,9	0,82	0,95	0,55
Zelle 9	0,82	0,36	0,73	0,5	0,59	1,00	0,95	0,7	0,82	0,95	0,86
Zelle 10	0,82	0,77	0,86	0,8	0,64	0,86	0,91	0,7	0,64	0,91	0,86
Zelle 11	0,73	0,91	0,86	0,5	0,77	0,95	0,95	0,7	0,77	0,68	0,55
Zelle 12	0,73	0,27	0,45	0,8	0,55		0,77	0,8	0,68	0,91	0,50
Zelle 13	0,82	0,91	0,86	0,8	0,77		0,86	0,9	0,59	0,86	0,77
Zelle 14	0,68	0,50	0,82	0,5	0,82		1,00	0,9	0,82	0,64	0,36
Zelle 15	0,95	0,59	0,45	0,7	0,32		0,59	0,5	0,50	0,82	0,77
Zelle 16	0,86	0,86	0,45	0,1	0,73			0,9	0,64	0,86	0,59
Zelle 17	0,86	0,91	0,91	0,6	0,77			0,9	0,68	1,00	0,55
Zelle 18	0,36	0,05	0,91	0,5	0,68			1,0	0,77	1,00	0,68
Zelle 19	0,68	0,86	0,50	0,7	0,82			0,8	0,68	0,59	0,73
Zelle 20	0,55	0,59	0,64	0,4	0,86			0,9	0,82	0,95	0,64
Zelle 21	0,18	0,73	0,64	0,4	0,68			0,9	0,95	0,73	0,50
Zelle 22	0,73	0,41	0,45	1,0	0,82			0,4	0,91	0,82	0,77
Zelle 23	0,73	0,41	0,68	0,9	0,95			0,8	0,91	0,95	
Zelle 24	0,36	0,91	0,86	0,5	0,55			0,9	0,59	0,77	
Zelle 25		0,64	0,95	0,6	0,59			0,7	0,91	0,68	
Zelle 26		0,55	0,59	0,8	0,59			0,9	0,77	0,50	
Zelle 27			0,77	0,9	0,18			0,4	0,73	0,82	
Zelle 28			0,73	0,2	0,50			0,7	0,64	0,64	
Zelle 29			0,82	0,1	0,82				0,73	0,82	
Zelle 30			0,64	0,5					0,82	0,82	
Mittelwert:	0,65	0,62	0,71	0,59	0,68	0,97	0,88	0,80	0,77	0,81	0,64
Standardabw.	0,20	0,23	0,18	0,22	0,17	0,04	0,11	0,15	0,12	0,14	0,15

6.2 Wissenschaftliche Veröffentlichung

Journal of Pathology

J Pathol (2012)

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/path.3956

ORIGINAL PAPER

15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase associates with poor prognosis in breast cancer, induces epithelial–mesenchymal transition, and promotes cell migration in cultured breast cancer cells

Laura Lehtinen,¹ Paula Vainio,¹ Harriet Wikman,² Johannes Reemts,² Mika Hilvo,³ Rana Issa,⁴ Sirkku Pollari,¹ Burkhard Brandt,⁵ Matej Oresic,¹ Klaus Pantel,⁷ Olli Kallioniemi^{1,6} and Kristiina Iljin^{1*}

¹ Medical Biotechnology, VTT Technical Research Centre of Finland and Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Finland

² Institute of Tumour Biology, Centre of Experimental Medicine, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Germany

³ VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland

⁴ Institute of Pathology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Germany

⁵ Institute of Clinical Chemistry, Schleswig-Holstein University Hospital, Kiel, Germany

⁶ FIMM, Institute for Molecular Medicine Finland, University of Helsinki, Finland

*Correspondence to: Kristiina Iljin, Medical Biotechnology, VTT Technical Research Centre of Finland, PO Box 106, 20521 Turku, Finland.
e-mail: kristiina.iljin@vtt.fi

