

**Einfluss von mutiertem p53
auf die Entwicklung von Mammakarzinomen in einem
transgenen Mausmodell [*Mus musculus* (Linneaus)]**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

am Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

von

Dipl.-Biologin Christina Heinlein

geboren am 03.12.1976

in Schorndorf

Hamburg, 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. W. Deppert
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. Horst Lörz
Tag der Disputation: 10. November 2006

Hamburg, den 12. Oktober 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Lieberei".

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit entstand in der Zeit von März 2003 bis September 2006 in der Abteilung Tumorstudiologie am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. werden in Bälde veröffentlicht:

Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice (2005). Oncogene 24(29), 4645-59.

Krepulat, F., Löhler, J., Heinlein, C., Hermannstadter, A., Tolstonog, G.V. and Deppert, W.

Mutant p53 increases tumor incidence and promotes tumor progression in a mouse model for mammary adenocarcinoma expression. Manuskript in Arbeit.

Heinlein, C., Krepulat, F., Löhler, J., Speidel D., Gevensleben H., Ylstra B., Martin-Subero J.I., Siebert R., Streichert, T., Otto B., Tolstonog G.V. and Deppert, W.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Lörz

Abkürzungen

A	Adenin
α	Anti
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
Ca	Karzinom
cDNA	komplementäre DNA
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
DCIS	Duktales Karzinom <i>in situ</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
HA	Hämagglutinin
H&E	Hämatoxylin-Eosin
IARC	<i>International agency for research on cancer</i>
IHC	Immunhistochemie
i.e.N.	intraepitheliale Neoplasie
IgG	Immunglobulin G
LA-Einheit	lobulo-alveoläre Einheit
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
L.st.	Längenstandard
LT	großes Tumor-Antigen
MaCa	Mammakarzinom
mutp53	Mutanten p53
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pp	post partum

Abkürzungen

R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
st	kleines Tumor-Antigen
17 kT	17 k Tumor-Antigen
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA
T _H	Hybridisierungstemperatur
T _m	Schmelztemperatur
TTP	Thymidintriphosphat
ü/N	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
WAP	<i>whey acidic protein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
wtp53	Wildtyp p53

Inhaltsverzeichnis

I	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
II	EINLEITUNG	3
1	DAS HUMANE MAMMAKARZINOM.....	3
1.1	Definition und Epidemiologie.....	3
1.2	Risikofaktoren.....	3
1.3	Tumorgenese.....	4
2	DER TUMORSUPPRESSOR p53.....	6
2.1	Biologische Aktivität von wtp53.....	7
2.2	Mutationen im p53 Gen.....	9
3	MAUSMODELLE.....	11
3.1	Das WAP-T Mausmodell.....	12
III	PROBLEMSTELLUNG.....	15
IV	MATERIAL	16
1	BIOLOGISCHES MATERIAL	16
1.1	Mausstämme.....	16
1.2	Darstellung der verwendeten Mauslinien.....	16
1.2.1	WAP-mutp53 transgene Mauslinien.....	16
1.2.2	WAP-T transgene Mauslinien.....	17
1.2.3	WAP-T x WAP-mutp53 transgene Mauslinien.....	17
2	MOLEKULARBIOLOGISCHES MATERIAL.....	17
2.1	Verwendete Plasmide und BAC Klone.....	17
2.1.1	Plasmide.....	17
2.1.2	BAC Klone.....	17
2.2	Enzyme und DNA-Längenstandards.....	18
2.3	Oligonukleotide.....	18
2.4	Antikörper.....	19
3	CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN.....	20
4	KITS	21

5	ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN.....	21
6	GERÄTE.....	21
V	METHODEN	23
1	TIERPRÄPARATION.....	23
1.1	Organentnahme	23
1.2	Langzeitstudien	23
1.3	Laktations-/ Expressionsstudien.....	24
1.4	Whole Mount Färbung	24
1.5	Phänotypisierung der Mammae (<i>Staging</i>)	24
1.6	Systematisierte histologische Beurteilung der Mammae und der Mammakarzinome (<i>Grading</i>). 24	
2	IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN.....	25
3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	25
3.1	Durchflusszytometrie (FACS Analyse).....	25
3.1.1	Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie	26
3.1.2	Durchflusszytometrie mit T-Ag Immunfluoreszenz-Markierung.....	26
3.2	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	27
4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	28
4.1	DNA-Isolierung.....	28
4.1.1	Aufreinigung muriner genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	28
4.1.2	Isolierung genomischer DNA für Southern-Blot Analyse und CGH.....	28
4.2	Aufkonzentrierung, Reinigung und Auftrennung von Nukleinsäuren.....	28
4.2.1	Ethanol-fällung von DNA	28
4.2.2	Gelelektrophoretische Auftrennung.....	29
4.2.3	Agarose-Gelextraktion.....	29
4.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	29
4.4	Identifizierung transgener Tiere	30
4.5	Southern-Blot Analyse	31
4.5.1	WAP-T Southern-Blot.....	31
4.5.2	WAP-mutp53 Southern-Blot.....	33
4.6	Sequenzierung	34
4.7	RNA-Isolierung mit anschließendem DNA-Verdau und Qualitätsprüfung.....	35
4.8	Reverse Transkription	36
4.9	Transkriptionsanalysen.....	36
4.10	Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung (Array-CGH).....	37

VI	ERGEBNISSE	40
1	EINFLUSS VON MUTIERTEM p53 AUF DIE TUMORINITIATION	40
1.1	Molekulargenetische Charakterisierung der transgenen WAP-mutp53 Mauslinien.....	41
1.2	Langzeitstudien der WAP-mutp53 transgenen Mauslinien	43
2	INTEGRATIONS-ANALYSE WAP-T TRANSGENER MAUSLINIEN.....	46
3	EINFLUSS VON mutp53 AUF DIE TUMORPROGRESSION	48
3.1	Phänotypischer Vergleich der T1 und T1-H22 Mäuse	50
3.2	Phänotypischer Vergleich der Mammakarzinome mono- und bi-transgener Mäuse.....	50
3.3	Molekularer Vergleich der Mammakarzinome mono- und bi-transgener Mäuse.....	56
3.4	Expressionsanalysen von T-Ag und mutp53 in den Mammae und Karzinomen aus T1-H22 Mäusen	67
VII	DISKUSSION.....	74
1	mutp53 INITIIERT IM WAP-mutp53 MAUSMODELL NICHT OFFENSICHTLICH DIE ENTSTEHUNG VON MAMMAKARZINOMEN	74
2	IN KOOPERATION MIT SV40 T-Ag ERHÖHT mutp53 SOWOHL DIE TUMORINZIDENZ ALS AUCH DIE METASTASIERUNGSRATE UND FÖRDERT DIE VERMEHRTE ENTSTEHUNG UNDIFFERENZIRTER MAMMAKARZINOME	75
3	MÖGLICHE MECHANISMEN DES mutp53-EFFEKT AUF DIE PROGRESSION VON MAMMAKARZINOMEN.....	78
VIII	LITERATURVERZEICHNIS.....	82

I Zusammenfassung

In der westlichen Welt erkrankt etwa jede neunte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Dies ist in vielen Fällen mit einer Mutation des p53 Tumorsuppressor-Gens verbunden. Bestimmte p53 Hot-Spot-Mutationen können neben dem Verlust der wtp53-Aktivität auch zu einem bislang noch unzureichend verstandenen Zugewinn neuer onkogener Eigenschaften, einem „gain of function“, führen.

Im Zentrum dieser Arbeit stand, ob und inwiefern mutiertes p53 (mutp53) die Entstehung und Progression von Mammakarzinomen beeinflusst. Dabei sollten auch Hinweise auf mögliche Mechanismen einer mutp53 „gain of function“ gewonnen werden.

Das experimentelle System bildeten induzierbare transgene Mausmodelle. Unter der Kontrolle des durch laktotrophe Hormone induzierbaren WAP-Promotors wurden dabei mutp53 Transgene spezifisch in den Epithelzellen der Brustdrüsen adulter weiblicher Tiere exprimiert. Dabei wurde je eines der beiden untersuchten mutp53 Konstrukte in wtp53 BALB/c Tieren exprimiert, die orthologe Mutationen zu den in humanen Mammakarzinomen am häufigsten vorkommenden p53 Hot-Spot-Mutanten R248W und R273H enthielten. Wie die hier vorgelegten Daten zeigen, initiiert die Expression von mutp53 in somatischen Mammaepithelzellen nicht die Bildung von Mammakarzinomen und ist somit unter diesen Bedingungen offensichtlich kein Initiationsfaktor der Tumorgenese. So ist die Tumoranzahl in mutp53 transgenen Tieren nicht höher als die in BALB/c wt Kontroll-Tieren. Dennoch zeigten alle Mammakarzinome der WAP-mutp53 transgenen Tiere eine globale mutp53 Expression, was auf einen unterstützenden Einfluss von mutp53 in der Tumorgenese hindeutet.

Als nächstes wurde die Rolle von mutp53 in der Tumorprogression untersucht. Basis dieser Untersuchungen bildete die WAP-T Mauslinie T1, die die „frühe“ SV40 Genregion als Transgen trägt. Das durch dieses Transgen kodierte SV40 T-Ag induziert die Entstehung von Mammakarzinomen und inaktiviert endogenes wtp53, wodurch in bi-transgenen WAP-T x WAP-mutp53 Tieren ein mutp53 „gain of function“ unabhängig von einem dominant-negativen Einfluss von mutp53 auf wtp53 erfasst werden konnte. Da die Expression von mutp53 in Brustepithelzellen bi-transgener *WAP-T1* x *WAP-mutp53^{R270H}-H22* Tiere durch T-Ag induziert wurde, spiegelt dieses Modell die Entwicklung eines Mammakarzinoms mit mutiertem p53 beim Menschen wider.

Vergleichende Untersuchungen von mono-transgenen WAP-T1 und bi-transgenen *WAP-T1* x *WAP-mutp53^{R270H}-H22* Tieren zeigten, dass mutp53 die Tumorzinidenz erhöht, sowie die Invasivität der Mammakarzinome, was zu vermehrter Metastasenbildung führt. Gleichzeitig begünstigt mutp53 die Entstehung heterogener, undifferenzierter und größerer Tumore.

Molekulare Analysen der Mammakarzinome ergaben eine hohe, für jeden Tumor individuell verschiedene Aneuploidie, die unabhängig vom Differenzierungsgrad bei mono- und bi-transgenen Tieren gleichermaßen stark ausgeprägt war. Diese Individualität und Heterogenität der Tiere spiegelte sich auch in den über CGH und Expressionsanalysen erfassten genetischen Alterationen wider. Dabei zeigte sich, dass der mutp53 vermittelte Einfluss auf die Tumorprogression nicht auf eine selektive Amplifikation oder Dysregulation spezifischer Gene zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu konnten gemeinsame Amplifikationen in den undifferenzierten Tumoren aus mono- und bi-transgenen Tieren festgehalten werden, die diese spezifisch von differenzierten Tumoren unterscheidet. Am Charakteristischsten waren Amplifikationen im *c-met* Locus, der bis auf eine Ausnahme in allen undifferenzierten Karzinomen amplifiziert war und mit einer 50-100-fachen Erhöhung der *c-met* Transkription einherging.

Die hier erhobenen Daten zeigen einen bislang noch nicht beschriebenen „gain of function“ Effekt von mutp53 auf die Tumorprogression von Mammakarzinomen. Dieser wirkt sich in einer erhöhten Tumorinzidenz und bevorzugten Entstehung undifferenzierter Tumore aus und könnte über einen inhibitorischen Effekt von mutp53 auf die Differenzierung von Progenitorzellen des Brustdrüsengewebes vermittelt werden.

II Einleitung

1 DAS HUMANE MAMMAKARZINOM

1.1 Definition und Epidemiologie

Unter dem Sammelbegriff Mammakarzinom (Brustkrebs) werden maligne Tumore zusammengefasst, die von Mamdrüsenepithelien ausgehen und Merkmale von Milchgängen (duktale Karzinome) oder von lobulären Drüsenläppchen (lobuläre Karzinome) besitzen. In 85% der Fälle handelt es sich um duktales Karzinome. Bei Mammakarzinomen treten häufig Rezidive oder Metastasen auf. Die Heilungschancen bei metastasierenden Tumoren sind im Allgemeinen gering, während Rezidive in der Regel gut therapierbar sind. Dabei haben Patientinnen mit Lungen- und Lebermetastasen eine deutlich schlechtere Prognose als solche mit Knochen- und Hautmetastasen.

Laut Schätzungen der Dachdokumentation Krebs des RKI (Robert-Koch-Institut, <http://www.rki.de>) gibt es jährlich 47.500 Brustkrebs-Neuerkrankungen in Deutschland, wodurch Brustkrebs mit 26% aller malignen Neuerkrankungen die häufigste Krebserkrankung in der weiblichen Bevölkerung darstellt. Auch bei der Krebssterblichkeit belegt das Mammakarzinom mit 18% den ersten Rang bei den Frauen. Etwa jede neunte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom und nach Schätzungen der WHO erkrankten im Jahr 2000 über eine Million Frauen weltweit daran, wovon 370.000 an den Folgen der Erkrankung verstarben. Im Gegensatz zu Frauen erkranken Männer nur sehr viel seltener an Brustkrebs (etwa ein Mann auf 100 Frauen).

1.2 Risikofaktoren

Der größte Risikofaktor ist das Alter und eine damit einhergehende Erhöhung der Brustkrebs-Inzidenz und -Todesrate. So traten 88% der Brustkrebs Neuerkrankungen und 93% der durch Brustkrebs verursachten Todesfälle bei Frauen über 45 Jahren auf (Surveillance, Epidemiology, and End Results, SEER: www.seer.cancer.gov). Des Weiteren korrelieren frühe Menarche, späte Menopause, hohes Östrogenvorkommen, exogene Hormone (Kontrazeptiva, Hormonsubstitution), fettreiche Ernährung, gutartig proliferative atypische Hyperplasie, vorausgehender Brustkrebs und vorausgegangene Bestrahlung positiv mit der Krankheitsentstehung.

Der Trend zu späten Schwangerschaften wird immer deutlicher, wodurch die Fallzahl für das bisher nur unzulänglich untersuchte Schwangerschafts-assoziierte Mammakarzinom, das oft mit einer schlechten Prognose einhergeht, zunimmt. Die Rück- bzw. Umbildung (Involution) des

gesamten Brustgewebes nach der Schwangerschaft bzw. dem Stillen ist mit einem Entzündungs- und Wundheilungs-Prozess verbunden. Bei diesen dynamischen Prozessen kann es aufgrund fehlerhafter Regulation zu einer erleichterten Disseminierung proliferierender bzw. tumorigener Zellen kommen (Schedin, 2006).

Die genetische Prädisposition stellt einen weiteren bedeutenden Risikofaktor dar. Genetische Veränderungen können bereits in der Keimbahn vorhanden sein und somit vererbt werden. Aus einer derartigen Prädisposition entstandene Tumorerkrankungen der Brust werden unter dem Begriff hereditäre Mammakarzinome zusammengefasst und betreffen etwa 5% der Tumore. Bei diesen Patientinnen werden gehäuft Mutationen in den beiden Tumorsuppressor-Genen *BRCA1* (Breast Cancer Gene 1) und *BRCA2* (Breast Cancer Gene 2) gefunden (Loman *et al.*, 2001; Smith & Robson, 2006). Des Weiteren finden sich Mutationen in den Genen *ATM*, *PTEN*, *CHEK-2* und Mismatch Repair-Gene (Lacroix & Leclercq, 2005; Walsh *et al.*, 2006). Keimbahnmutationen im *p53* Gen (17q13) prädisponieren Trägerinnen für das mit multiplen Neoplasien (hauptsächlich Sarkome und Mammakarzinome) einhergehende Li-Fraumeni-Syndrom (Malkin, 1993; Varley, 2003).

Die Mehrheit der Brusttumore (90-95%) tritt sporadisch auf und entsteht aus einer Vielzahl genetischer Veränderungen in somatischen Zellen, d. h. den Epithelzellen des Brustgewebes. Zu diesen Veränderungen zählen balancierte und unbalancierte Umlagerungen wie Translokationen, Inversionen, Duplikationen, Amplifikationen und Deletionen (Pandis *et al.*, 1995; Albertson *et al.*, 2003).

Weiterhin sind Dysfunktion und Mutationen von einzelnen Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen maßgeblich an der Entstehung, Entwicklung und/oder Propagation von Mammakarzinomen beteiligt. Von den Onkogenen sind hierbei Amplifikationen des *HER2/neu* (Synonyme: *c-erbB2*, *p185*) und des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (*EGFR*; Synonym: *erbB1*) Gens, und von den Tumorsuppressoren Mutationen in *BRCA-1*, *BRCA-2*, *ATM*, *pTEN* *MMAC1* und *p53* relevant (Ingvarsson, 2004; Dumitrescu & Cotarla, 2005). Mutationen im *p53* Gen kommen in 20-40% der Mammakarzinome vor und korrelieren mit einer schlechten Prognose (Rahko *et al.*, 2003; Olivier *et al.*, 2006).

1.3 Tumorgenese

Für die Entwicklung und den Erhalt eines Organismus ist es entscheidend, dass bei der Verdoppelung und Weitergabe der Erbinformation auf Tochterzellen keine genetischen Veränderungen stattfinden. Wird eine derartige genomische Veränderung nicht erkannt und behoben, kommt es während der DNA-Replikation und Amplifikation zur Fixierung des Schadens in Form von Mutationen (Maki, 2002), die Ausgangspunkt einer Tumorzell-Entwicklung sein können. Die Entstehung einer Tumorzelle ist ein mehrschrittiger Evolutionsprozess, in dem aus

initialen Wachstumsvorteilen weitere proliferations-stimulierende Veränderungen resultieren, die schließlich zu ungehemmtem Wachstum und invasivem Verhalten führen (Hanahan & Weinberg, 2000). Gemäß gängigen Modellvorstellungen unterscheidet man dabei zwischen Initiation, Promotion und Progression als jeweils distinkte Schritte bei der Tumorgenese (Weinberg, 1989). Tumorzellen zeichnen sich dabei durch eine Dysregulation der zellulären Wachstumskontrolle und einer übermäßigen Proliferation aus (Hahn & Weinberg, 2002; Massague, 2004). Damit verbunden ist ein abnormer DNA-Gehalt in der Zelle, Aneuploidie oder Polyploidie, was als Merkmal humaner solider Tumoren gilt (Kops *et al.*, 2005).

Ohne direkt für den Prozess der Tumorinitiation verantwortlich zu sein, kann die „Mikro-Umgebung“, d. h. autokrine und parakrine Faktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix, sowie das Immunsystem die Tumorprogression entscheidend beeinflussen.