Abstract

Breast cancer is the most frequent cancer and the leading cause of cancer-related deaths in women worldwide. The prognosis of breast cancer is tightly correlated with the degree of spread beyond the primary tumour. Arachidonic acid (AA) and prostaglandin E₂ (PGE₂) are known to regulate tumour metastasis enabling epithelial–mesenchymal transition (EMT). However, the detailed role of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD), the key enzyme degrading prostaglandin E₂, remains unclear in breast cancer. Here, we show that *HPGD* mRNA is overexpressed in a subset of clinical breast cancers compared to normal breast tissue samples and that high *HPGD* mRNA expression associates with poor prognosis. Immunohistochemical staining of primary breast cancer and lymph node metastasis tissue samples confirmed high HPGD protein expression in 20% of the samples, as well as associated HPGD expression with aggressive characteristics, such as increased risk of disease relapse and shorter disease-free survival. Results from cultured cells indicated abundant HPGD expression in highly metastatic breast cancer cells, and impairment of HPGD expression using RNA interference led to a significant decrease in transforming growth factor- β signalling, in cellular arachidonic acid levels as well as in cell migration. Furthermore, gene expression microarray analysis followed by quantitative RT-PCR validation showed that HPGD silencing decreased aryl hydrocarbon receptor signalling and induced mesenchymal–epithelial transition. In conclusion, our results indicate that HPGD is highly expressed in metastatic and aggressive breast cancer and promotes EMT and migration in breast cancer cells.

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: breast cancer; metastasis; HPGD; arachidonic acid; mesenchymal–epithelial transition

Received 3 June 2011; Revised 28 October 2011; Accepted 31 October 2011

No conflicts of interest were declared.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Bcl-2	B-Zell-Lymphom-2-Protein
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
BRCA 1 / 2	Breast Cancer Gene 1 / 2
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD44	Cluster of Differentiation 44
cDNA	komplementäre DNA
cnt	control (<i>dt.</i> : Kontrolle)
cntrl	control (<i>dt.</i> : Kontrolle)
COX	Cyclooxygenase
ct	Cycle Threshold
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinphenylindol
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EP1-4	Prostaglandin-E-Rezeptor 1-4
ER	Östrogenrezeptor
ERBB2	erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
et al.	et alii (<i>dt.</i> : und andere)
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor

FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
GOF	Gain-of-function
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HPGD	Hydroxyprostaglandindehydrogenase
HRP	Horseradish Peroxidase
IGF	Insuline-like growth factor
IGFR	Insuline-like growth factor receptor
IHC	Immunhistochemie
incl.	inclusive
k.	keine
kD	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LK	Lymphknoten
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie
LOF	Loss-of-function
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein Kinase
MDA-MB-231(wt)	Brustkrebszelllinie (Wildtyp)
MDA-MB-231(SA)	Brustkrebszelllinie (aggressive Unterart)
Mm.	Musculi (dt.:Muskel)
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der untersuchten Fälle
n.s.	nicht signifikant
neg	negativ
NME1	Protein expressed in non-metastatic cells 1
OR	Odds ratio (Chancenverhältnis)
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)
p53	Tumor protein 53
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E2
PGH ₂	Prostaglandin H2
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
pos	positiv

PR	Progesteronrezeptor
PT	Primärtumor
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
ras	Rat sarcoma (Protoonkogen)
Rb	Retinoblasoma (Tumorsuppressorprotein)
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
rpm	Umdrehungen pro Minute
s. Abb.	siehe Abbildung
s. Tab.	siehe Tabelle
scr	scrambled (<i>dt.:</i> gemischt)
siRNA	small interfering RNA
sog.	sogenannt(e)
St.-abw.	Standardabweichung
Standardabw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-buffered saline tween-20
TGF	Transforming growth factor
TMA	Tissue-Microarray (<i>dt.:</i> Gewebe-Microarray)
tot n	Anzahl der untersuchten Fälle (total)
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
VEGF	Vascular endothelial growth factor
(v/v)	volume/volume
(w/v)	weigth/volume
z.B.	zum Beispiel

8 **Literaturverzeichnis**

Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Köchli O, Zuber M, Dieterich H, Mross F, Wilber K, Simon R, Sauter G (2004) Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 64(23):8534-40.

Allred DC, Swanson PE (2000) Testing for erbB-2 by immunohistochemistry in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 113(2):171-5.

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF (2003) Average risk of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 72:1117-1130.

Armstrong A, Eisen K and Weber B (2000) Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 342:564-572.

Backlund, MG, Mann JR, Holla VR, Buchanan FG, Tai HH, Musiek ES, Milne GL, Katkuri S, DuBois RN (2005) 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Is Down-regulated in Colorectal Cancer. *J Biol Chem.* 280(5):3217-23.

Baylin SB and Ohm JE (2006) Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer.* 6(2):107-16.

Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch H-G, Gusterson BA, Bender HG (1997) Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 75:429-439.

- Behrens J**, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W (1989) Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 108(6):2435-47.
- Bernstein BE**, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell.* 128(4):669-81.
- Braun S**, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 353(8):793-802.
- Bresalier RS**, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanus A, Konstam MA, Baron JA; Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVe) Trial Investigators (2005) Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med.* 352(11):1092-102.
- Buchanan FG**, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN (2003) Prostaglandin E₂ Regulates Cell Migration via the Intracellular Activation of the Epidermal Growth factor Receptor. *J Biol Chem.* 278(37):35451-7.
- Bühling KJ**, Lepenies J, Witt K (2004) Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 3. Auflage, Urban und Fischer, München.
- Decaestecker C**, Debeir O, Van Ham P, Kiss R (2007) Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Med Res Rev.* 27(2):149-76.
- Ding Y.**, Tong M, Liu S, Moscow JA, Tai HH (2005) NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-HPGD) behaves as a tumor Suppressor in lung cancer. *Carcinogenesis.* 26(1):65-72.

- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group** (1998) Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 352:930-942.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group** (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 365:1687-1717.
- Eden A**, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 300(5618):455.
- Elston CW**, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 19:403-410.
- Entschladen F**, Drell TL 4th, Lang K, Masur K, Palm D, Bastian P, Niggemann B, Zaenker KS (2005) Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res*. 307(2):418-26.
- Ferlay J**, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-917.
- Fowle B** (1997) Postmastectomy Radiation: Then and Now. *Oncology*. 11(2):213-239.
- Fukuda R**, Kelly B, Semenza GL (2003) Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*. 63(9):2330-4.
- Gabrielsson BG**, Olofsson LE, Sjögren A, Jernås M, Elander A, Lönn M, Rudemo M, Carlsson LM (2005) Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obes Res*. 13(4):649-52.
- Gerdes J**, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 133(4):1710-5.

- Giersiepen K, Heitmann C, Janhsen K, Lange C / Rober-Koch-Institut (Hrsg) (2005)** Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25: Brustkrebs.
- Graham RC Jr, Karnovsky MJ (1966)** The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem.* 14(4):291-302.
- Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A (2009)** The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis.* 30(3):377-386.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000)** The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP (2002)** Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23:144-150.
- Hawcroft G, Ko CWS, Hull MA (2007)** Prostaglandin E2-EP4 receptor signalling promotes tumorigenic behaviour of HAT-29 human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 26:3006-17.
- Herdegen T (2008)** Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, Thieme, Stuttgart.
- Humblet Y. (2004)** Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother.* 5(7):1621-33.
- Jang TJ, Ji YS, Jung KH (2008)** Decreased Expression of 15-hydroxyprostaglandin Dehydrogenase in Gastric Carcinomas. *Yonsei Med J* 49(6):917-922.
- Jones PA, Baylin SB (2002)** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3 (6):415-428.
- Jones PA, Baylin SB (2007)** The epigenomics of cancer. *Cell.* 128(4):683-92.