Genetische Veränderungen mit Einfluss auf die Tumorgenese können die unterschiedlichsten zellulären Prozesse betreffen. Das menschliche Genom umfasst etwa 35 000 Gene. Einige davon sind bei der Krebsentstehung besonders häufig von Mutationen betroffen. Sie fallen in die Klasse der Onkogene oder Tumorsuppressor-Gene und kodieren für Struktur- und Regulatorproteine, die Prozesse wie z. B. Zellteilung, Differenzierung, Apoptose oder Zellmobilität kontrollieren. Onkogene wirken meist dominant, so dass eine Mutation in einem Allel ausreicht, um beispielsweise aktiv die Zellproliferation zu fördern. Zu dieser Gruppe gehören z. B. die Gene *c-myc*, *ras* oder *erb-4*. Proto-Onkogene können durch Punktmutationen, aber auch durch Amplifikation oder Translokation, zu Onkogenen werden. Die durch Tumorsuppressor-Gene kodierten Proteine, wie z. B. der Tumorsuppressor p53, gelten im Gegensatz zu Onkogenen als rezessiv, d. h. nach Mutation in einem Allel eines Tumorsuppressor-Gens ist das zweite Allel (meist) noch funktionell. Allerdings erfolgt häufig durch nachfolgende Mutationen oder Deletionen im zweiten Allel ein Funktionsverlust („Two-Hit-Hypothese“) (Knudson, 1971). So wird der Verlust des *wtp53* Allels (LOH; *loss of heterozygosity*) oft bei humanen Tumoren mit *mutp53* beobachtet (Morris, 2002).

Der Prozess der Metastasierung ist bislang noch unzureichend verstanden und wird kontrovers diskutiert. Cameron *et al.* gehen davon aus, dass sich die in Sekundärorganen nachweisbaren, disseminierten Tumorzellen von dem Primärtumor abgesiedelt haben und erst nach der Extravasion einige Zellen zusätzliche Eigenschaften, die zur Metastasenbildung führen, erlangen (Cameron *et al.*, 2000). Ein anderes Modell besagt, dass während der Etablierung des Primärtumors bereits Tumorzellen mit erhöhtem metastatischem Potential entstanden sind, die sich selektiv vom Primärtumor ablösen (Fidler & Hart, 1982; Bernards & Weinberg, 2002). Es handelt sich demnach nicht um eine Akkumulation genetischer Veränderungen nach der Absiedlung, sondern um primäre genetische Veränderungen, die das Schicksal der Zelle von Beginn an bestimmen. Es mehren sich die Hinweise, dass es sich bei einigen dieser Zellen um Krebs-Stammzellen bzw. Tumor-

initiierende Zellen handelt (Al-Hajj & Clarke, 2004; Feinberg & Tycko, 2004; Polyak & Hu, 2005; Li & Neaves, 2006; Morrison & Kimble, 2006). Diese Zellen sind häufig resistent gegen die klassischen verfügbaren Behandlungsmethoden wie Strahlen- und Chemotherapie (Dean *et al.*, 2005). Dies stellt bei der Therapie von Krebspatienten ein schwerwiegendes Problem dar und erfordert neue Behandlungsstrategien.

Neben genetischen Faktoren beeinflussen auch epigenetische Faktoren die Karzinogenese. So kann z. B. eine Promotor-Hypermethylierung zur Reduktion oder dem kompletten Ausfall der Expression von Tumorsuppressor-Genen führen (Feinberg & Tycko, 2004; Munot *et al.*, 2006).

2 DER TUMORSUPPRESSOR p53

Das Tumorsuppressor-Protein p53 wurde 1979 unabhängig voneinander von David Lane und Arnold Levine entdeckt (Lane & Crawford, 1979; Linzer *et al.*, 1979). Das nukleäre Phosphoprotein kontrolliert nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde p53 als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Bis heute wird kontinuierlich an diesem Protein geforscht, zumal es eines der Gene ist, das in Tumoren auffallend häufig in seiner Funktionalität betroffen ist. So werden in 40-50% aller humanen Tumore Mutationen im *p53* Gen gefunden (IARC-Datenbank), (Soussi *et al.*, 2006b). Das humane *p53* Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert (murines *p53* auf Chromosom 11) und kodiert für ein 393 Aminosäuren großes Protein (murin: 390 Aminosäuren), das seine biologische Funktionalität als Tetramer entfaltet (Ko & Prives, 1996; Vousden & Lu, 2002). Das *p53* Gen besteht aus elf Exons, wobei Exon I nicht translatiert wird. Auf der Polypeptidkette von p53 unterscheidet man verschiedene strukturelle und funktionelle Domänen: Die N-terminalen 42 Aminosäuren haben Transkriptions-aktivierende Eigenschaften, die wesentlich für die Initiation der Transkription der entsprechenden Zielgene verantwortlich sind. Die DNA-bindende Region umfasst die Aminosäuren 102 bis 292. In diesem Bereich liegen die Erkennungssequenzen für die Zielgene, deren Transkription durch das p53 Protein reguliert werden. Über diese zentrale Domäne kann p53 sequenzspezifisch DNA binden; sie besitzt aber auch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer *et al.*, 1996). Der C-terminale Bereich des p53 Moleküls beinhaltet mehrere funktionelle Domänen, unter anderem die Oligomerisierungsdomäne, welche eine Tetramerisierung ermöglicht. Über den äußersten C-Terminus kann p53 ebenfalls an DNA binden und die Funktion des zentralen p53-Bereichs kontrollieren (Lane, 1992; Harms *et al.*, 2004; Weinberg *et al.*, 2004; Laptenko & Prives, 2006).

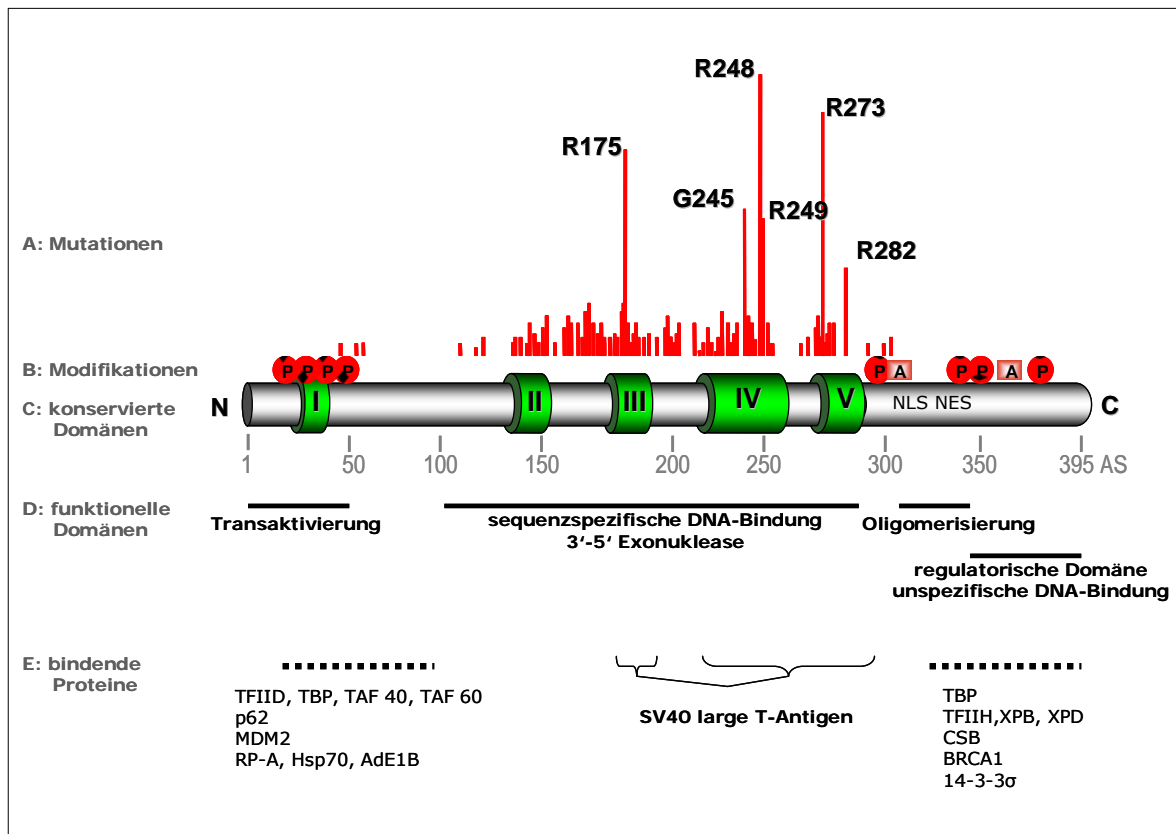


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Tumorsuppressors p53

A: Häufigkeit der p53 Punktmutationen; **B:** Post-translationale Modifikationen am N- und C-Terminus: P: Phosphorylierung, Ac: Acetylierung; **C:** vier der fünf konservierten Domänen befinden sich in der zentralen hydrophoben DNA-Bindungsregion; **D:** vier funktionelle Domänen; **E:** Beispiele regulatorischer Proteine, mit denen p53 interagiert; verändert nach (Albrechtsen *et al.*, 1999).

2.1 Biologische Aktivität von wtp53

Die am besten charakterisierte Funktion von p53 besteht darin, als Antwort auf genotoxischen Stress Zellzyklus-Arrest oder Apoptose einzuleiten und dadurch die genomische Integrität zu wahren. Unter physiologischen Bedingungen ist p53 aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von ca. 20 Minuten in nur geringer Konzentration im Zellkern lokalisiert. Abhängig von der Art des Stresses (UV- und Röntgenstrahlen, chemotherapeutische Agenzien, hohe Mengen von reaktiven Sauerstoffverbindungen, Hypoxie, Depletion von Nukleotiden, Infektion von Viren oder Aktivierung von Onkogenen) und dadurch aktivierte regulatorische Kinasen (El-Deiry, 2003), wurden unterschiedliche voneinander unabhängige Signalwege identifiziert, die zur Aktivierung von p53 führen (Vogelstein *et al.*, 2000; Levine *et al.*, 2006), (siehe Übersicht Abbildung 2). Die Aktivierung von p53 führt zu einem Anstieg der intrazellulären p53 Proteinmenge. Post-translationale Modifikationen wie u. a. Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung (Melchior & Hengst, 2002; Bode & Dong, 2004; Liu & Chen, 2006) beeinflussen

die Stabilisierung und Aktivierung, sowie die Regulation der vielfältigen biologischen Aktivitäten des Tumorsuppressors.

p53 steuert das Schicksal einer geschädigten Zelle hauptsächlich über seine Funktion als DNA-bindender sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor. Die durch p53 induzierten Zielgene können dabei in funktionelle Gruppen eingeteilt werden (Zhao *et al.*, 2000). Die Gruppe der Zellzyklus-Inhibitoren umfasst u. a. *p21* (Synonyme: *WAF1* und *Cip1*), *14-3-3σ* oder *gadd45*. Apoptose-Induktoren stellen eine weitere Gruppe dar und beinhalten u. a. *Bax*, *PUMA*, *Apaf 1*, *PIG3*, *NOXA* und *p53AIP1* (Vousden & Lu, 2002; Fridman & Lowe, 2003; Miled *et al.*, 2005). Des Weiteren finden sich Reparatur-assoziierte Gene, z. B. *p53R2*, ein Ribonukleotid-Reduktase-Gen (Tanaka *et al.*, 2000), oder *DDB2* (Ford, 2005) unter den durch p53 aktivierten Zielgenen (Nakamura, 2004; Wei *et al.*, 2006).

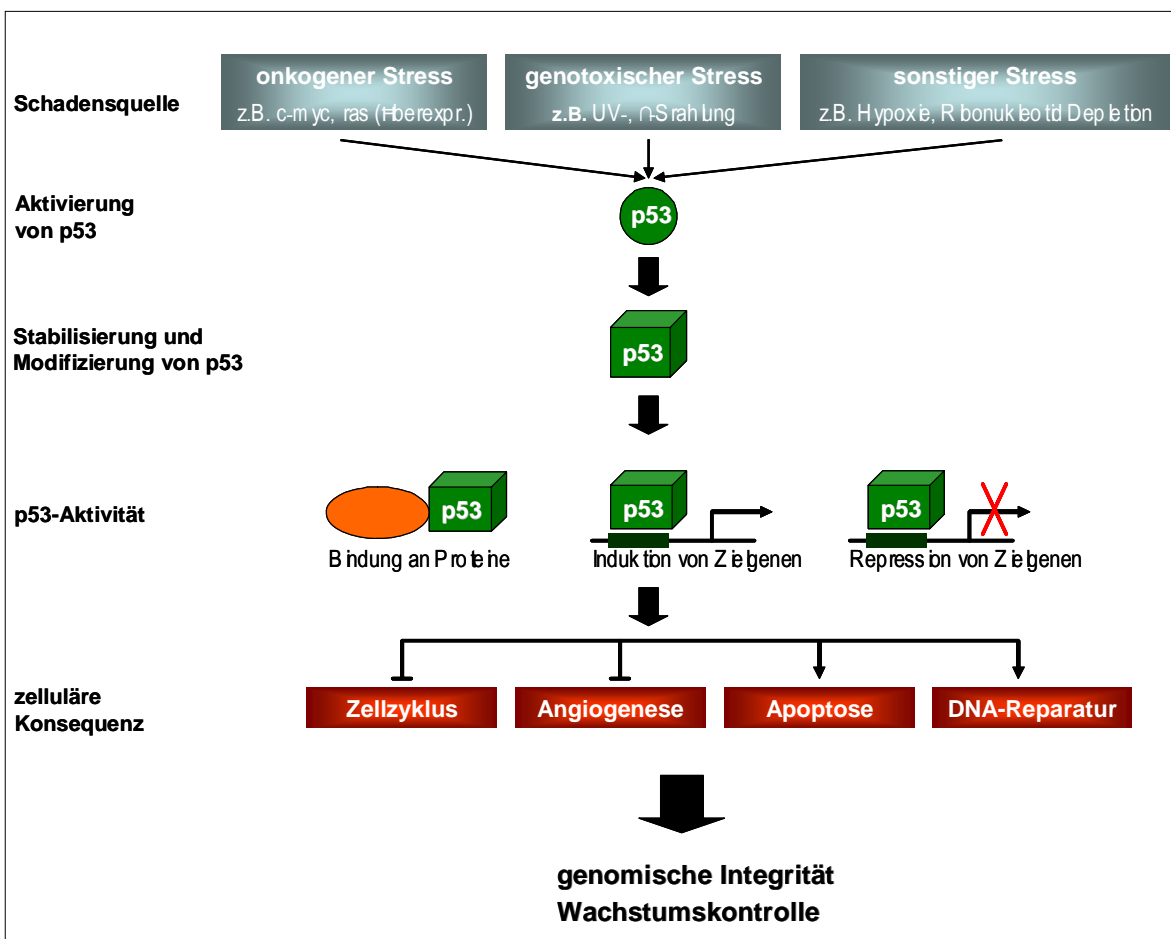


Abbildung 2: Das p53-Netzwerk

p53 steht im Mittelpunkt eines stringent regulierten Netzwerks. DNA-Schäden oder die Einwirkung von Onkogenen führen zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53. Dadurch wird die transkriptionelle oder nicht-transkriptionelle Regulation entsprechender Signalwege (des Zellzyklus-Arrests, der Inhibierung der Angiogenese, Induktion der Apoptose oder DNA-Reparatur) eingeleitet.

Neben der Transaktivierung von Genen kann p53 die Transkription bestimmter Gene auch reprimieren. Verschiedene Studien zeigen eine Repression von Promotoren z. B. von *Zyklin A*, *Zyklin B1* und *cdk1*. Neben diesen Genen, die in Verbindung mit Zellproliferation und der malignen Progression stehen, kann p53 auch die Expression *RNA Pol I* und *RNA Pol III* transkribierter Gene inhibieren. Dies führt zu einer globalen Repression der Protein Biosynthese Maschinerie (Ho & Benchimol, 2003; Laptenko & Prives, 2006).

Weiterhin wurden eine Reihe von Protein-Protein Interaktionen mit verschiedenen zellulären und viralen Proteinen beschrieben, über die p53 in die Regulation wie Replikation, DNA-Reparatur, Transkription oder Apoptose eingreift (Janus *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001; Leu *et al.*, 2004; Moll *et al.*, 2005).

2.2 Mutationen im p53 Gen

Mutationen im *p53* Gen wurden in ca. 50% aller humaner Tumore gefunden und gehören somit zu den häufigsten Veränderungen in Tumoren überhaupt (IARC-Datenbank); (Soussi *et al.*, 2006a). Von diesen sind mehr als 80% „Missense“-Punktmutationen, die hauptsächlich in der DNA-Bindungsdomäne sind (IARC-Datenbank), (Liu & Chen, 2006). Bislang wurden ca. 1400 unterschiedliche p53 Mutationen bei Mammakarzinomen vermerkt (IARC-Datenbank); (Olivier *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressor-Genen, die durch Trunkierung, Deletionen oder Insertion inaktiviert werden, führen die meisten Krebs-assoziierten Punktmutationen im *p53* Gen zur Synthese eines sehr stabilen normal großen Proteins, das seine spezifische DNA-Bindungsfunktion verloren hat und im Zellkern akkumuliert (Soussi & Beroud, 2001). Besonders häufig auftretende Mutationen im *p53* Gen (AS 175, 248, 249, 273 und 282; siehe Abbildung 1) werden als Hot-Spot-Mutationen bezeichnet (Hollstein *et al.*, 1991). Unter den p53 Hot-Spot-Mutationen gibt es drei, die besonders häufig sowohl in Tumoren insgesamt, als auch speziell in Mammakarzinomen detektiert wurden. Dabei handelt es sich um Mutationen an den Aminosäure-Positionen 248, 273 und 175 (IARC Datenbank). Sowohl für das Mammakarzinom, wie auch für die meisten anderen Tumor-Arten ist eine GC → AT Transition in *p53* das mit über 90% vorherrschende Mutationsereignis (Soussi *et al.*, 2006b). Diese Missense-Punktmutation führt im Codon 175 zu einem Austausch der Aminosäure Arginin zu Histidin (mutp53^{R175H}), im Codon 248 von Arginin zu Tryptophan (mutp53^{R248W}) und im Codon 273 zu einem Austausch von Arginin gegen Histidin (mutp53^{R273H}).

Ein besseres Verständnis der Biologie spezifischer p53 Mutanten hat offensichtliche klinische Bedeutung. So konnte eine Korrelation zwischen Mutationen in p53, die speziell die Zink-Bindung der L2 und L3 Schlaufe betreffen (Codon 163-195 und 236-251), und schlechter Prognose (Olivier *et al.*, 2006) sowie einer Resistenz gegen Zytostatika (z. B. Doxorubicin) und Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen gezeigt werden (Aas *et al.*, 1996; Rahko *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Olive

et al., 2004). Da die unterschiedlichen Mutationen eine große strukturelle, biochemische und biologische Heterogenität aufweisen, variiert ein Effekt in Mutation, Expressionsstärke und Anfälligkeit des jeweiligen Organs bezüglich einer p53-Dysfunktion und der genetischen Prädisposition erheblich (Attardi & Donehower, 2005).

Der überwiegende Teil der Krebs-assoziierten p53 Mutationen führt zu einem Verlust oder zumindest zu einer Beeinträchtigung der transkriptionellen Aktivität von p53. Unabhängig von diesem „loss of function“ Effekt wurde bereits vor mehr als zehn Jahren postuliert, dass mutierte Proteine darüber hinaus über eigene neue Aktivitäten – „gain of function“ – verfügen und als Onkogene an einer zellulären Transformation beteiligt sein können (Deppert *et al.*, 2000; Sigal & Rotter, 2000; Kim & Deppert, 2004).

Im Jahr 2004 beschrieben zwei Gruppen unabhängig voneinander erstmals einen mutp53 „gain of function“ *in vivo* für die Mutation R175H (entspricht in der Maus R172H), der sich in einem erhöhten Proliferations-, Transformations- und Metastasierungspotential (Lang *et al.*, 2004) bzw. in einem veränderten Tumorspektrum und Metastasierungsverhalten gegenüber p53-null Mäusen (Olive *et al.*, 2004) zeigte.

Mechanismen, die für einen „gain of function“ von mutp53 verantwortlich sind, können in zwei Klassen eingeteilt werden: zum einen in Mechanismen, die auf eine Interaktion von mutp53 mit DNA beruhen, zum anderen in solche, die über die Interaktion von mutp53 mit zellulären Proteinen verursacht werden.

Bei dem erst genannten Mechanismus wurden Gene gefunden, die keine wtp53 sequenz-spezifische Bindungsstelle aufweisen, aber von mutp53 Proteinen gebunden werden können. Die Arbeitsgruppe um M. Oren publizierte im Jahr 2003 einen Mechanismus zum anti-apoptotischen „gain of function“. Zuvor wurde gezeigt, dass CD95 (Fas/APO-1) ein Ziel-Gen wtp53 vermittelter Transkription, und u. a. an der Induktion der Apoptose bei DNA Schäden beteiligt ist. Die Forscher um M. Oren konnten zeigen, dass mutp53 nicht wie wtp53 an das in Intron I gelegene wtp53 sequenz-spezifische Bindungsstelle, sondern an den Promotor bindet. mutp53 kann dadurch die Aktivität des CD95 Promotors runterregulieren, wodurch die geschädigte Zelle nicht in die Apoptose geleitet wird und mutp53 so zur Progression entarteter Zellen und Therapie-Resistenz beitragen kann (Zalcenstein *et al.*, 2003). Daneben konnten V. Rotter und ihre Arbeitsgruppe zeigen, dass die Induktion von EGR1 durch mutp53 zu erhöhten transformierenden Eigenschaften und Apoptose-Resistenz führt (Weisz *et al.*, 2004). Auch andere Arbeitsgruppen konnten Gene identifizieren, an deren Sequenz mutp53, nicht jedoch wtp53 binden kann. Auf der Suche nach einer mutp53 Konsensussequenz fanden Deppert *et al.*, dass unterschiedliche mutp53-Proteine, jedoch nicht wtp53 an regulatorische Chromatin-Elemente (MAR/SAR Elemente) binden. Es gibt keine bekannte, für ein MAR Element charakteristische Konsensussequenz. Aufgrund der bekannten

Struktur-Flexibilität der MAR Elemente konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Bindung *in vitro* von mutp53 an die MAR Elemente unabhängig einer Konsensussequenz, jedoch in Abhängigkeit der DNA-Länge erfolgte (Koga & Deppert, 2000). Die Arbeitsgruppe fand in weiterführenden Analysen heraus, dass die Interaktion von mutp53 und DNA vor allem von der Struktur und Topologie der DNA abhängt. So konnte gezeigt werden, dass mutp53 an Struktur-spezifische Sequenzen, jedoch nicht an die gleiche Sequenz in linearem Zustand bindet (Gohler *et al.*, 2002).

Ein Mechanismus, der auf die Interaktion von mutp53 mit zellulären Proteinen beruht, ist die Interaktion von mutp53 mit p73 und p63. Im Gegensatz zu wtp53 können einige p53 Mutanten direkt an die p53-homologen Proteine p63 und p73 binden (Strano *et al.*, 2002). Dies geht mit einer Inaktivierung der Transaktivierungsfunktion zur Apoptose-Induktion von p73 und p63 einher, und führt bei bestimmten Mutationen zu Resistenzen gegen einige Krebsmedikamente (Bergamaschi *et al.*, 2003). Die funktionelle Inaktivierung von p63 und p73 wurde auch in Embryofibroblasten und Tumorzellen aus Mäusen gezeigt, die homozygot das mutp53 Protein mit der Mutation R172H exprimieren (Lang *et al.*, 2004). Die Mutanten, die mit p73 interagieren können, zeichnen sich alle durch eine Konformationsänderung in der zentralen Bindedomäne und einem Polymorphismus am Codon 72 (Prolin zu Arginin) aus (Bensaad *et al.*, 2003).

3 MAUSMODELLE

Erkenntnisse zur Tumorenstehung aus Zellkulturmodellen benötigen zur Bestätigung ihrer Relevanz eine Evaluierung durch ein *in vivo* Modell, da es unmöglich ist, in der Zellkultur das komplexe Umfeld eines Organismus zu simulieren. Ein Tiermodell erlaubt auch Verlaufsuntersuchungen, die aus ethischen Gründen an Menschen nicht möglich sind. Untersuchungen an humanem Tumormaterial hingegen können nur Momentaufnahmen darstellen; häufig steht solches Material nur in begrenzter Menge zur Verfügung. Hinzu kommt erschwerend, dass sich aufgrund intrinsischer genetischer Heterogenität und unterschiedlicher vorausgegangener Therapie allgemeingültige Rückschlüsse nur nach Analyse großer Fallzahlen und nach vorheriger genauer histologischer und, wenn möglich, genetischer Klassifikation der Tumore ziehen lassen.

Mäuse (*Mus musculus*) bieten viele Vorteile. Sie ähneln in biologischer und genetischer Hinsicht in vielen Eigenschaften dem Menschen, so dass viele – jedoch nicht alle - an der Maus gewonnenen Erkenntnisse auch für den Organismus des Menschen gelten. Hinsichtlich Größe und Anzahl der Gene gleicht das Genom der Maus dem des Menschen. Im Gegensatz zum Menschen haben Mäuse eine hohe Reproduktionsrate, eine geringe Lebenserwartung und werden sehr schnell geschlechtsreif. Daher kann man die Auswirkung genetischer Veränderungen über viele Generationen in einem isogenen Hintergrund gut beobachten. Genetisch veränderte Mäuse sind

deshalb die wichtigsten Tiermodelle für die Erforschung humaner Erkrankungen. Zusätzlich können diese Erkrankungen auch im Kontext unterschiedlicher genetischer Hintergründe analysiert werden, da verschiedene Mausstämme aufgrund ihres Inzucht-Charakters unterschiedliche Mutationen und Prädispositionen tragen. Der BALB/c Stamm begünstigt aufgrund einer Mutation im *Cdkn2a*-Lokus die Entstehung von Mammakarzinomen (Kuperwasser *et al.*, 2000; Sherr, 2001). Zwei Gene mit überlagerten Leserastern kodieren an dieser Stelle für die Proteine p16 (INK4a; Inhibitor of CDK4) und p19 (ARF; alternative reading frame, human p14), wobei die beiden Transkripte durch zwei eigenständige Promotoren reguliert werden (Quelle *et al.*, 1995). p16 blockiert die Phosphorylierung des Proteins pRB durch die Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 und induziert somit einen G1-Zellzyklus-Arrest. Das ARF Protein stabilisiert den Apoptose-Induktor p53, indem es dessen Inhibitor Mdm2 bindet und dadurch inaktiviert. Diese genetische Prädisposition ist jedoch für die Entstehung von Mammakarzinomen nicht ausreichend.

3.1 Das WAP-T Mausmodell

Das SV40 Virus gehört zu den Polyomaviren (dsDNA-Viren). Die „frühe“ Genregion kodiert für das große T-Antigen (LT), das kleine T-Antigen (st) und das 17 kT Protein. 17 kT und st entstehen durch alternatives Spleißen der „frühen“ SV40 RNA. LT, st und 17 kT werden aufgrund ihrer Fähigkeit, Zellen unter bestimmten Bedingungen in Kultur zu transformieren, als Onkogene eingestuft. Die transformierende Aktivität des SV40 T-Ag basiert dabei vorwiegend auf Protein-Protein Interaktion mit zellulären Proteinen. LT bindet zelluläre Proteine wie p53, pRB, p107, p130, CBP/p300 und RASSF1A (Zerrahn & Deppert, 1993; Ahuja *et al.*, 2005). Durch die Bindung komplexiert und eliminiert LT dabei funktionell das endogene wtp53 und pRB, wodurch für beide Tumorsuppressoren (p53 und pRB) eine Null-Situation in der Zelle entsteht (Sheng *et al.*, 2000), (Voorhoeve & Agami, 2003). Die Apoptose bzw der Zellzyklus-Arrest wird dabei blockiert und der Eintritt in die S-Phase und eine damit einhergehende erhöhte Proliferation ist die Folge. st trägt zur Transformation der Zelle bei, indem es an pp2A bindet, dadurch die Phosphatase-Aktivität inhibiert und die Substrat-Spezifität ändert. Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung des wnt-Signalwegs (Chen *et al.*, 2004; Ali-Seyed *et al.*, 2006). 17 kT reduziert, ähnlich wie LT, die Menge an pRB und stimuliert die Zellzyklus-Progression (Boyapati *et al.*, 2003). Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt.

WAP-T Mäuse tragen als Transgen die „frühe“ Genregion des SV40 Virus unter der Kontrolle des murinen *whey acidic protein* (WAP)-Promotors (Schulze-Garg *et al.*, 2000). Dieser wird zum Ende der Schwangerschaft und während der Laktation in Mammaepithelzellen durch laktotrophe Hormone wie Prolaktin und Östrogen, aber auch durch Hydrocortison und Insulin induziert. Die Induktion führt zu einer lokal und temporär definierten Expression des Transgens in den Epithelzellen des Brustdrüsengewebes (Pittius *et al.*, 1988). In den untersuchten Mauslinien zeigt

die Induktion des ektopten WAP-Promotors ein heterogenes, jedoch Mauslinien-spezifisches Mosaik-Expressionsmuster, wobei die Expression des ektopten Transgens im Vergleich zu der Expression des endogenen *WAP* Gens aufgrund epigenetischer Regulation zwischen 0 und 100% variiert (Robinson *et al.*, 1995).

Das WAP-T Mausmodell lässt eine Entwicklung der Mäuse vergleichbar mit den BALB/c wt Mäuse ohne Beeinflussung durch das Transgen zu, da dieses erst durch die laktotrophen Hormone in somatischen adulten Zellen, den Epithelzellen der Brustdrüse, induziert und exprimiert wird.

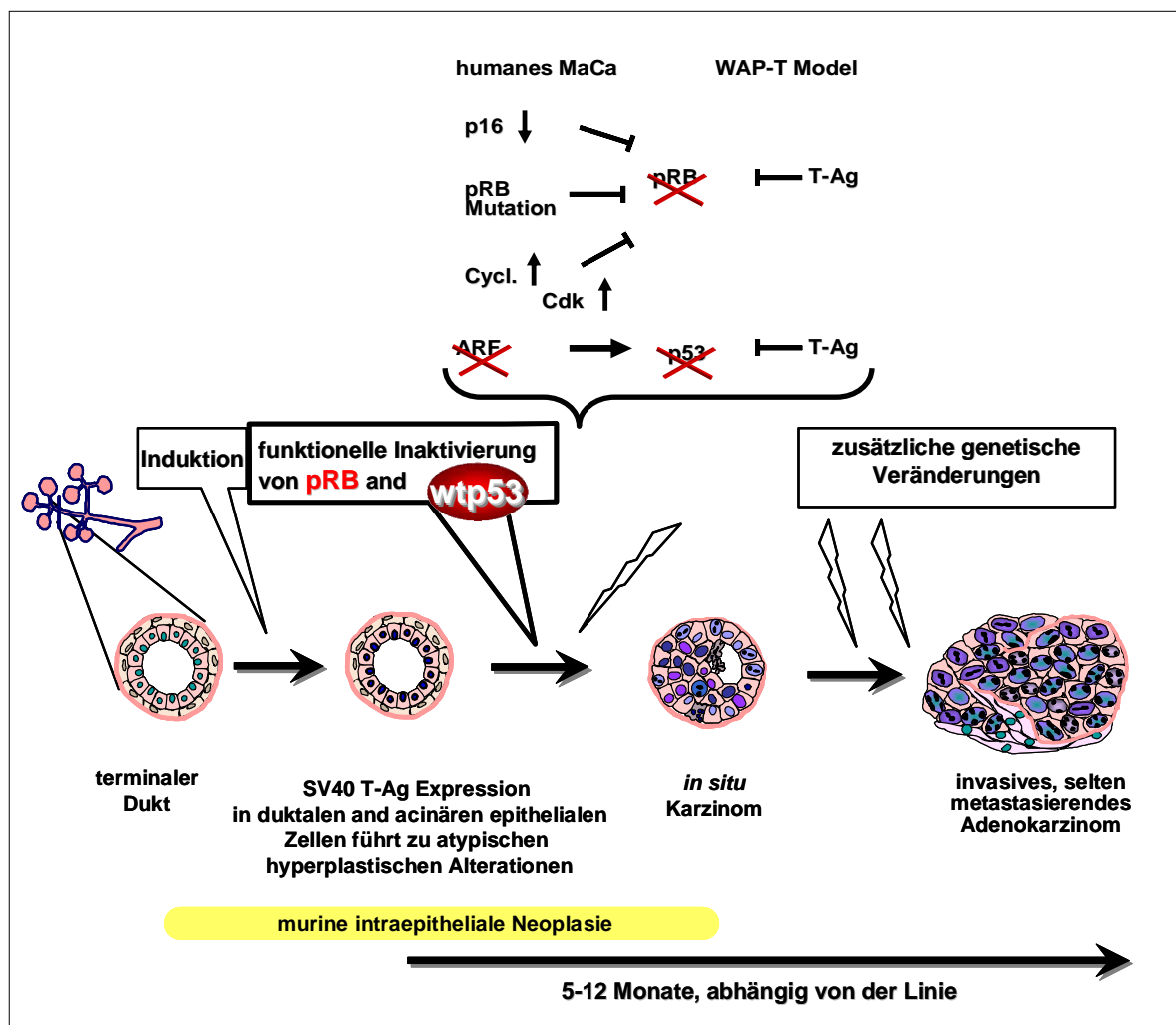


Abbildung 3: Induzierbares WAP-T Mammakarzinom Mausmodell

Laktotrophe Hormone induzieren die T-Ag Expression unter der Kontrolle des WAP-Promotors in Epithelzellen der Mammar. Dort komplexiert und inaktiviert T-Ag die Tumorsuppressor-Proteine p53 und pRB, wodurch es zur funktionellen Inaktivierung des G-1 Kontrollpunktes im Zellzyklus kommt. Dies simuliert die Situation, wie sie häufig in humanen Mammakarzinomen gefunden wird. Durch Mutationen in pRB, sowie Repression von *p16* und Hochregulierung von Zyklinen (Cycl.) und Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk) wird pRB, und durch Mutationen in ARF (*p14*, murin *p19*) wird p53 inhibiert. Nach einer durch T-Ag Expression hervorgerufenen initialen Dysplasie entstehen durch zusätzliche genetische Alterationen im weiteren Verlauf Hyperplasien, duktale *in situ* Karzinome und schließlich duktale, invasive Mammakarzinome, die selten metastasieren.

Nach abgeschlossener Involution bleiben einige T-Ag positive lobulo-acinäre Einheiten bestehen, deren T-Ag Expression Hormon-unabhängig geworden zu sein scheint. Neben der durch LT vermittelten Inaktivierung von p53 und pRB kommt es durch die transformierende Wirkung von LT, st und 17 kT, sowie zusätzlichen genetischen Alterationen zur Bildung von Hyperplasien, Dysplasien und intraepitheliale Neoplasien wie z. B. duktale *in situ* Karzinome. Diese murinen duktaalen *in situ* Karzinome zeigen eine dem humanen DCIS (duktales Karzinom *in situ*) entsprechende, ähnliche Morphologie. In vielen humanen Mammakarzinomen werden genetische Veränderungen in Form von Mutationen in *ARF* und *pRB*, sowie Repression von *p16* und Hochregulierung von Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk) detektiert (Silva *et al.*, 2003). Dadurch wird die Funktion der Tumorsuppressoren p53 und pRB inhibiert, was in dem WAP-T Mausmodell durch die Funktion von LT simuliert wird. Weitere genetische Alterationen führen zu undifferenzierten und invasiven, jedoch selten metastasierenden Adenokarzinomen (siehe Abbildung 3). In der wenig T-Ag exprimierenden Mauslinie *WAP-T-NP6* konnten auch nach 12 Monaten noch T-Ag positive Zellen in morphologisch unauffälligem bis hyperplastisch verändertem Gewebe detektiert werden. Die T-Ag Expression ist demnach notwendig für die Tumorinitiation, jedoch nicht ausreichend.

III Problemstellung

Brustkrebs stellt mit einer Inzidenz von ca. 9% die häufigste Krebserkrankung in der weiblichen Bevölkerung dar. Eine Mutation im Tumorsuppressor-Gen *p53* wird dabei in 30% aller Fälle detektiert, was nahe legt, dass mutiertes *p53* die Entwicklung von Mammakarzinomen ursächlich beeinflussen könnte, zumindest aber aktiv begünstigt. Ziel dieser Arbeit ist es, den tatsächlichen Einfluss von *mutp53* auf die Entstehung und Progression von Mammakarzinomen im Tiermodell näher zu charakterisieren.

Anhand transgener Mäuse, die neben dem endogenen *wtp53* je eine der zwei häufigsten in humanen Mammakarzinomen detektierten Hot-Spot-Mutationen spezifisch und induzierbar in den Epithelzellen der laktierenden Mammae exprimieren, sollte bestimmt werden, inwiefern mutiertes *p53* einen Einfluss auf die Entstehung, Inzidenz und Progression von Mammakarzinomen hat. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob verschiedene *p53* Mutationen unterschiedliche und jeweils spezifische Effekte vermitteln.

Um zwischen einem dominant negativen Effekt, der lediglich auf der Inaktivierung von *wtp53* beruht, und einer echten „gain of function“ Aktivität von *mutp53* unterscheiden zu können, sollten vergleichende Analysen zwischen verschiedenen Tiermodellen durchgeführt werden. Dabei wurde auf ein bereits etabliertes Modell zurückgegriffen, in dem endogenes *wtp53* durch Expression der „frühen“ Genregion des SV40 Virus in den Epithelzellen der Brustdrüsen funktionell inaktiviert wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Tiermodellen lässt die durch laktotrophe Hormone induzierte Expression des Transgens eine der BALB/c wt Tieren entsprechenden Entwicklung der WAP-T und WAP-*mutp53* Tiere bis zu einer Verpaarung zu. Erst durch die Verpaarung wird das Transgen in adulten somatischen Zellen, den Mammaepithelzellen, exprimiert und simuliert dadurch in realitätsnaher Weise die spontane Mutation von *p53* bei humanem Brustkrebs. In den WAP-T Mäusen wird durch Induktion des Transgens die Bildung duktaler *in situ* Mammakarzinome initiiert, die hinsichtlich der Morphologie das humane Krankheitsbild gut nachbilden. Durch vergleichende Analysen zwischen WAP-T sowie WAP-T x *mutp53* transgenen Mäusen sollte der Einfluss von *mutp53* auf die Progression von Mammakarzinomen untersucht werden und ein etwaiger „gain of function“ Effekt erfasst werden. Neben morphologischen und pathologischen Untersuchungen der Mammakarzinome hinsichtlich Differenzierungsstatus, Inzidenz und Invasivität sollten molekularbiologische Analysen der Tumore Hinweise auf mögliche Mechanismen einer *mutp53* Aktivität geben.

IV Material

1 BIOLOGISCHES MATERIAL

1.1 Mausstämme

Die Mäuse wurden hauptsächlich im BALB/c genetischen Hintergrund gehalten, jedoch aus technischen Gründen in CB6F1 Hybriden (erste Generation einer BALB/c x C57BL/6 Verpaarung) generiert. Der BALB/c Inzucht-Mausstamm trägt eine genetische Prädisposition zur spontanen Mammakarzinom Entwicklung. Aus diesem Grund wurden die transgenen Linien WAP-T (im Jahr 1997 von C. Schulze-Garg generiert) und WAP-mutp53 (von F. Krepulat im Jahr 2001 generiert) in den BALB/c Hintergrund gekreuzt.

Die Tiere wurden gemäß offizieller Regeln für Labortiere unter SPF (specific pathogen free) Bedingungen in einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus bei Futter und Wasser *ad libitum* im Heinrich-Pette-Institut gehalten. Diese anzeigepflichtigen Präparationen der Mäuse wurden von dem Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Hamburg genehmigt.

1.2 Darstellung der verwendeten Mauslinien

1.2.1 WAP-mutp53 transgene Mauslinien

Das *p53* Mini-Gen (bestehend aus einer Exon-Intron Struktur ab dem ATG Start-Codon zu Beginn des Exons II bis Exon XI, ohne Intron 10) enthält je eine Hot-Spot-Mutation und steht unter der Kontrolle des murinen *whey acidic protein* (WAP)-Promotors. Direkt vor dem Stop-Codon befindet sich ein HA-Tag, gefolgt von einem SV40 Polyadenylierungssignal (Krepulat *et al.*, 2005). Der HA-Tag besteht aus neun Aminosäuren und ist ein Epitop des Hämagglutinin-Influenzavirus. Er dient zur Transgen-Identifizierung.

WAP-mutp53^{R245W}: Das *p53* Mini-Gen enthält eine Punktmutation an der Aminosäure-Position 245, die zu einem Austausch von Arginin zu Tryptophan führt. Verschiedene transgene Linien mit dieser Mutation exprimieren während der Laktation das Transgen unterschiedlich stark in Epithelzellen der Mammae:

W1: intermediäre Expression (d. h. ca. 50-60% der Epithelzellen exprimieren das Transgen)

W10: hohe Expression (d. h. ca. 90-100% der Epithelzellen exprimieren das Transgen)

WAP-mutp53^{R270H}: Das *p53* Mini-Gen enthält eine Punktmutation an der Aminosäure-Position 270, die zu einem Austausch von Arginin zu Histidin führt. Auch hier wurden unterschiedliche Linien analysiert:

H22: keine bis sehr schwache Expression (ca. 1-3% der Epithelzellen exprimieren das Transgen)

H8: hohe Expression (ca. 90-100% der Epithelzellen exprimieren das Transgen)

1.2.2 WAP-T transgene Mauslinien

Die „frühe“ Gen-Region des SV40 Virus steht unter der Kontrolle des murinen WAP-Promotors (Schulze-Garg *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Linien exprimieren in spezifischer Form das Transgen während der Laktation unterschiedlich stark in Epithelzellen der Mammae:

WAP-T1: hohe Expression (d. h. ca. 90-100% der Epithelzellen exprimieren das Transgen)

WAP-T-NP8: intermediäre Expression (d. h. ca. 50-60% der Epithelzellen exprimieren das Transgen)

WAP-T-NP6: schwache Expression (ca. 3-5% der Epithelzellen exprimieren das Transgen)

1.2.3 WAP-T x WAP-mutp53 transgene Mauslinien

In dieser Arbeit wurde vorwiegend die bi-transgene Linie T1-H22 analysiert. Im Gegensatz zu der mono-transgenen (*mutp53*) H22 Linie, die während der Laktation keine Expression zeigt, kommt es bei der bi-transgenen T1-H22 Linie aufgrund epigenetischer Einflüsse zu einer erhöhten Anzahl *mutp53* exprimierender Epithelzellen (Krepulat *et al.*, 2005).

2 MOLEKULARBIOLOGISCHES MATERIAL

2.1 Verwendete Plasmide und BAC Klone

2.1.1 Plasmide

pWAP-T Die „frühe“ Genregion des SV40 Virus steht unter der Kontrolle des murinen *wey acidic protein* (WAP)-Promotors; kloniert in pUC18 (Tzeng *et al.*, 1993).

pWAP-mutp53^{R245W} Das p53 Mini-Gen mit der Punktmutation an der Aminosäureposition 245, die zu einem Austausch von Arginin zu Tryptophan führt, steht unter der Kontrolle des murinen *wey acidic protein* (WAP)-Promotors (Krepulat *et al.*, 2005); kloniert in pUC18.

2.1.2 BAC Klone

RP23-239E3: Start: 17345951, Ende: 17546859, Länge: 200909 Nukleotide

RP23-444N4: Start: 17538084, Ende: 17724528, Länge: 186445 Nukleotide

Dabei handelt es sich um überlappende BAC Klone auf Chromosom 6 (*c-met* Locus) der Maus.

RP23-422F2: Start: 102767170, Ende: 102965274, Länge: 198105 Nukleotide

RP23-133J13: Start: 102576275, Ende: 102776061, Länge: 199787 Nukleotide

Hierbei handelt es sich um zwei sich überlappende BAC Klone am anderen Ende (als *c-met*) des murinen Chromosom 6 als interne Kontrolle (*cntn3* Lokus).

2.2 Enzyme und DNA-Längenstandards

Phusion™ High-Fidelity Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
RNaseA	Sigma, Taufkirchen
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
1 kb DNA-Längenstandard	Gene Ruler, MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA- Längenstandard	Gene Ruler, MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp + 500 bp DNA- Längenstandard	O' Range Ruler, MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 1: Verwendete Primer

Primer	Bp	Orien.	Tm	Org.	Beschreibung	Einsatz in	Sequenz 5' - 3'
p53E1b	22	⇒	70	Maus	murines p53 Exon I; Pos.: 436-457	Sequenzierung	cat cct ggc t t agg t g cga c
FKR 4	21	⇐	72	HA-Tag	letzten sechs Codons des HA-Tag (A Y D P V D)	Transgen- identifizierung	cag gcg t g t g g c acg t g
FKR 12	24	⇒	72	Maus	murines p53 Exon VI; Pos.: 578-601	RT-PCR	ggg t g aag gaa a t t t g t c c g
p53-13	22	⇒	70	Maus	murines p53 Exon IV; Pos.: 107-128	Southern-Sonde	gcc a t c acc t a c t g c a t g g a c
p53-14	22	⇐	70	Maus	murines p53 Intron 4; Pos.: 473-494 ab Start Intron 4	Southern-Sonde	gcc t g aac t a c a g aga t g g c
p53-19	24	⇒	72	Maus	murines p53 Intron 9	Transgen- identifizierung	g t a g t g g a gcc agc t a a g t g g
p53-STOP	22	⇐	70	Maus	murines p53 Exon XI; Pos.: 1170-1149	Transgen- identifizierung	g t t a g t c agg ccc cac t t t c
mp53-VIII	23	⇐	72	Maus	murines p53 Exon VIII; Pos.: 889-867	Sequenzierung	gca g t t c a g ggc aaa gga c t t c c
p53-11F	21	⇒	68	Maus	murines p53 Intron 1; Pos.: -943- -923, (vom ATG Exon II zurückgezogen)	w p53 identifizierung	c t g g c t g t a c t g t t c c g a g
p53-12R	21	⇐	68	Maus	murines p53 Intron 2; Pos.: 118-138, (vom ATG Exon II in das Intron 2 weitergezogen)	w p53 identifizierung	gga gga t a c agg c a t ggc ggg
1270	21	⇐	72	Maus	murines p53 3 ^a Bereich; Pos.: 1270-1250, nicht in Pseudogen	w p53 RT-PCR, Δ Pseudogen	ggc agc aga agg gac c g g a g

AC	28	⇒	82	SV40	Pos. 3666-3692 in SV40 Genom, bzw. Pos. 1133-1160 in der SV40 frühen Region in WAP-TP bsm id	Transgen-Identifizierung: WAP-T	t a t g t a g c a g a g c c t g t a g a a c c a a a c
DC	22	⇐	66	SV40	Pos. 4431-4410 in SV40 Genom, bzw. Pos. 1898-1877 in der SV40 frühen Region in WAP-TP bsm id	Transgen-Identifizierung: WAP-T	g a g a a a g g t a g a a g a c c c a a g
T1	22	⇒	72	SV40	Pos.: 2780-2801 in SV40 Genom	RT-PCR (LT, st 17k t), Southern-Sonde	c a g a c t g t g a g g a c t g a g g g g c
T4	23	⇒	72	SV40	Pos.: 4198-4220 in SV40 Genom	RT-PCR	g c a g a c a c t c a t g c c t g t g g
T9	25	⇐	70	SV40	Pos.: 5140-5116 in SV40 Genom	RT-PCR, Southern-Sonde	g g a a t t t t t g c a g c t a a t g g a c c t t
T11	23	⇒	72	SV40	Pos. 3631-3653 in SV40 Genom	RT-PCR	c a g t g a g c a a g c a a c t c c a g c
p16fw	20	⇒	72	Maus	p16 INK4a; G i 15077429 Intron 1; Pos. 2409-2428	Sequenzierung	c a c t a a t t c c g c g a g g a a
p16rev	22	⇐	64	Maus	p16 INK4a; G i 15077429 Intron 2, Pos. 2652-2673	Sequenzierung	c t g g g g t g c a t t t c a a a t g g
p1619 fw	21	⇒	66	Maus	p16 INK4a; G i 15077429 Intron 2, Pos. 7473-7493	Sequenzierung	c a g c g g a g c t t g t a c a t a g g
p1619 rev	20	⇐	64	Maus	p16 INK4a; G i 15077429 Exon II, Pos. 7677-7696	Sequenzierung	a c c a c c a g c g t t c a g g a a
actin-fw	21	⇒	70	Maus	murines Aktin; G l: 6671508 Pos.: 595-615 (in Exon)	Standard für cDNA	c t a c g c c a t c t g c g t t g g
actin-rev	22	⇐	70	Maus	murines Aktin; G l: 6671508 Pos.: 963-984 (in Exon)	Standard für cDNA	c a c c a g a c a g c a c t g t t g g c
actin-N	21	⇒	70	Maus	murines Aktin; G l: 6671508 Pos.: 749-769 (in Exon)	Kontrolle in Standard-PCR	c g a g c a g g a g a t g g c c a c t c
actin-H	21	⇐	70	Maus	murines Aktin; Chromosom 5 Pos.: 143169131- 143169111 (in Intron)	Kontrolle in Standard-PCR	g t g a g c t t c t g g g t g c t g g g
A2	18	⇒	56	Maus	murines p53 Exon V; Pos.: 416-433	Sequenzierung (von A. O tb)	t t g c a g t t g t g g t c a g
A4	19	⇒	60	Maus	murines p53 Exon VIII; Pos.: 788-806	Sequenzierung (von A. O tb)	g a c g g g a c a g c t t g a g g t
mp53-1Seq	20	⇐	66	Maus	murines p53 Exon IV; Pos.: 334-315	Sequenzierung (von G.Boehden)	g c a g g a a g c c c a g g t g g a a g

Bp: Anzahl der Basenpaare; **Orien.**: Orientierung des Primers: vorwärtsgerichtet (⇒) oder rückwärtsgerichtet (⇐); **Tm**: Schmelztemperatur des Primers (°C); **Org.**: Organismus, aus dem die DNA-Sequenz des aufgeführten Primers stammt; **Pos.**: Nukleotidposition im murinen p53 Gen (Eliyahou *et al.*, 1985; Schedin, 2006), bzw. im SV40 Genom, INK4a-Lokus und Aktin.

2.4 Antikörper

α-p53 (murin)	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, SAPU
α-HA	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, MoBiTec
R15	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen (denaturiertes SDS-) T-Ag (Deppert & Pates, 1979).

Farbstoffgekoppelte Antikörper:

α-Kaninchen-Alexa488	IgG aus Esel, konjugiert mit Alexa488, Molecular Probes #A21206, MoBiTec
----------------------	--

3 CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

Soweit nicht anders angegeben, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität der Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma verwendet. Spezielle (Bio)-Chemikalien und andere Materialien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

BAC Klone	Invitrogen, Karlsruhe
Carmin	Sigma, Steinheim
Cryogefäße	Nunc (VWR Frankfurt)
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
[$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP und [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP	Hartmann Analytic, Braunschweig
spezifische Aktivität jeweils 3.000 Ci/mmol	
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier Whatman 3 MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Formaldehydlösung min. 37% säurefrei	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Handschuhe Safeskin (Nitril und Latex)	Kimberly Clark, Zaventem, Belgien
Histologiekassetten	TurbOflow, Microm, Walldorf
	TissueTek, Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Hybond-XL Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
Methylsalicylat	Merck, Darmstadt
Objektträger	SuperFrost/ Plus, Assistant, Sondheim
Oligonukleotide	Sigma ARK, Darmstadt
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR- Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
PP-Zentrifugationsgefäße (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt
Zellstoff (Pehazell)	Hartmann, Heidenheim
Lysin Matrix D Tubes	Qbiogene, Heidelberg

4 KITS

ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing	PE Biosystems, Weiterstadt
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel, Düren
Megaprime™ DNA Labelling Systems	Amersham Biosciences, Freiburg
NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel, Düren
Puregene Genomic DNA Purification Kit	Gentra, Minneapolis
RNeasy MinElute™ Cleanup	Qiagen, Hilden
ThermoScript™ RT-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe
Turbo DNA-free™	Ambion, Huntington

5 ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN

<u>DNA-Probenpuffer (10 x):</u>	<u>TAE (50 x):</u>	<u>TE-Puffer:</u>
0,1% Xylencyanol	2 M Tris	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
50% Glycerol	0,5 M Essigsäure (100%)	1 mM EDTA
10 x TAE	0,05 M EDTA	
0,1 M EDTA pH 8,0		
0,1% SDS		
 <u>PBS:</u>		 <u>TBE (10 x)</u>
137 mM Natriumchlorid		0,89 M Tris
2,7 mM Kaliumchlorid		0,89 M Borsäure
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)		0,02 M EDTA pH 8,0
1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)		
pH 7,4		

6 GERÄTE

Analysenwaagen	PE 360, PM 460, P 1210, H 54 AR (Mettler, Gießen)
Digitalkamera	Canon PowerShot G3
Durchflußcytometer	Coulter epics XL-MCL, Beckmann Coulter, Krefeld
Fast Prep Homogenisator	Fast Prep FP120, Qbiogene, Heidelberg
Geigerzähler	LB122, Berthold, Dortmund
Gelelektrophorese-System	Horizon 11.14, Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein
Geldokumentations-System	BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen
Hybridisierungsöfen	Typ 400 HY-E, Bachofer, Laatzen

pH-Meter	PHM 82, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Phosphoimager	Fujifilm BAS-2500, Raytest, Straubenhardt
Photometer	Ultrospec 3000 pro, Amersham Biosciences, Freiburg
Pipetten (20 µl, 200 µl und 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipette (2,5 µl)	Eppendorf research, Eppendorf, Hamburg
Scintillationszähler	LS 6500, Beckman Coulter, Krefeld
Sektionsbesteck	Waldemar Link GmbH&Co, Hamburg
Spannungsquelle	EPS 2A 200, Hoefer, San Francisco, USA
Stereomikroskop	Stemi 2000-C, Zeiss, Göttingen
Taumelschüttler	Polymax 2040, Heidolph, Schwabach
Tierohrknipser	Fischer Scientific, Schwerte
Thermocycler	PTC-200, MJ Research, Massachusetts, USA
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
UV-Crosslinker	1800 Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Wasserbad	W13 Fisons, Haake, Karlsruhe
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus, Hanau Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg

V Methoden

1 TIERPRÄPARATION

1.1 Organentnahme

Versuchstiere wurden entweder bei schlechtem Allgemeinzustand, im moribunden Stadium oder bei Vorliegen von Tumoren mit 2 cm im Durchmesser präpariert. Das Versuchstier wurde vor der Präparation mit Diethylether betäubt und getötet. Anschließend erfolgte die makroskopische Beurteilung der Mammae (siehe Abbildung 4) und Tumore (*Staging*), sowie die Organentnahme in folgender Reihenfolge: Mammae bzw. -Tumore, Milz, Leber, Lunge. Die Gewebeproben wurden schnell je zur Hälfte in flüssigem Stickstoff und in saurem Formalin fixiert. Das Gewebe wurde ü/N in saurem Formalin bei RT fixiert, am nächsten Tag in Formalin umgesetzt und bei 4°C bis zur Paraffin-Einbettung gelagert.

saures Formalin:

4% Formaldehydlösung min. 37% säurefrei
1% Essigsäure
in Aqua dest.

Formalin:

4% Formaldehydlösung min. 37% säurefrei
in Aqua dest.

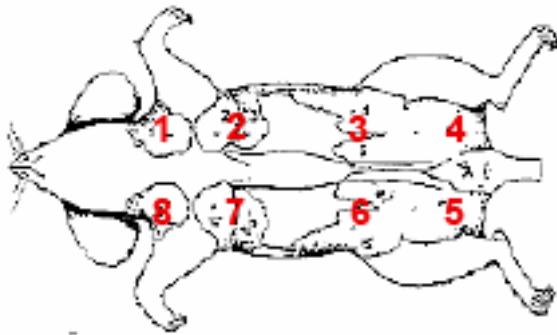


Abbildung 4: Schematische Darstellung der acht Mammae einer Maus

1: zervikale Mamma links, **2:** thorakale Mamma links, **3:** abdominale Mamma links, **4:** inguinale Mamma links, **5:** inguinale Mamma rechts, **6:** abdominale Mamma rechts, **7:** thorakale Mamma rechts, **8:** zervikale Mamma rechts.

1.2 Langzeitstudien

Versuchstiere wurden spätestens in einem Alter von 16 bis 18 Monaten getötet. Die Präparation erfolgte wie oben beschrieben. Folgende Organe wurden entnommen: Mamma #2 wurde für eine *Whole Mount* Färbung (siehe 1.4) präpariert, die Mammae #6 und #7 in saurem Formalin fixiert, sowie Mamma #3, Milz und Leber in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lunge wurde je zu Teilen in flüssigem Stickstoff gefroren und in saurem Formalin fixiert.

1.3 Laktations-/ Expressionsstudien

Präparationen für die zeitliche und Gewebe-spezifische Analyse der Transgen-Expression wurde an Tieren einer Linie am Tag 5 pp (post partum), Nullipara gleichen Alters, und am Tag 50 pp durchgeführt. Folgende Organe wurden entnommen und fixiert: Mammae #2 und #6 in saurem Formalin, #3 und #7 in flüssigem Stickstoff. Milz, Leber und Lunge wurden je zur Hälfte in flüssigem Stickstoff und in saurem Formalin fixiert.

1.4 Whole Mount Färbung

Die Mammae wurden bei der Präparation auf einen Objektträger gezogen, kurz bei RT getrocknet und 2-4 h in Carnoy-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Mammae für 30 min in Aceton inkubiert, und jeweils 25 min in einer absteigenden Alkoholreihe (70%, 50%, 30% EtOH) hydriert. Nachdem die Präparate 5 min in einem Wasserbad gewässert worden waren, wurden sie ü/N bei RT in der Carmin-Lösung gefärbt. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 25 min in 70%, 95% und 100% EtOH) erfolgte eine Dehydrierung des Gewebes. Nach zwei Xylol-Bädern von je 15 min wurden die Präparate bis zur Fotodokumentation am Stereomikroskop in einer Glasküvette mit Methylsalicylat aufbewahrt.

Carnoy-Lösung:

6 Teile 100% EtOH
3 Teile Chloroform
1 Teil Eisessig

Carmin-Färbelösung:

1 g Carmin
2,5 g Aluminium Potassium Sulfat Dodecahydrate
(Reagent Grade ACS)
500 ml Aqua dest.
20 min kochen, wieder auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen,
Lösung filtrieren, 1 Kristall Thymol zur Konservierung zugeben,
bei 4°C dunkel aufbewahren, Lösung hält mehrere Monate

1.5 Phänotypisierung der Mammae (*Staging*)

Die Mammae wurden makroskopisch während der Präparation bewertet und fotografiert. Dazu wurden die Mammae und die Tumore ausgemessen und einem definierten *Staging* zugeordnet:

0 = oB; ohne Befund	3 = Tumor 0,3-0,8 cm
1 = Mammae mit diffuser Verdickung	4 = Tumor < 1,6 cm
2 = solide Knötchen (bis 0,2 cm)	5 = Tumor > 1,6 cm

1.6 Systematisierte histologische Beurteilung der Mammae und der Mammakarzinome (*Grading*)

Gewebeschnitte Formalin-fixierter Mammae wurden mit Hematoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und von Herrn Dr. Löhler (HPI) mikroskopisch beurteilt. Aufgrund morphologischer Merkmale wurden dabei den Brustdrüsengewebe bzw. Karzinome in Anlehnung an die Richtlinien der murinen Mammakarzinomklassifizierung der Annapolis Konsensus Konferenz (Cardiff *et al.*, 2000) *Grading* Werten von 0 bis 4 zugeordnet.

oB = normal, ohne Befund

0 = intraepitheliale Neoplasien, duktale Dysplasien, *in situ* Karzinome, minimal invasive Mamma-Karzinome

1 = gut differenzierte Mammakarzinome (glandulär, tubulär, papillär);

2 = mäßig bis schlecht differenzierte Mammakarzinome;

3 = undifferenzierte Mammakarzinome;

4 = undifferenzierte Karzinome mit Anaplasien

2 IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN

Die immunhistologischen Arbeiten und die Beurteilungen wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Löhler (HPI, Abt. Molekulare Pathologie) durchgeführt.

Das zu analysierende Gewebe wurde wie unter 1.1 beschrieben präpariert und in 4% Formalin mit 1% Essigsäure fixiert. Die weitere Behandlung des fixierten Gewebes (Einbetten, Schneiden und Färben) wurde von Frau Wegerich (HPI, Abt. Molekulare Pathologie) nach etablierten Protokollen durchgeführt.

Für die immunhistochemischen Markierungen wurden die Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen murines p53 (polyklonaler Kaninchen α -p53 Antikörper, SAPU), gegen den transgen-spezifischen HA-Tag (polyklonaler Kaninchen α -HA Antikörper, MoBiTec) und gegen SV40 T-Ag (R15, polyklonaler Kaninchen α -SDS-T-Ag Antikörper) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Phosphatase- oder Peroxidase-gekoppelten Ziege α -Kaninchen Antikörpern, die an ein Polymergerüst gekoppelt sind, behandelt. Die Enzyme wurden durch Reaktion mit geeigneten Substraten sichtbar gemacht.

3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.1 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Messung wurde das Zellzyklusprofil, d. h. die prozentualen Anteile der distinkten Zellzyklus Phasen, bzw. der DNA-Gehalt unterschiedlicher Zellpopulationen innerhalb eines Gewebestückes beobachtet (*fluorescence activated cell sorting* (FACS) Analyse). Durch die zusätzliche T-Ag Immunfluoreszenzmarkierung lässt sich der prozentuale Anteil T-Ag positiver Zellen bestimmen und zusätzlich im Zellzyklus Profil darstellen.

Die Unterscheidung von G1, S und G2/M Phase-Zellen sowie apoptotischer Zellfragmente beruht dabei auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zelle, der durch Färbung mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid detektiert werden kann; G2 und M-Zellen sind mit dieser Methode nicht unterscheidbar.

3.1.1 Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie

In Stickstoff gefrorenes Gewebe (siehe Tabelle 3) wurde in PBS/EDTA aufgetaut. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Kolbens einer 10 ml Spritze durch ein feinmaschiges Metallsieb gepresst und mit PBS/EDTA abgespült. Die Suspension wurde dann durch ein FACS-Sieb weiter vereinzelt, in ein 15 ml Zentrifugationsgefäß überführt, zentrifugiert (6 min, 310 g, 16°C) und der Überstand abgenommen. Das Zell-Pellet wurde durch Zugabe von 500 µl gekühltem (4°C) PBS/EDTA unter stetigem vortexen (bei geringer Stufe) aufgelockert und die vereinzelteten Zellen durch tropfenweise Zugabe von 5 ml 80% Methanol (-20°C) fixiert. Um einen möglichst guten Austausch des intrazellulären Wassers gegen Methanol zu gewährleisten, wurden die Zellsuspensionen mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

PBS/EDTA

0,1% (w/v) EDTA in PBS
pH 7,5

3.1.2 Durchflusszytometrie mit T-Ag Immunfluoreszenz-Markierung

Die zusätzliche T-Ag Immunfluoreszenzmarkierung ermöglicht die Bestimmung des prozentualen Anteils T-Ag positiver Zellen in einer Zellpopulation, sowie deren Darstellung im Zellzyklusprofil. Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden die in Methanol fixierten und bei -20°C gelagerten Zellen (siehe 3.1.1) zunächst auf Raumtemperatur erwärmt (ca. 10 min) und anschließend aus der Methanol-Suspension abzentrifugiert (6 min, 310 g, 16°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in jeweils 5 ml PBS/EDTA (siehe 3.1.1) vorsichtig resuspendiert und für ca. 5 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (6 min, 310 g, 16°C) und Absaugen des Überstands wurden die Zellsedimente mit 120-300 µl (je nach Größe) Primär-Antikörper α -T-Ag (R15, 1:300 in AB-Puffer) für 30 min inkubiert. Danach wurden je 5 ml AB-Puffer zugegeben, gründlich durchmischt, abzentrifugiert (6 min, 310 g, 16°C), der Überstand verworfen und mit 120-300 µl Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Esel α -Kaninchen-Alexa488, 1:500 in AB-Puffer) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden wieder jeweils 5 ml AB-Puffer zugegeben und gründlich durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation (6 min, 310 g, 16°C) und Absaugen des Überstands wurden die Zellsedimente in je 0,5-1 ml Färbelösung resuspendiert und für mindestens 30 min bei Dunkelheit und 37°C im Wasserbad inkubiert. Vor der Messung wurden die Proben im Dunkeln auf RT abgekühlt. Die Messung der Propidiumiodid- und T-Ag-Fluoreszenz erfolgte an einem Coulter Epics XL-MCL-Gerät mit der Betriebs-Software System II (Beckmann-Coulter). Dabei wurden jeweils 50.000 Ereignisse ohne Zelltrümmer und Dubletten erfasst. Für die Darstellung der FACS Profile wurde die Software Expo-32 (Beckmann-Coulter) verwendet.

AB-Puffer:

PBS
1% FCS
0,1% Triton X-100

Färbelösung:

1:15 Propidiumiodid-Stammlösung
1:30 RNase A-Stammlösung
in PBS
jeweils frisch angesetzt; lichtgeschützt gelagert

Propidiumiodid Stammlösung:

0,5 mg/ml Propidiumiodid in 380 mM Natriumcitrat pH 7,0
Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

RNase A Stammlösung:

10 mg/ml RNase A in 10 mM Natriumacetat pH 5,2 lösen, 15 min kochen, nach langsamer Abkühlung auf RT pH-Wert durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Tris-HCl pH 7,4 einstellen. Lagerung in Aliquots bei -20°C.

3.2 **Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)**

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Methode zum spezifischen und sensitiven Nachweis von DNA-Sequenzen (z. B. Gene) im nativen Kontext (*in situ*). Hierbei dient die Methode vor allem der Gen-Kartierung und Identifizierung von chromosomalen Abnormalitäten, wie zum Beispiel chromosomaler Deletionen, Translokationen, sowie Genamplifikationen und -Deletionen. FISH basiert auf dem Prinzip, daß sich Einzelstrang-DNA an komplementäre DNA-Sequenzen spezifisch anlagert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Überprüfung der durch die CGH (siehe 4.10) detektierten Amplifikation des *c-met* Locus eingesetzt. Die Ziel-DNA aus Mammakarzinomzellen wurden hierbei auf einem Objektträger fixiert. Hierzu wurden von den zu analysierenden MaCa Tupfpräparate angefertigt. Kleine Stücke von in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Tumor Proben wurden angetaut und vorsichtig auf Objektträger getupft. Nach dem Trocknen wurden die Tupfpräparate entweder bei -70°C gelagert, oder direkt von der Arbeitsgruppe um PD Dr. Reiner Siebert (Institut für Humangenetik, Universität Schleswig-Holstein Campus Kiel) in die FISH Analyse eingesetzt. Unter der Anleitung von Dr. José I. Martín-Subero wurde die FISH Analyse für den *c-met* Locus und einer internen Kontrolle (*cntn3*) nach etablierten Protokollen durchgeführt. Die Test-Sonde wurde mit Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelten Nukleotiden markiert. Die Ziel-DNA und die markierte DNA-Sonde wurden durch Hitze denaturiert, und anschließend hybridisiert. Nach Waschschritten zur Entfernung ungebundener Probe erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit dem DNA-bindenden Fluorochrom DAPI (4,6-diamidino-2-Phenylindol).

Als Sonden wurden je zwei sich überlappende BAC Klone (über Random Priming mit fluoreszierendem dUTP markiert) für *c-met* und *cntn3* verwendet, die mit Hilfe des „ucsc Genome Browser“ (<http://genome.ucsc.edu>) ausgesucht wurden (siehe Material 2.1.2).

4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.1 DNA-Isolierung

4.1.1 Aufreinigung muriner genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

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

Lysispuffer:

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

Proteinase K:

Stamm-Lösung:
20 mg/ml in H₂O;
Lagerung bei -20°C

Bei Schwanzbiopsien älterer Tiere wurde die genomische DNA unter Verwendung des NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben isoliert. Etwa 100 ng (entsprechen ca. 1-2 µl) der hierbei isolierten DNA wurden für die nachfolgenden PCR-Analysen zur Identifizierung transgener Tiere (siehe 4.4) eingesetzt.

4.1.2 Isolierung genomischer DNA für Southern-Blot Analyse und CGH

Die Isolierung genomischer DNA aus unterschiedlichen Geweben wurde unter Verwendung des Puregene Genomic DNA Purification Kits (Gentra) mit nachfolgendem RNA-Verdau gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

4.2 Aufkonzentrierung, Reinigung und Auftrennung von Nukleinsäuren

4.2.1 Ethanolfällung von DNA

Zur Reinigung und Aufkonzentrierung der DNA wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und ein 2,5-faches Volumen an absolutem Ethanol zugegeben. Nach einer 30-minütigen DNA Präzipitation bei -70°C wurde die DNA durch Zentrifugation sedimentiert (30 min, 12000 g, 4°C), und das Präzipitat mit 70% EtOH gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet nach kurzem Trocknen in TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

4.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen und präparativen Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von Nukleinsäure-Fragmenten. Den Fragmentgrößen entsprechend wurden Agarose-Gele von 0,7-2% verwendet.

Die Auftrennung von DNA und RNA erfolgte in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur mit 14 x 11 x 1 cm, bzw. 11 x 9 x 1 cm 0,7-2% (w/v) Agarose-Gelen bei Spannungen zwischen 45 und 120 V in 1 x TAE- (für DNA) oder 0,5 x TBE-Puffer (für RNA). Zu untersuchende Nukleinsäure-Proben wurden mit 6 x Probenpuffer versetzt und in einem Ethidiumbromid haltigen Gel aufgetrennt. Die Nukleinsäuren wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und mit einer Geldokumentationsanlage aufgenommen. Durch den Vergleich mit verschiedenen DNA-Längenstandards wurde die Größe der aufgetrennten Nukleinsäuren bestimmt.

4.2.3 Agarose-Gelextraktion

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits (Macherey-Nagel) aus Agarose-Gelen extrahiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase-chain-reaction*) dient dazu, eine DNA-Zielsequenz *in vitro* zu amplifizieren. Man nutzt hierbei die Fähigkeit von thermostabilen DNA-Polymerasen, einen DNA-Einzelstrang ausgehend von einem kurzen doppelsträngigen Bereich zu einem Doppelstrang polymerisieren zu können. An das 3'-Ende eines zuvor hybridisierten Oligonucleotidprimers hängt die DNA-Polymerase die zur Zielsequenz komplementären Nukleotide an. Durch mehrmaliges Wiederholen der einzelnen Schritte - Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Elongation - kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung (ca. 10^6 - 10^7 -fach) eines DNA-Abschnittes zwischen zwei jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementären Oligonucleotidprimer (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). Allgemein wurde folgendes PCR-Programm während dieser Arbeit verwendet:

$$\mathbf{X} \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 3 \text{ min} \\ \left[\begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ s} \\ \mathbf{Y}^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ s} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad \mathbf{Z} \text{ s} \end{array} \right. \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 5 \text{ min} \end{array}$$

Die Annealing-Temperatur \mathbf{Y} sollte der Hybridisierungstemperatur (T_H) der Primer entsprechen. Die Hybridisierungstemperatur eines Primers kann nach folgender Formel berechnet werden (Suggs *et al.*, 1981): $T_H [^{\circ}\text{C}] = T_m - 5 = [4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})] - 5$

Die Oligonukleotidprimer wurden so generiert, dass sie bei 21-24 Nukleotiden eine ähnliche Schmelztemperatur (T_m) haben, nicht komplementär zueinander sind und keine bis schwache Sekundärstrukturen bilden.

Die Elongationszeit **Z** richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Als Richtwert gilt für die Elongationszeit: 1000 Bp/min. Bei *proof reading* Polymerasen sollte diese Zeit verlängert werden.

Die Variable **X** steht für die Anzahl der Zyklen. Ab einer bestimmten Zyklenanzahl verlässt man den Bereich der linearen Amplifizierung, was bei einer semi-quantitativen PCR zu beachten ist. Außerdem entfällt hier der abschließende Schritt (5 min bei 72°C), der dazu dienen soll, noch unvollständige Stränge fertig zu synthetisieren.

Folgender Reaktionsansatz (25 μ l) wurde in dieser Arbeit für die PCR verwendet:

- 1 x PCR-Puffer (10 x)
- 0,2 mM dNTP Mix each (2 mM each)
- 0,2 μ M Primer vorwärtsgerichtet (10 μ M)
- 0,2 μ M Primer rückwärtsgerichtet (10 μ M)
- 0,02 U/ μ l *Taq* DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)
- ca. 100 ng genomische DNA

4.4 Identifizierung transgener Tiere

Zur Unterscheidung der einzelnen Tiere wurden diese, unter kurzer Ethernarkose, durch ein Ohrloch an einer bestimmten Position markiert. Zusätzlich wurde mit einem sterilen Skalpell eine etwa 3 mm lange Schwanzbiopsie abgeschnitten und die Wunde verödet. Die Schwanzbiopsie wurde bis zur Aufreinigung (siehe 4.1.1) bei -20°C gelagert. Für die Identifizierung der transgenen Tiere wurden ca. 100 ng der genomischen DNA in folgende PCR-Reaktionen eingesetzt:

Die PCR zur Identifizierung des Transgens *mutp53* und dem endogenen *wtp53* fand unter den Standardbedingungen (siehe 4.3) mit einer Zyklenzahl (**X**) von 35, einer Annealing-Temperatur (**Y**) von 61°C und einer Elongationszeit (**Z**) von 60 s statt. Das berechnete PCR-Amplifikat der Primer p53-I9 und p53-STOP (siehe Material 2.3) betrug für das endogene *wtp53* 990 Bp und für das transgene *mutp53* 290 Bp.

Die PCR zur Identifizierung des endogenen *wtp53* mit interner *Aktin* Kontrolle fand ebenso unter den Standardbedingungen (siehe 4.3) mit **X** = 35, **Y** = 63°C und **Z** = 60 s statt.

Das berechnete PCR-Amplifikat mit den Primern I1F und I2R (siehe Material Tabelle 1) betrug für das endogene *wtp53* 1000 Bp und für *Aktin* mit den Primern actin-N und actin-H (siehe Material Tabelle 1) 500 Bp.

Die PCR zur Identifizierung des transgenen *T-Ag* mit interner *Aktin* Kontrolle fand ebenso unter den Standardbedingungen (siehe 4.3) mit **X** = 35, **Y** = 60°C und **Z** = 1 min statt.

Das berechnete PCR-Amplifikat mit den Primern AC und DC (siehe Material Tabelle 1) betrug für das transgene *T-Ag* 765 Bp und für *Aktin* mit den Primern actin-N und actin-H 500 Bp.

4.5 Southern-Blot Analyse

Diese Methode wurde zur Identifizierung eines bestimmten Gens aus der Gesamt-DNA entwickelt. Die DNA wird mit gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Man erhält dadurch unterschiedlich lange Fragmente, die in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Nach alkalischer Vorbehandlung wird die DNA auf eine Membran transferiert und anschließend mit einer radioaktiven DNA-Sonde, die komplementär zur Zielsequenz ist, hybridisiert. Auf einem Röntgenfilm oder einer Phosphoimager-Platte werden die entsprechenden Banden detektiert. Aufgrund der aufgetragenen Marker-DNA kann die Größe des hybridisierten, markierten Fragments bestimmen werden.

Die Southern-Blot Analyse diente in dieser Arbeit zur Bestimmung der Anzahl von Transgen-Integrationsorten (sowohl von WAP-mutp53, als auch von WAP-T-Ag) bei den unterschiedlichen Mauslinien.

Hierzu wurde zunächst aus dem zu analysierendem Gewebe hochmolekulare DNA isoliert (siehe 4.1.2). Zur Qualitätskontrolle wurden 400 ng der isolierten DNA auf einem 0,8% Agarose-Gel aufgetrennt. Eine definierte Bande oberhalb der 10000 Bp Bande des 1 kb DNA-Längenstandard ist Indiz für intakte hochmolekulare DNA.

4.5.1 WAP-T Southern-Blot

Der Restriktionsverdau von 10 µg genomischer DNA erfolgte in einem 50 µl-Ansatz ü/N bei 37°C in einem Doppelverdau: *EcoRI* (30 U) diente dabei zur Fragmentierung der hochmolekularen genomischen DNA, und der singulären Schnitt im *WAP-T* Transgenkonstrukt wurde durch *KpnI* (30 U + BSA) gesetzt. Als Kontrolle wurden 0,2 ng *pWap-T* Plasmid nur mit *KpnI* 30 min geschnitten. Anschließend wurden dem Restriktionsverdau entsprechende Mengen 6 x Ladepuffer zugegeben.

Die DNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der geschnittenen DNA erfolgte in einem 0,7% TAE Agarose-Gel (10 x 14 x 11 cm) im 4°C Raum ü/N. In den äußeren Spuren wurden 0,2 µg Plasmid und 0,2 µg des 1 kb DNA-Längenstandards (Fermentas, 0,05 µg/µl) aufgetragen. Zunächst wurde für 30 min eine Spannung von 110 V angelegt, das ein besseres Einlaufen der Probe in das Gel ermöglichte. Danach wurde die DNA ca. 13 h bei 40 V aufgetrennt.

Nach der Dokumentation unter UV Licht wurde die DNA im Agarose-Gel ca. 10 min unter Schwenken depuriniert, 30 min denaturiert und 30 min neutralisiert. Zwischen diesen Schritten wurde das Gel kurz in H₂O geschwenkt.

Depurinierungslösung:

0,125 M HCl

Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH
1,5 M Natriumchlorid

Neutralisierungslösung:

1,5 M Natriumchlorid
0,5 M Tris
pH 7,5

Das Blotting der DNA aus dem Agarose-Gel auf eine Nylonmembran erfolgte anschließend mittels Kapillarkräften über Nacht. Als Transferpuffer diente 20 x SSC (pH 7,0). Am nächsten Tag wurden auf der Membran die Taschen des Gels, sowie die obere Seite der Membran mit Kugelschreiber markiert und die DNA durch UV-Licht ($70000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) auf der Membran fixiert.

20 x SSC:

3 M Natriumchlorid
0,3 M Tri-Natriumcitrat
pH 7,0

Die Herstellung der T-Ag DNA-Sonde erfolgte über eine Standard-PCR (siehe 4.3), in die 5 ng *pWAP-T* Plasmid DNA als Template und die Primer T1 und T9 eingesetzt wurden (pro 25 μl PCR-Ansatz). **Y** betrug dabei 65°C , **Z** 2 min 25s und **X** 35. Das 2360 Bp große PCR-Produkt wurde zunächst über ein Säulchen aufgereinigt (NucleoSpin Extract Kit, Macherey-Nagel) und anschließend in die Markierungsreaktion eingesetzt.

Die radioaktive Markierung der T-Ag DNA-Sonde mit der Random-Prime-Methode erfolgte mit Hilfe des Megaprime DNA-Labeling Systems von maximal vier Nukleotiden (Feinberg und Vogelstein 1983, 1984 modifiziert von Amersham). Gemäß Hersteller-Angaben wurden pro Ansatz 25 ng des PCR-Produktes eingesetzt und mit $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ und $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (spezifische Aktivität jeweils 3.000 Ci/mmol) markiert. Danach wurde die radioaktiv markierte Sonde wieder über ein Säulchen aufgereinigt (NucleoSpin Extract Kit, Macherey-Nagel).

Vor der Hybridisierung wurde die Membran zunächst kurz in H_2O und dann in 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2 äquilibriert. Daraufhin erfolgte in dem Hybridisierungssofen die Prähybridisierung der Membran in einer Plexiglasröhre mit dem auf 65°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer (ca. $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ Membran) für mindestens 30 min bei 65°C . Die radioaktiv markierte T-Ag Sonde wurde nach Denaturierung (5 min in 0,1 M NaOH Endkonzentration bei 65°C) und Neutralisierung (0,1 M HCl Endkonzentration) zum Prähybridisierungs-Ansatz gegeben (ca. $0,5 \times 10^6$ bis 2×10^6 counts/ml). Dabei sollten 3 ng Sonde/ml Hybridisierungspuffer nicht überschritten werden. Die Hybridisierung der Membran erfolgte ü/N bei 65°C . Die nun einzelsträngige radioaktiv markierte Sonde bindet an die komplementäre immobilisierte Ziel-DNA Sequenz auf der Membran, und bildet in diesem Bereich dauerhafte Basenpaarungen aus.

Hybridisierungspuffer:

500 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2
7% SDS
1% BSA
1 mM EDTA

Das Waschen der Membran erfolgte am nächsten Tag um die unspezifisch gebundene Sonde von der Membran zu lösen. Zunächst wurde mit der Waschlösung I (2 x 10 min bei 65°C) und danach mit der Waschlösung II (4 x 20 min bei 65°C) gewaschen. Dies erfolgte so lange, bis nur noch eine

Radioaktivität von ca. 70 bis 100 zu detektieren war. Es folgte ein kurzes Spülen der Membran in Waschlösung III bei RT. Dann wurde die Membran unverzüglich in Frischhaltefolie eingeschlagen und eine Phosphoimager-Platte für 2 h bis ü/N aufgelegt. Die Detektion erfolgte über einen Phosphoimager (Fujifilm BAS-2500, Raytest) und wurde in Form eines Autoradiogrammes dargestellt.

Waschlösung I:

40 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2
5% SDS
0,5% BSA
1 mM EDTA

Waschlösung II:

40 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2
1% SDS
1 mM EDTA

Waschlösung III:

0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2

4.5.2 WAP-mutp53 Southern-Blot

Der Restriktionsverdau von 10 µg genomischer DNA erfolgte mit *Bam*HI (30 U) in einem 50 µl-Ansatz ü/N bei 37°C. Isolierte DNA aus den transgenen Mauslinien H3 und W12 wurden zusätzlich mit dem Enzym *Eco*RI (30 U) geschnitten. Als Kontrolle wurden 0,2 ng *pWap-mutp53^{R245W}* Plasmid mit *Bam*HI und *Eco*RI bei 37°C 30 min geschnitten.

Die DNA-Agarose-Gelelektrophorese und das Blotten wurden wie in 4.5.1 beschrieben durchgeführt.

Die Herstellung der mutp53 DNA-Sonde erfolgte über eine Standard-PCR (siehe 4.3). Als Template dienten pro 25 µl PCR-Ansatz 5 ng *pWAP-mutp53^{R245W}* Plasmid DNA. Als Primer wurden p53-13 und p53-14 verwendet, **Y** betrug 65°C, **Z** 50 s und **X** 35. Das 840 Bp große PCR-Produkt wurde zunächst über ein Säulchen aufgereinigt (NucleoSpin Extract Kit, Macherey-Nagel) und anschließend in die Markierungsreaktion eingesetzt.

Die radioaktive Markierung der Sonde wurde wie in 4.5.1 beschrieben durchgeführt.

Für die Hybridisierung wurde die Membran zunächst kurz in H₂O äquilibriert. Daraufhin erfolgte in dem Hybridisierungssofen die Prähybridisierung der Membran in einer Plexiglasröhre mit dem auf 55°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer (ca. 100 µl/cm² Membran) für mindestens 30 min bei 55°C. Nach der Denaturierung (5 min in 0,1 M NaOH bei 65°C) und der Neutralisierung (0,1 M HCl) wurde die radioaktiv markierte Sonde mit ca. 0,5 x 10⁶ bis 2 x 10⁶ counts/ml und max. 3 ng Sonde/ml Hybridisierungspuffer zum Prähybridisierungs-Ansatz gegeben. Die Hybridisierung erfolgte ü/N bei 55°C.

Hybridisierungspuffer:

50% Formamid deionisiert
 6 x SSC
 0.5% SDS
 2,5 x Denhard
 8% Dextransulfat
 5 mg Lachssperm DNA
 Vor Gebrauch wurde das Lachssperm 10 min gekocht und nach kurzem Abkühlen (auf Eis) zu der Hybridisierungslösung geben.

50 x Denhardt's:

1% Ficoll Typ 400
 1% Polyvinylpyrrolidon
 1% BSA
 in Aqua dest., sterilfiltrieren;
 Lagerung bei -20°C

Das Waschen der Membran erfolgte am nächsten Tag um die unspezifisch gebundene Sonde von der Membran zu lösen. Zunächst wurde mit der Waschlösung A (2 x 5 min bei RT) und anschließend mit der Waschlösung B (2 x 40 min bei 65°C) gewaschen. Abhängig von der Geigerzähler detektierten Radioaktivität auf der Membran wurde mit der Lösung B so lange gewaschen, bis über der Membran noch eine Radioaktivität von ca. 70 bis 100 zu detektieren war. Es folgte ein kurzes Spülen der Membran in Waschlösung C bei RT. Dann wurde die Membran unverzüglich in Frischhaltefolie eingeschlagen und eine Phosphoimager-Platte für 2 h bis ü/N aufgelegt. Die Detektion erfolgte über den Phosphoimager (Fujifilm BAS-2500, Raytest) und wurde in Form eines Autoradiogrammes dargestellt.

Waschlösung A:

1 x SSC

Waschlösung B:

0,1% SDS
 0,1 x SSC

Waschlösung C:

0,1 x SSC

4.6 Sequenzierung

Eine Variante der Desoxy-Sequenzierung nach Sanger (1977) stellt das *cycle sequencing* (Sears *et al.*, 1992) dar. Die Reaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems) durchgeführt. In diesem System dienen fluoreszenzmarkierte ddNTPs als Reaktionsterminatoren. Bei der Sequenzierung eines PCR-Produktes wurde zunächst das entsprechende gesamte DNA-Fragment mittels Phusion™ High-Fidelity Polymerase (NEB) nach Herstellerangaben in einem Standard-PCR-Ansatz (siehe 4.3) amplifiziert, und über eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion (siehe 4.2.3), und Ethanol fällung (siehe 4.2.1) aufgereinigt. Der Sequenzierungs-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten (20 µl Gesamtvolumen):

5 x Puffer,
 40 ng DNA aus einer aufgereinigten PCR-Reaktion,
 10 pmol Primer,
 3 µl BigDye

Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen mit 25 Zyklen:

	96°C	1 min
25x	96°C	10 s
	50°C	30 s
	60°C	4 s

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Ethanol gefällt (siehe 4.2.1) und das getrocknete Pellet durch den Sequenzierservice (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurologie, Hamburg) in einem ABI-Sequenator 377, analysiert. Der Sequenzvergleich erfolgte anschließend durch das *BLAST*-Programm des NCBI-Servers (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.7 RNA-Isolierung mit anschließendem DNA-Verdau und Qualitätsprüfung

50-100 mg in Stickstoff gefrorenes Gewebe wurden in 1 ml Trizol (Invitrogen) angetaut, in Lysin Matrix D Tubes (Qbiogene) mit Hilfe eines Fast Prep Homogenisators (Qbiogene) 2 x 15 s homogenisiert, und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben 15 s lang kräftig geschüttelt, nochmals ca. 3 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (10 min, 12000 g, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde anschließend in einem neuen Eppendorf-Gefäß mit 500 µl 2-Propanol versetzt, invertiert und 10 min bei RT inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (10 min, 12000 g, 4°C) wurde die RNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 70% EtOH (mit 0,1% (v/v) DEPC-H₂O) gewaschen, und wieder zentrifugiert (5 min, 8000 g, 4°C). Das RNA-Pellet wurde nach Abpipettieren des Ethanols bei RT ca. 5-10 min getrocknet und je nach Pellet-Größe in 45-90 µl 0,1% (v/v) DEPC-H₂O bei 50°C für 10 min gelöst. Eventuell noch vorhandene DNA wurde mit Hilfe des Turbo DNA-*free*TM Kits (Ambion) nach Herstellerangaben verdaut.

Ein zusätzlicher Aufreinigungs- und Konzentrierungs-Schritt über Säulchen (RNeasy MinEluteTM Cleanup, Qiagen) fand bei der RNA statt, die für die RNA-Microarrays von Affymetrix (Gene Chip Mouse Genome 430 2.0) eingesetzt wurde (in Kooperation mit dem Institut der Klinischen Chemie, unter Prof. Wagener, UKE, Hamburg). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die RNA für die Microarrays sollte eine Konzentration > 2 µg/µl haben.

Die Reinheit der RNA wurde photometrisch durch den Quotienten 260/280 nm bestimmt und sollte zwischen 1,9 und 2,1 sein. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (1:100 Verdünnung in Tris-Puffer) wurden 400 ng der RNA auf einem 1% Agarose-Gel (in 0,5 x TBE) für 30 min bei 100 V aufgetrennt. RNA-Sekundärstrukturen wurden durch Erhitzen der RNA bei 70°C für 10 min in 10 µl RNA-Ladepuffer gelöst. Das Agarosegel sollte nach Auftrennung zwei distinkte Banden der ribosomalen RNA (28S:16S) mit einer Ratio von 2:1 zeigen, was für intakte RNA hoher Qualität spricht. Die graphische Darstellung erfolgte durch die Software D-Chip.

Ladepuffer:

50% Glycerol
50% H₂O
1 Spatelspitze Bromphenol-Blau

RNA-Ladepuffer:

240 µl Formamid
60 µl Ladepuffer
Lagerung bei -20°C

4.8 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient zur Generierung von cDNA aus RNA. Hierzu wurden Oligo-dT Primer in 5'-3' Richtung durch virale Polymerase (ThermoScript RT, Invitrogen) komplementär zu der RNA verlängert. Zunächst wurde folgender Reaktionsansatz auf ein Gesamtvolumen von 11 µl pipettiert:

DEPC-H₂O;
1 µg RNA,
5 µM Oligo-dT Primer

Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 72°C inkubiert. Während einer 5-minütigen Pause bei 4°C wurden folgende Komponenten zupipettiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Ansatz ergab:

1 x cDNA Synthese Puffer (5x Puffer)
1 mM dNTPMix (10 mM)
5 µM DTT (0,1M)
2 U RNaseOUT (40 U/µl)
0,75 U ThermoScript RT (15 U/µl)

Während einer 50-minütigen Inkubation bei 52°C wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Eine anschließende 15-minütige Inkubation bei 75°C stoppte die Reaktion. Danach wurde durch Zugabe von 0,1 U/µl *E. coli* RNaseH die eingesetzte RNA bei 37°C für 30 min verdaut.

4.9 Transkriptionsanalysen

Um die zeitliche und gewebespezifische Transgen-Transkription zu analysieren, wurde Gewebe aus transgenen Tieren (siehe 1.1) isoliert und untersucht. Weiterhin wurden exemplarisch einige Mammakarzinome unterschiedlicher Differenzierungsstadien analysiert (siehe Tabelle 3). Hierfür wurde zunächst aus dem in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Gewebe RNA isoliert (siehe 4.7), wie in Kapitel 4.8 beschrieben in cDNA transkribiert und anschließend folgende, in Tabelle 2 aufgelistete, absolute und semi-quantitative PCR-Analysen nach den Standardbedingungen (siehe 4.3) durchgeführt. Es wurden je 0,5 µl des 20 µl cDNA-Ansatzes eingesetzt:

Tabelle 2: PCR-Bedingungen und Primer für Expressionsanalysen

Sequenz	Primer vorwärts	Primer rückwärts	Produktgröße [Bp] cDNA; <i>gDNA</i>	Zyklenzahl (X) abs.; quant.	Annealing-Temp.(Y) [°C]	Elongationszeit (Z) [s, min]
T-Ag	T11	T9	st: 1440; 1500 LT: 1160; 1500 17 kT: 420; 1500	35; 29	66	1 min 30 s
T-Ag	T4	T9	st: 870; 940 LT: 600; 940	35; 28	66	55 s
mutp53	FKR12	FKR4	590; 2200	35; 30	66	35 s
wtp53	FKR12	1270	690; 3010	35; 28	68	40 s
Aktin	actin-fw	actin-rev	390; 500	35; 26	67	25 s

Bp: Anzahl der Basenpaare; **gDNA**: genomische DNA; **abs**: absolute PCR; **quant.**: semi-quantitative PCR; **st**: kleines T-Ag; **LT**: großes T-Ag; **17 kT**: 17 kT-Ag.

4.10 Microarray-basierte komparative Genomhybridisierung (Array-CGH)

Die CGH (Comparative Genomic Hybridization) ist eine molekularzytogenetische Methode, mit der ohne apriori Wissen über die Chromosomen-Imbalance die chromosomalen Abberationen entlang des Genoms nachgewiesen werden können. Bei der Array-CGH ist ein Raster definierter, genomisch kartierter DNA-Fragmente auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Die Auflösung der Array-CGH ist abhängig von der Anzahl und der Dichte der Oligonukleotide, die sich auf dem verwendeten Array befinden. Diese Technik erlaubt eine simultane Erfassung unterschiedlicher genetischer Veränderungen (Imbalancen der Kopienzahl der Chromosomen und Amplifikationen/Deletionen) und ist daher als Screening-Methode geeignet.

Der Ablauf eines CGH Experimentes wird im folgenden kurz beschrieben: mindestens 3 µg hochmolekulare DNA wurden aus den zu analysierenden Tumoren, sowie aus einer Leber als Referenz (siehe Tabelle 3) wie in 4.1.2 beschrieben isoliert und enzymatisch mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (z. B. Tumor = grün, Referenzgewebe = rot). Beide DNAs werden zu gleichen Massenteilen gemischt und in der Gegenwart von humaner cot1-DNA und „unspezifischer“ Fischsperma-DNA präzipitiert, gereinigt, denaturiert, prä-annealt und auf dem Objektträger mit den Oligonukleotiden hybridisiert. Ungebundene und unspezifisch gebundene DNA-Fragmente werden anschließend durch waschen entfernt. Während der Hybridisierung konkurrieren die markierten einzelsträngigen DNA-Fragmente des Tumors und der Referenz um freie Bindungsstellen auf den Oligonukleotiden und binden in einer Verdrängungsreaktion entsprechend ihrer Häufigkeit in den Ursprungproben, an die entsprechende Oligonukleotide. Zunächst wurden von der Firma Agilent einige ausgewählte Proben (siehe Tabelle 3) auf Maus 44k CGH Arrays prozessiert. Diese bestehen aus ca. 43.000 60-mer Oligonukleotiden, die das Mausgenom überspannen. Nach der ersten Auswertung wurden weitere CGH Analysen auf Maus 38k CGH Arrays in Kooperation mit Dr. Bauke Ylstra (Micro Array Facility, Abteilung für

Pathologie, VUmc, Amsterdam) prozessiert. Diese CGH Arrays bestehen aus 38.500 70mer Oligonukleotiden, die ausschließlich Exon-Sequenzen von ca. 25.000 Genen des Mausgenoms überspannen (MEEBO: Mouse Exonic Evidence Based Oligonucleotide). Nach der Hybridisierung wurden die Arrays mit der Software ImaGene (BioDiscovery, USA) aufgenommen und mit der Software BlueFuse für Microarrays v3.2 (BlueGnome, Cambridge, UK) extrahiert und normalisiert. Dabei werden die Intensitäten der Fluoreszenz Grün (Tumor) und Rot (Referenz) entlang der medialen Chromosomenachse abgelesen und zueinander in Bezug gesetzt. Im „Normalfall“ konkurrieren gleiche Kopienmengen des Tumors und der Normalprobe um den Hybridisierungslocus und binden statistisch betrachtet gleichhäufig.

Tabelle 3: Übersicht der in die Versuche eingesetzte Mammakarzinome

Grading	MaCa WAP-T1	F	R	T	MaCa T1-H22	F	R	T
G1	10864-6	+	+	+	11383-3	+	+	+
	11046-2	-	-	-	11389-1	+	+	+
	11084-6	+	+	+	10699-7	+	+	+
	11096-3	-	+	+	10681-7	-	-	-
G2	10911-7	+	+	+	11389-3	-	+	+
	11046-7*	-	-	-	11389-8	+	+	+
	11155-4*	-	+	+	11390-3	+	+	+
	11155-7*	+	+	+	11361-7	+	-	-
G3	10760-8	+	+	+	10696-5	+	+	+
	11020-8	-	-	-	10682-3	+	+	+
	11089-1*	+	+	+	10682-6	+	+	+
	11191-2	+	+	+	10680-7	-	-	-
	11263-4	-	-	-	11088-3	-	-	-
	10777-6*	-	-	-	11391-3	+	-	-
G4	11043-4	+	+	+	10696-4	+	+	+
	-				10726-5	+	+	+
	-				11275-8	+	-	-
Hybrid.-probe	Leber von 11155			Leber von 10699				

Kontrolle: Leber von BALB/c wt 10714

Die Histologienummern der Tiere mit der Zahl, die das Gewebe bezeichnet (Mammæ #1-8 und Leber 9). Alle aufgelisteten Mammakarzinome (**MaCa**) unterschiedlicher Differenzierungsgrade (**G1-G4**) aus T1 und T1-H22 Mäusen wurden in die CGH Analysen eingesetzt; *: MaCa, deren DNA neben den 38k Arrays auch auf die 44k Arrays der Firma Agilent hybridisiert wurden; **F, R, T**: Tumormaterial wurde auch in die FACS Analyse (**F**), Expressionsarrays (**R**), oder Transkriptionsanalysen (**T**) eingesetzt (+) bzw. nicht eingesetzt.

Es resultiert dann eine gelbliche Mischfärbung und ein g/r-Verhältnis von $2/2 = 1,0$. Überwiegt im Tumor eine DNA-Sequenz, so hybridisiert diese DNA häufiger auf der homologen DNA. Liegt im Tumor ein Gen im Verhältnis doppelt so oft vor wie in der Referenz, so beträgt das g/r-Verhältnis für dieses Gen $4/2 = 2$ ($\log_2 2 = +1$). Im Falle eines Verlustes beträgt das g/r-Verhältnis $1/2 = 0,5$ ($\log_2 0,5 = -1$). Alle Werte des Fluoreszenzverhältnisses der Tumor- zur Referenz-DNA wurden zur Basis 2 logarithmiert, so dass Amplifikationen oder Deletionen um einen identischen Faktor numerisch gleich erschienen, jedoch ein entgegengesetztes Vorzeichen aufwiesen. Fluoreszenzverhältnisse $> 0,95$ wurden in dieser Arbeit als DNA Amplifikationen und Verhältnisse $< -0,95$ als DNA-Verluste bewertet. Das *Smoothing* erfolgte mit der aCGH Software (www.vumc.nl/microarrays), wobei $\lambda = 2$ gesetzt wurde (Jong *et al.*, 2004), die graphische Darstellung mit der Software TIGR.

Ziel unserer Oligo-Array-CGH Analyse war es, Unterschiede in der Genamplifikation und – Deletion zwischen den MaCa mono-transgenen Ursprungs (WAP-T1) und MaCa bi-transgenen Ursprungs (T1-H22), sowie Unterschiede bei verschiedenen Differenzierungsstadien (siehe 1.6) zu detektieren.

VI Ergebnisse

Das *p53* Gen ist bei Brustkrebs in ungefähr 30% aller Tumore mutiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die *p53* Mutationen können in der Tumorigenese theoretisch in zwei Prozessen ihre Funktion entfalten. Zum einen könnte mutp53 direkt an der Entstehung, der Initiation, zum anderen an der Tumorpromotion bzw. -Progression beteiligt sein. Die Initiation gilt als Schlüsselereignis in der Tumorigenese und impliziert daraus folgendes klonales Wachstum von Zellen, deren beständige Veränderungen (z. B. durch DNA Mutationen) auf Tochterzellen vererbt werden können. Unter Progression hingegen versteht man die Tumorentwicklung von einem relativ gutartigen bis hin zu einem bösartigen Zustand. Diese zeichnen sich durch ungehemmtes Zellwachstum und die Fähigkeit zur Metastasenbildung aus. Inwieweit mutiertes *p53* in beiden Prozessen seine Funktion ausübt, soll im Folgenden untersucht werden.

1 EINFLUSS VON MUTIERTEM *p53* AUF DIE TUMORINITIATION

Der Einfluss von mutp53 auf die Entstehung von Tumoren wurde in transgenen Mutanten (BALB/c WAP-mutp53) im Vergleich zu wt Mäusen (BALB/c) untersucht. Hierbei wurden die beiden in humanen Mammakarzinomen am häufigsten detektierten Hot-Spot-Mutationen an den Aminosäure-Positionen 248 (murin 245), die zu einem Aminosäure-Austausch von Arginin (R) zu Tryptophan (W), und 273 (murin 270), die zu einem Austausch von Arginin (R) zu Histidin (H) führen, analysiert. Die Transgenkonstrukte stehen unter der Kontrolle des murinen WAP-Promotors, der nach Induktion durch laktotrophe Hormone ab dem 15. Tag der Schwangerschaft und während der Laktation zu einer Gewebe-spezifischen Expression von mutp53 in Epithelzellen der Brustdrüse führt (Pittius *et al.*, 1988). Die durch den ektopen WAP-Promotor regulierte Transgen-Expression führt in den mammären Drüsengeweben zu einem Mosaik-Expressionsprofil, das spezifisch für jede transgene Mauslinie hinsichtlich der Anzahl mutp53 exprimierenden Epithelzellen variiert. Dieses Expressionsmuster ähnelt der Situation, die man häufig in humanen Tumoren vorfindet – eine heterogene Verteilung der mutp53-exprimierenden Zellen innerhalb des Tumors. Innerhalb der unterschiedlichen transgenen Mauslinien exprimieren die einzelnen Linien das mutp53-Protein nach Induktion unterschiedlich stark (von null bis ca. 90%) (siehe IV1.2.1). Die mutp53 transgenen Mauslinien werden nach folgender Nomenklatur bezeichnet: BALB/c WAP-mutp53^{R245W}-W1 (W1), ..., WAP-mutp53^{R270H}-H8 (H8),... (Krepulat *et al.*, 2005).

1.1 Molekulargenetische Charakterisierung der transgenen WAP-mutp53 Mauslinien

Die Anzahl der *mutp53* Transgenkonstrukte, sowie die der unterschiedlichen Integrationsorte im Genom der verschiedenen transgenen Mauslinien wurden durch Southern-Blot Analysen bestimmt. Dabei wurde die Stabilität der Transgen-Integration über mehrere Generationen hinweg durch den Vergleich der F1- mit späteren Generationen (F4 – F8) untersucht.

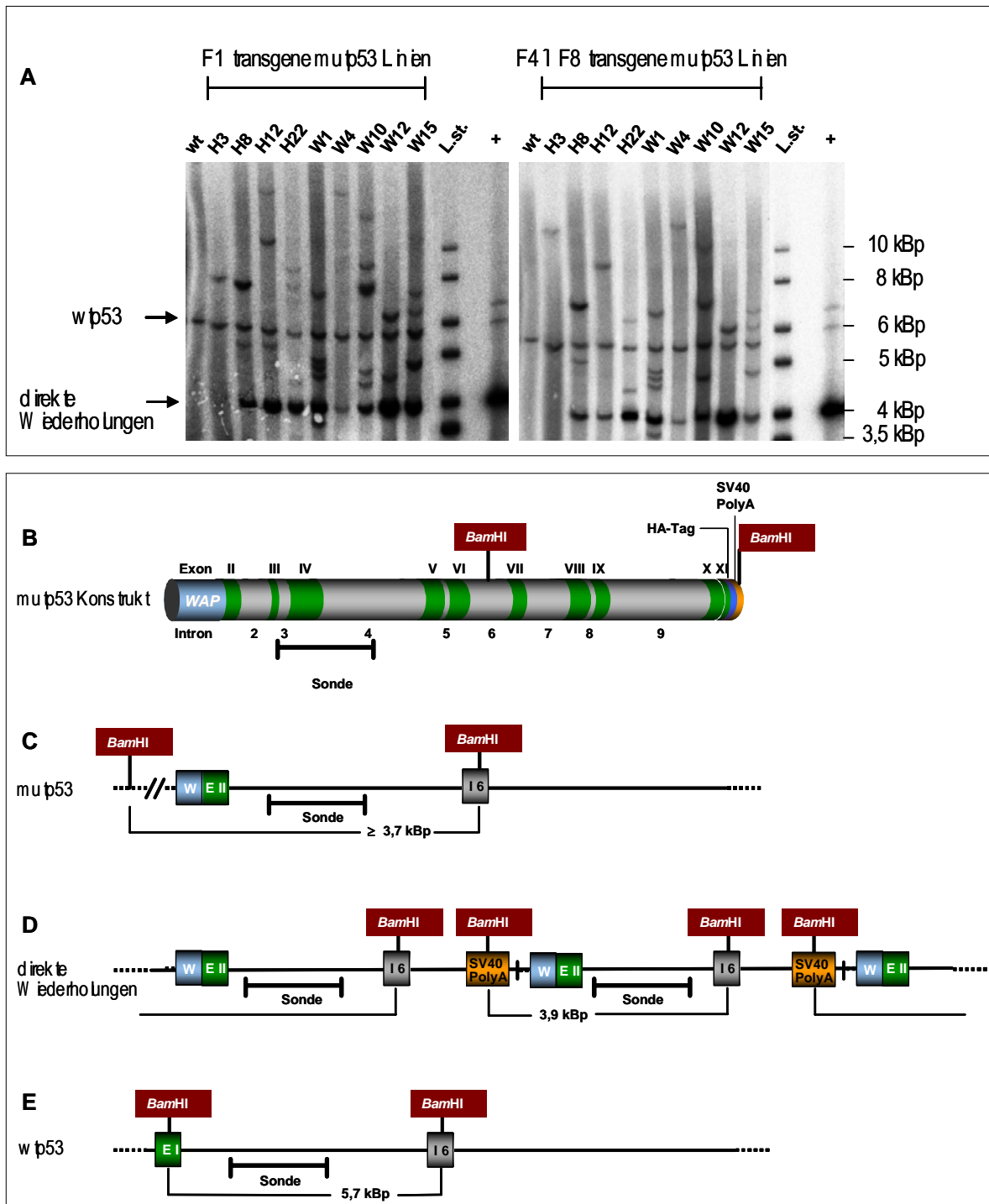


Abbildung 5: Southern-Blot Analyse zur Charakterisierung WAP-mutp53 transgener Mäuse

A: Autoradiogramme genomischer DNA, die mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI (DNA der Linien H3 und W12 zusätzlich mit *Eco*RI) geschnitten wurden. Die DNA wurde aus der Leber transgene Tiere der F1- und der F4 - F8 Generation isoliert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiven Sonde, die Intron 3, Exon IV und die Hälfte von Intron 4 überspannt. In den Autoradiogrammen ist ein 3,9 kBp (*mutp53*) und ein 5,7 kBp (endogenes *wtp53*) großes Fragment zu sehen. Die zusätzlichen Banden zeigen mehrere integrationsabhängige *mutp53* Fragmente. Die einzelnen Spuren zeigen Signale genomischer DNA von BALB/c wt und den Linien H3, H8, H12, H22, W1, W4, W10, W12, W15; 1 kb DNA-Längenstandard (L.st.); *WAP-mutp53^{R245W}*-Plasmid DNA als Positivkontrolle (+) mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten.

B bis D: schematische Darstellungen des *WAP-mutp53* Konstruktes mit der Lage der *Bam*HI Schnittstellen und der Hybridisierungssonde (**B**); das einzeln im Genom integrierte, bzw. im Genom 5' endständige *WAP-mutp53* Transgen (**C und D**); direkte Wiederholungen ergeben eine 3,9 kBp große Bande (**D**), während *wtp53* eine 5,7 kBp große Bande zeigt (**E**).

Die Hybridisierung wurde mit einer Sonde durchgeführt, die größtenteils aus Intron-Sequenzen besteht (siehe Abbildung 5B), wodurch eine Detektion des *p53* Pseudogens, das ausschließlich aus Exon-Strukturen besteht, verhindert wurde. Die etwa 5,7 kBp große Bande des endogenen *wtp53* konnte überall detektiert werden und wurde innerhalb jeder Spur als Referenz mit 2 Kopien für die densitometrische Bestimmung der Kopienzahlen verwendet (siehe Abbildung 5A und E). Im Gegensatz zu dem *wtp53* Gen fehlen bei dem *mutp53* Konstrukt Exon I, Intron 1 und 10, wodurch auch die *Bam*HI-Schnittstelle des Exon I entfällt. Dadurch lässt sich das Transgenkonstrukt von dem endogenen *wtp53* Konstrukt unterscheiden. Je nach Integration des Konstruktes in das Genom und der damit einhergehende spezifische Abstand zur nächsten sich im Genom in 5'-Richtung befindenden *Bam*HI Schnittstelle (mind. 3,7 kBp von der *Bam*HI-Schnittstelle in Intron 6 entfernt), kann die Anzahl der unterschiedlichen Integrationsorte bestimmt werden (siehe Abbildung 5C).

Tabelle 4: Integration und Expression des Transgens bei verschiedenen WAP-mutp53 Mauslinien

Transgene Linien	Genera- tion	Integrations- orte ^a	Kopienzah- l ^a	Verlust von Integrations- [%]	Verlust von Kopienzah- l [%]	Express ions- stärke ^b	Express ions- status ^b
W 1	F1	5	15			mittel	=
W 1	F5	5	15	0	0	mittel	=
W 10	F1	5	12			hoch	
W 10	F5	3	7	40	42	hoch	=
W 15	F1	3	14			mittel	
W 15	F6	3	10	0	29	mittel	=
H22	F1	3	19			null	
H22	F8	2	18	33	5	null	=
H8	F1	2	15			hoch	
H8	F4	2	11	0	27	hoch	=
W 4	F1	1	3			mittel	
W 4	F7	1	3	0	0	niedrig-mittel	↓
W 12	F1	2	31			hoch	
W 12	F6	1	28	50	10	null/niedrig	↓
H12	F1	3	22			mittel	
H12	F4	1	4	67	72	null	↓
H3	F1	1	1			hoch	
H3	F5	1	1	0	0	mittel	↓

^a bestimmt durch Southern-Blot Analyse; ^b bestimmt durch IHC, die Expressionstärke gibt den Prozentsatz der *mutp53* exprimierenden Mammaepithelzellen während der Laktation wieder ; = unveränderte, ↑ erhöhte, ↓ erniedrigte *mutp53* Expression nach mehreren Generationen.

Direkt hintereinander folgende Transgenkonstrukte ergeben, wie in Abbildung 5A und D dargestellt, eine spezifische Bande auf der Höhe von 3,9 kBp. Die Transgen-Expressionsstärke von WAP-*mutp53* wurde durch immunhistologische HA-Tag- und einer p53-Markierung detektiert. Hierzu wurden die Tiere, deren DNA auch für die Southern-Blot Analyse eingesetzt wurde, am Tag fünf post partum (pp) präpariert, und laktierendes Drüsengewebe nach Fixierung und Paraffin-Einbettung immunhistochemisch analysiert. Die Expressionsstärke wurde prozentual nach *mutp53* exprimierenden Mammaepithelzellen bestimmt. Die Zusammenfassung der durchgeführten Expressionsstudien, sowie die Southern-Blot Ergebnisse mit densitometrischer Auswertung ist in Tabelle 4 dargestellt. Daraus geht hervor, dass der *mutp53* Expressionsstatus weder mit der Anzahl der Integrationsorte, noch mit der Anzahl der Transgen-Kopien korreliert. Darüber hinaus zeigt der Vergleich der ersten mit den späteren Generationen, dass das Integrationsmuster teilweise noch nicht stabil war. Die transgenen Mauslinien W12 und H22 haben zum Beispiel einen, W10 und H12 sogar zwei Integrationsorte verloren, wohingegen bei W1, W15, H8, W4 und H3 die Anzahl der Integrationsorte unverändert blieb.

1.2 Langzeitstudien der WAP-*mutp53* transgenen Mauslinien

Die Analysen der Langzeitbeobachtung wurden mit je zwei Mauslinien jeder Mutation (H und W) durchgeführt. Pro Mutation wurde eine hoch- und mittel-, bzw. nicht-exprimierende WAP-*mutp53* Mauslinie ausgewählt, die in ihren Expressionsstärken über die Generationen hinweg gleich blieben: W1, W10, H8 und H22. Die Transkription des *mutp53* Transgens konnte in diesen Mauslinien in der Zeit der WAP-Promotor Induktion deutlich in den Drüseneithelien der Mammae, und nur geringfügig in Niere, Milz und Lunge detektiert werden. Immunhistologisch wurde *mutp53* ausschließlich in Epithelzellen der Mammae nachgewiesen. Zu einem sehr viel geringeren Prozentsatz konnten allerdings auch in nicht induzierten (nicht verpaarten) Tieren *mutp53* Transkripte und -Proteine in den Brustdrüsen detektiert werden. Aufgrund der Beobachtung, dass die *mutp53* Transkription schon ab einem Alter von ca. vier Wochen gefunden wurde (wenn diese Tiere Geschlechtsreife erlangen) liegt die Vermutung nahe, dass Östrus assoziierte Hormone die Regulation des WAP-Promotors teilweise beeinflussen können. Bei der Linie H22 konnte bislang zu keiner Zeit in keinem Organ weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene das Transgen detektiert werden.

In einer Langzeitstudie sollte untersucht werden, ob die auf die Epithelzellen der Mammae begrenzte Expression der *mutp53* Proteine zu pathologischen Veränderungen des Drüsengewebes führt. Weiterhin sollte diese Studie Aufschluss darüber geben, ob bei gleicher Mutation Gewebstörungen aufgrund unterschiedlich starker Expression des Transgens auftreten, und ob zwischen den beiden Mutationen (H und W) Unterschiede erkennbar sind. Um einen direkten Vergleich zu gewährleisten, wurden in dieser Studie nur Tiere analysiert, die in der achten Woche

verpaart wurden und deren erster Wurf, und damit die Induktion des Transgens, zwischen der 11. und 16. Woche erfolgte. Die Tiere wurden entweder im moribunden Stadium oder bei unauffälligem Befund im Alter von 19 (\pm 3) Monaten präpariert. Dabei wurden die Mammae bzw. Tumore sowohl während der Präparation durch ein makroskopisches klinisches *Staging* (siehe V1.5) als auch nach Fixierung und *Whole Mount* Färbung phänotypisch beurteilt. Weiterhin wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebe nach einer H&E- und gegebenenfalls HA-Tag Färbung von Herrn Dr. Löhler histopathologisch beurteilt und in einem Tumor *Grading*-System klassifiziert. Obwohl bei den transgenen Linien H8, W1 und W10 das Transgen auch schon ohne Induktion exprimiert werden kann, wurden die Tiere bei der Auswertung in zwei Gruppen eingeteilt. Die verstärkte mutp53 Expression während der Laktation wurde durch Einteilung der Tiere in verpaart und unverpaart berücksichtigt.

Bis zur Geschlechtsreife wachsen aus den terminalen Endstücken, den so genannten *end buds*, die undifferenzierte Stammzellen enthalten, die duktales Gewebe der Mamma aus, wo sie zu alveolären Strukturen ausdifferenzieren (siehe Abbildung 6A und B). Vereinzelt werden kollaterale, sowie terminale Verzweigungen des Drüsenepithels gebildet. Im Verlauf der Schwangerschaft induzieren Hormone das weitere Auswachsen der duktales Gewebe, die Bildung lobulo-alveolärer Strukturen, sowie eine funktionelle Differenzierung des sekretorischen Drüsenepithels. Innerhalb der ersten drei bis vier Tage der Laktation kommt es zu einer zusätzlichen Proliferation und funktionellen Differenzierung der Alveoli. Während der Laktation produzieren sekretorische Epithelzellen, die im Gegensatz zur humanen Situation auch im Ausführungsgangsystem verteilt sind, Milch, die ins Lumen abgegeben wird. Die Involution des Drüsenparenchyms hingegen geht mit einer massiven Apoptose der Epithelzellen einher, wodurch das maternale sekretorische Mammagewebe bis auf wenige lobulo-alveoläre Einheiten (LA Einheiten) vollständig rückgebildet wird. Innerhalb dieses umstrukturierten Drüsengewebes (siehe Abbildung 6C und D) bleiben undifferenzierte Stammzellen und vorgeprägte Progenitorzellen zurück, die bei erneuter Schwangerschaft ausdifferenzieren und neue sekretorische Einheiten ausbilden (Richert *et al.*, 2000). Während der Schwangerschaft und Laktation werden Differenzierungs- und Proliferationsprozesse, während der Involution Entzündungs- und Apoptoseprozesse induziert. Diese, mit einer Schwangerschaft einhergehenden, dynamischen Prozesse können einerseits eine protektive Wirkung haben, indem durch die forcierte Differenzierung schon geschädigte Zellen ausdifferenziert und während der Involution in die Apoptose geleitet werden (Russo *et al.*, 2005). Andererseits kann eine Schwangerschaft durch Störungen in den Apoptoseprozessen, sowie durch Entzündungsprozesse zu Schwangerschafts-assoziiertem Brustkrebs führen (Schedin, 2006).

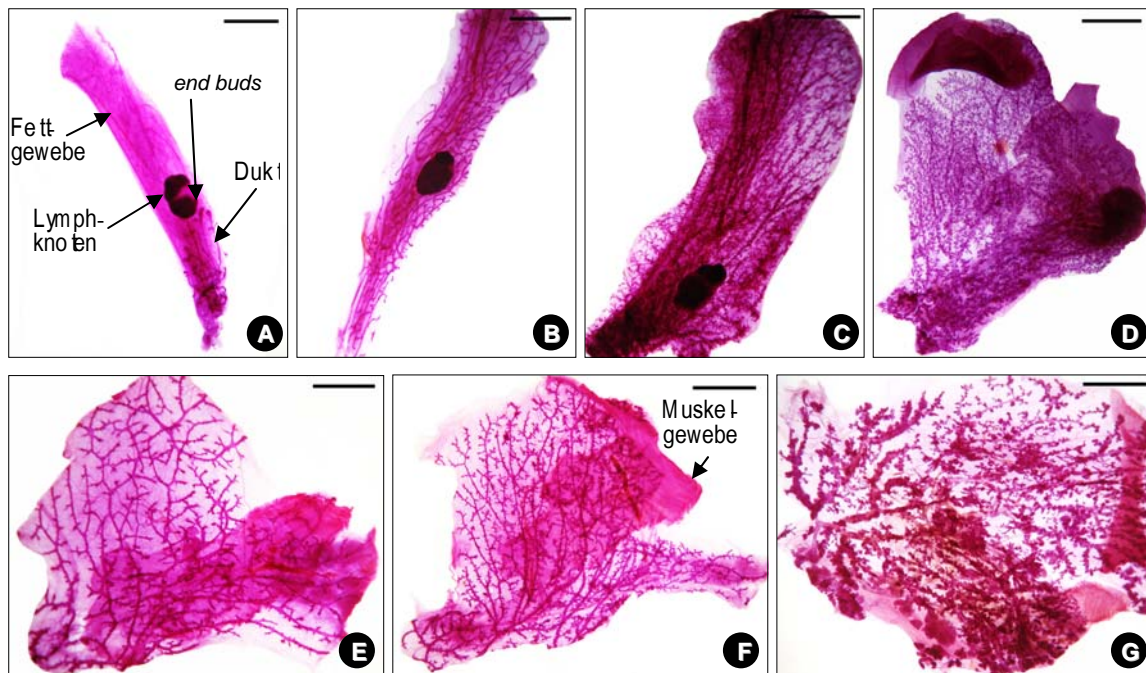


Abbildung 6: Makroskopische Morphologie unterschiedlich differenzierter muriner Brustdrüsen

Whole Mount Färbungen thorakaler und abdominaler Brustdrüsen unterschiedlichen Alters und Differenzierungsstatus des Drüsenepithels. **A:** typische Morphologie einer abdominalen Mamme einer vier Wochen alten BALB/c Maus. Das Drüsenepithel ist noch nicht vollständig ausgebildet und differenziert, die Drüse besteht aus wenigen unverzweigten Dukten mit den peripheren *end buds*. **B:** abdominale Brustdrüse einer 13 Wochen alten BALB/c Maus; während der Geschlechtsreife wächst das Drüsenepithel bis an die Peripherie des Fettgewebes aus und die *end buds* bilden terminale duktale Strukturen. Nach abgeschlossener Involution (Tag 50 post partum) und der damit einhergehenden Umstrukturierung der Drüse bleiben einige lobulo-acinäre Einheiten bestehen, das Mammagewebe weist im Gegensatz zu Drüsen aus Nullipara Mäusen ein stärker verzweigtes Drüsenepithel auf (**C:** abdominal; **D:** thorakal). **E-G:** *Whole Mount* Färbungen thorakaler Mammagewebe 18 Monate alter Mäuse; **E:** unauffälliges, wenig verzweigtes Drüsenepithel einer Nullipara Maus; **F:** unauffälliges, stärker verzweigtes Drüsenepithel einer Unipara Maus; **G:** pathologisch auffällige Brustdrüse mit einer globalen Altershyperplasie (Erweiterung der Ausführungsgänge, Bildung multipler Acini und zystischer Läsionen) einer Unipara Maus. Die Färbung der Präparate erfolgte mit dem Farbstoff Carmin; Maßstab: Balken entspricht 3 mm.

Die Langzeitstudie mono-transgener WAP-mutp53 Mauslinien wurde unter Berücksichtigung von verpaarten und nicht verpaarten Tieren hinsichtlich der Entstehung von Mammakarzinomen ausgewertet. In den transgenen Tieren mit der Hot-Spot-Mutation R245W konnten in keinem Tier der beiden analysierten Linien Mammakarzinome detektiert werden, weder in den fünf nicht verpaarten und 12 verpaarten Tieren der Linie W1, noch in den elf nicht verpaarten und sechs verpaarten Mäusen der Linie W10. Bei den Tieren mit der Hot-Spot-Mutation R270H hingegen wurden sowohl in der nicht exprimierenden Linie H22 ein, als auch in der hoch exprimierenden Linie H8 zwei Mammakarzinome gefunden. Untersucht wurden dabei acht nicht verpaarte und elf verpaarte Tiere der Linie H22, sowie 20 nicht verpaarte und 14 verpaarte Mäuse der Linie H8. Die Mammakarzinome entwickelten sich bei dem H22 Tier aus einer verpaarten Maus, bei H8 sowohl aus einem nicht verpaarten, als auch einem verpaarten Tier (siehe Tabelle 5). Alle detektierten Mammakarzinome zeigten nach einer immunhistologischen HA-Tag Markierung eine globale

Expression von mutp53. Vergleicht man die Anzahl der transgenen Tiere, die ein Mammakarzinom entwickelten mit der Anzahl der BALB/c wt Tiere, so lässt sich kein Unterschied feststellen, da in keinem der 12 analysierten nicht verpaarten BALB/c wt Tiere, dafür aber in 2 der 29 verpaarten Tieren ein spontanes, nicht induziertes Mammakarzinom detektiert wurde.

Tabelle 5: Übersicht der detektierten Mammakarzinome in WAP-mutp53 transgenen Tieren

transgene Linie	nicht verpaart Tiere mit MaCa (Anzahl untersuchtere Tiere)	verpaart Tiere mit MaCa (Anzahl untersuchtere Tiere)
wt	0 (12)	2 (29)
H8	1 (20)	1 (14)
H22	0 (8)	1 (11)
W1	0 (5)	0 (12)
W10	0 (11)	0 (6)

MaCa: Mammakarzinom; Tiere wurden ein- bis zwei mal verpaart

Die Inzidenz der Mammakarzinome bei den WAP-mutp53 transgenen Linien ist demnach nicht höher als die der BALB/c wt Tiere, die schon durch die genetische Prädisposition des BALB/c Mausstammes *per se* zur Entwicklung spontaner Mammakarzinome neigen. Die Schwangerschaft scheint bei den untersuchten Mäusen eher einen Tumor fördernden als einen protektiven Effekt zu haben, da insgesamt eine von 56 Nullipara und vier von 72 Mäusen mit ein bis zwei Würfen ein Mammakarzinom entwickelten. Diese Mammakarzinome entwickelten sich alle spontan, d. h. sie entstanden nicht in einem zeitlichen Verhältnis zu der *mutp53* Induktion. Insgesamt lässt sich aus dieser Studie die Aussage treffen, dass die Expression der Hot-Spot-Mutationen R270H und R245W neben endogenem wtp53 in adulten Epithelzellen in diesem Mausmodell kein offensichtlicher Initiationsfaktor der Mammakarzinomentwicklung darstellt. Dabei spielt auch die Expressionsstärke bzw. die Anzahl der exprimierenden Zellen keine Rolle. Dennoch scheint mutp53 an der Mammakarzinogenese beteiligt zu sein, da in allen entstandenen Mammakarzinomen durchgehend eine globale mutp53 Expression detektiert wurde. Im Folgenden wurde der Einfluss von mutp53 auf die Tumorprogression untersucht.

2 INTEGRATIONS-ANALYSE WAP-T TRANSGENER MAUSLINIEN

Grundlage für die Untersuchungen des Einflusses von mutp53 auf die Tumorprogression bildete das induzierbare WAP-T transgene Mausmodell (Schulze-Garg *et al.*, 2000), das in vielen morphologischen Aspekten mit den duktalem humanen Mammakarzinomen vergleichbar ist. BALB/c WAP-T transgene Mäuse sind bereits gut charakterisiert und entwickeln nach Induktion intraepitheliale Neoplasien, die zu invasiven Mammakarzinomen progredieren, jedoch selten metastasieren. Um den angenommenen isogenen Hintergrund der einzelnen WAP-T transgenen

Linien zu prüfen, wurde die Stabilität der Transgen-Integration über mehrere Generationen hinweg in drei unterschiedlichen WAP-T transgenen Mauslinien untersucht.

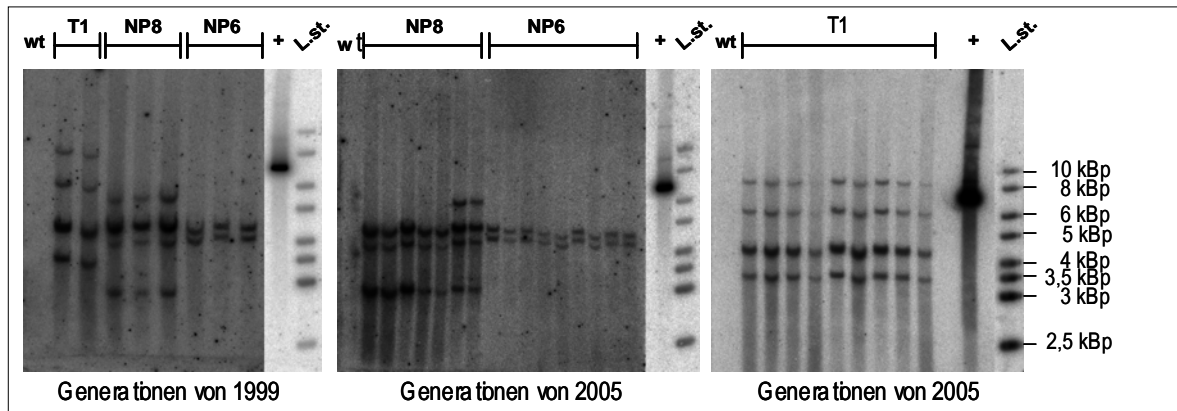


Abbildung 7: Southern-Blot zur Bestimmung der T-Ag Transgen-Integration

Genomische DNA wurde isoliert und mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *EcoRI* geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiven Sonde, die die gesamte frühe SV40 Genregion überspannt. Die Autoradiogramme zeigen ein ca. 4,3 kBp großes Fragment, welches die direkt hintereinander integrierten Transgene anzeigt. Die zusätzlichen Banden stellen mehrere integrations-abhängige T-Ag Fragmente dar. Die einzelnen Spuren zeigen genomische DNA von BALB/c wt Tieren und der Linien T1, NP8 und NP6 von 1999 und sechs Jahre später (2005). 1 kb DNA-Längenstandard (L.st.); die *WAP-T*-Plasmid DNA (7,1 kBp) als Positivkontrolle (+) wurde mit *KpnI* geschnitten.

Die Mäuse der WAP-T transgenen Linie T1 exprimieren während der Laktation in 90 bis 100% der Mammaepithelzellen homogen T-Ag. Die transgenen Linien *WAP-T-NP8* und *WAP-T-NP6* dagegen exprimieren das Transgen in 50- bzw. 5% der Epithelzellen. Um die Stabilität des Transgens im Genom zu überprüfen, wurden Southern-Blot Analysen mit genomischer DNA transgener Tiere der unterschiedlichen WAP-T transgenen Linien von Generationen über sechs Jahren hinweg (1999 und 2005) durchgeführt. Die Autoradiogramme, die in Abbildung 7 dargestellt sind zeigen, dass die T1 Mauslinie drei Integrationsorte und mehrere direkt hintereinander folgende Transgen-Integrationen (4,3 kBp) hat. Die Transgen-Integration blieb über den analysierten Zeitraum von sechs Jahren hinweg konstant, wohingegen bei der transgenen Linie *WAP-T-NP8* bei einigen, jedoch nicht allen Tieren ein Integrationsort verloren ging, so dass einige Tiere drei, andere wiederum nur zwei Integrationsorte neben den direkten Wiederholungen aufweisen. Die Expressionsstärke hingegen blieb ungeachtet des Integrations- und Kopienverlustes gleich. Daraus geht hervor, dass die in einigen Tieren verlorene Transgenkonstrukte dieser Integration nicht maßgeblich zum Phänotyp der *WAP-T-NP8* Linie beiträgt. Die Linie *WAP-T-NP6* zeigt bei allen analysierten Tieren einen Integrationsort und ebenso wie die anderen Linien direkte Wiederholungen des Transgens. In der BALB/c wt Linie ist kein Signal zu sehen, da das SV40 Virus in wt Tieren nicht vorkommt. Die am stärksten T-Ag exprimierende Linie *WAP-T1* zeigt die meisten Integrationsorte, wohingegen die am niedrigsten exprimierende Linie *WAP-T-NP6* nur einen Integrationsort aufweist. Obwohl bei diesen Autoradiogrammen ein Referenzsignal, wie z. B. das endogene *wtp53* innerhalb jeder Spur fehlt, ist ein deutlicher Unterschied in der Bandenintensität zwischen den Spuren der *WAP-T-NP6* und denen der *WAP-T1* zu sehen. Ob die

Expressionsstärke der Transgene in den unterschiedlichen WAP-T Linien ein Dosisseffekt ist, bleibt unklar, ebenso wie ein Integrationseffekt in Form von Expressions-Steigerung und/oder Inhibierung durch umliegende regulatorische Elemente bzw. Sequenzen an der jeweiligen Integrationsstelle des Transgens durch diese Analyse nicht ausgeschlossen werden können.

3 EINFLUSS VON *mutp53* AUF DIE TUMORPROGRESSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von *mutp53* auf die Tumorprogression in Mammakarzinomen untersucht. Hierzu wurde in vergleichenden Untersuchungen eine Gruppe aus 19 *WAP-T1* Tieren (T1) mit einer gleich großen Gruppe bi-transgener *WAP-T1* x *WAP-mutp53^{R270H}-H22* (T1-H22) Mäuse, die alle im Alter von 11 bis 14 Wochen einen Wurf hatten und somit einmal induziert waren, die Entwicklung von Mammakarzinomen untersucht.

Mutationen im *p53*-Gen gehören zu den frühen Ereignissen bei der humanen Mamma-Tumorigenese (Borresen-Dale, 2003). Dennoch gehen zahlreiche andere genetische Veränderungen voraus (Bartkova *et al.*, 2005). Diese Situation wird in den T1-H22 bi-transgenen Mäusen simuliert. Die Expression des *mutp53* Proteins der transgenen Linie *WAP-mutp53^{R270H}-H22* (H22) wird nicht nur durch den WAP-Promotor, sondern auch durch epigenetische Mechanismen kontrolliert, wodurch das Transgen während der Induktion nicht, bzw. nicht detektierbar exprimiert wird. In bi-transgenen Tieren aus Kreuzungen der nicht exprimierenden *mutp53* Linie H22 mit der hoch T-Ag exprimierenden Mauslinie T1 führt die T-Antigen induzierte Chromatin Umstrukturierung zu einer Re-Expression des epigenetisch