- Karow T, Lang-Roth R** (2008) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden, 16. Auflage, Pulheim (selbstverl.)
- Kim H, Eun JW, Lee H, Nam SW, Rhee H, Koh KH, Kim H** (2011) Gene expression changes in patient-matched gastric normal mucosa, adenomas, and carcinomas. *Exp Mol Pathol.* 90:201-9.
- Kim JB, Stein R and O'Hare MJ** (2004) Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer- a review. *Breast Cancer Res Treat.* 85(3):281-91.
- Knippers R** (2001) Molekulare Genetik, 8. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW** (1997) Early-onset breast cancer- histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer.* 75(9):1318-23.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP** (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 4(7):844-7.
- Koolmann J, Röhm KH** (2009) Taschenatlas Biochemie des Menschen, 4. vollständig überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Krams M, Frahm SO, Kellner U, Mawrin C** (2010) Kurzlehrbuch Pathologie, Thieme, Stuttgart.
- Lehtinen L, Vainio P, Wikman H, Reemts J, Hilvo M, Suortti T, Issa R, Pollari S, Brandt B, Oresic M, Pantel K, Kallioniemi O und Iljin K** (2012) HPGD associates with poor prognosis in breast cancer, induces epithelial-mesenchymal transition and promotes cell migration in cultured breast cancer cells. *Am J Pathol.* 226(4):674-86
- Martin AM, Weber BL** (2000) Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92(14):1126-35.

- Martin D, Gutkind JS (2009)** Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene*. 27:Suppl2:S31-42.
- Mauriac L, MacGrogan G, Avril A, Durand M, Floquet A, Debled M, Dilhuydy JM, Bonichon F (1999)** Neoadjuvant chemotherapy for operable breast carcinoma larger than 3 cm: a unicentre randomized trial with a 124-month median follow-up. Institut Bergonié Bordeaux Groupe Sein (IBBGS). *Ann. Oncol.* 10(1):47-55.
- Mbalaviele G, Dunstan CR, Sasaki A, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T (1996)** E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. *Cancer Res.* 56(17):4063-70.
- Meredith JE Jr, Fazeli B, Schwartz MA (1993)** The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 4(9):953-61.
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006)** Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer.* 6(12):924-35.
- Niggemann B, Drell TL 4th, Joseph J, Weidt C, Lang K, Zaenker KS, Entschladen F (2004)** Tumor cell locomotion: differential dynamics of spontaneous and induced migration in a 3D collagen matrix. *Exp Cell Res.* 298(1):178-87.
- Nowell PC (1976)** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194:23-28.
- Pantel K, Cote RJ, Fodstad O (1999)** Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst.* 91(13):1113-24.
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008)** Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 8(5):329-40.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Rijn M van de, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000)** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 406(6797):747-52.

- Rassow J**, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2006) Duale Reihe Biochemie, Thieme, Stuttgart.
- Recht A**, Edge SB, Solin LJ, Robinson DS, Estabrook A, Fine RE, Fleming GF, Formenti S, Hudis C, Kirshner JJ, Krause DA, Kuske RR, Langer AS, Sledge GW Jr., Whelan TJ, Pfister DG (2001) Postmastectomy Radiotherapy: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 19:1539-1569.
- Rossouw JE**, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 17;288(3):321-33.
- Russo J**, Russo IH (2004) Molecular basis of breast cancer: prevention and treatment, Springer, Berlin.
- Samuelsson B**, Morgenstern R, Jakobsson PJ (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.* 59(3):207-24.
- Schmidt-Matthiesen H**, Baster G, Wallwiener D (2002) Gynäkologische Onkologie, 7. Auflage, Schattauer, Stuttgart.
- Schmitt G**, Döker R, Pape H (1999) Onkologie systematisch, 1. Auflage, UNI-MED, Bremen.
- Sheng H**, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 58(2):362-6.
- Sheng H**, Shao J, Washington MK, DuBois RN (2001) Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 276 (21):18075-81.

- Silva** OE (2007) *Brustkrebs: Diagnostik und Therapie*, 1. Auflage, Urban und Fischer, München.
- Slamon** DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 244(4905):707-12.
- Smalley** W, DuBois RN (1997) Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol*. 39:1-20.
- Smith-Warner** SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ (1998) Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 18;279(7):535-40.
- Stauber** M, Weyerstahl R (2007) *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*, 3., aktualisierte Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Steene** J v. d., Soete G, Storme G (2000) Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival: the missing link. *Radiother Oncol*. 55:263-272.
- Tai** HH, Cho H, Tong M, Ding Y (2006) NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structure and biological functions. *Curr Pharm Des*. 2(8):955-62.
- Tai** HH, Tong M, Ding Y (2007) 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (15-PGDH) and Lung Cancer. *Prostaglandins and Other Lipid Mediat*. 83(3):203-8.
- Tatsuwaki** H, Tanigawa T, Watanabe T, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Muguruma K, Sawada T, Hirakawa K, Higuchi K, Arakawa T (2009) Reduction of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression is an independent predictor of poor survival associated with enhanced cell proliferation in gastric adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 101(2):550-58.

- Taylor R, Heard G, Boyages J** (2001) Estimating a woman's risk of breast cancer: The effects of age and family history. *N S W Public Health Bull.* 12(2):36-40.
- Thiery JP** (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol.* 15(6):740-6.
- Thill M, Fischer D, Hoellen F, Kelling K, Dittmer C, Landt S, Salehin D, Diedrich K, Friedrich M, Becker S** (2010) Prostaglandin metabolising enzymes and PGE2 are inversely correlated with vitamin D receptor and 25(OH)2D3 in breast cancer. *Anti-cancer Res.* 30(5):1673-9.
- Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P** (1972) Menopause and Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst.* 48:605-13.
- Tsuji M, DuBois RN** (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 83(3):493-501.
- Tumorzentrum München** - Ingo Bauerfeind (Hrsg) (2001) Mammakarzinome: Empfehlungen zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 8. überarbeitete Auflage, Zuckerschwerdt Verlag, München.
- Ursin G, Longnecker MP, Haile RW, Greenland S.** (1995) A meta-analysis of body mass index and risk of premenopausal breast cancer. *Epidemiology.* 6(2):137-41.
- Vainio P, Gupta S, Ketola K, Mirtti T, Mpindi JP, Kohonen P, Fey V, Perälä M, Smit F, Verhaegh G, Schalken J, Alanen KA, Kallionemi O, Iljin K** (2011) Arachidonic Acid Pathway Members PLA2G7, HPGD, EPHX2, and CYP4F8 Identified as Putative Novel Therapeutic Targets in Prostate Cancer. *Am J Pathol.* 178(2):525–536.
- Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U** (1978) Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Analysis of 716 consecutive patients. *Cancer.* 41(3):1170-8.
- Veer LJ van 't, Dai H, Vijver MJ van de, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, Kooy K van der, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley**

- PS, Bernards R, Friend SH (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 415(6871):530-6.
- Vogelstein B**, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 319(9):525-32.
- Wagener C**, Müller O (2010) Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte, 3. komplett aktualisierte und erw. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Wang D**, DuBois RN (2006) Prostaglandins and cancer. *Gut*. 55:115.122.
- Whelan TJ**, Julian J, Wright J, Jadad AR, Levine ML (2000) Does Locoregional Radiation Therapy Improve Survival in Breast Cancer? A Meta-Analysis, *J Clin Oncol*. 18:1220-1229.
- Wikman H**, Vessella R, Pantel K (2008) Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS* 116 (7-8):754-70.
- Wilmanns W**, Huhn D, Wilms K (2000) Internistische Onkologie, 2. vollständig neubearbeitete und erweiterte Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Wittekind C**, Meyer HJ (Hrsg) (2010) TNM: Klassifikation maligner Tumoren / UICC, Union Against Cancer, Wiley-Blackwell, Weinheim.
- Wolf I**, O'Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, Tai HH, Karlan BY, Koeffler HP (2006) 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Is a Tumor Suppressor of Human Breast Cancer. *Cancer Res*. 66(15):7818-23.
- Wu WK**, Sung JJ, Lee CW, Yu J, Cho CH (2010) Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: An update on the molecular mechanisms. *Cancer Letters*. 295:7-16.

9 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzlicher Dank geht an

Prof. Dr. Klaus Pantel und PD Dr. Harriet Wikman für die Bereitstellung des Themas, die Ermöglichung der Anfertigung einer Dissertation und für die sehr engagierte und freundliche Betreuung.

die medizinisch-technischen Assistentinnen Jolanthe Kropidowski und Kathrin Eylmann, die mich im Labor sehr häufig und freundlich unterstützt haben.

alle anderen, die mich immer wieder unterstützt und motiviert haben. Dazu zählen insbesondere meine Freundin Semira, Henning und meine Mutter sowie meine Geschwister.

10 Lebenslauf

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: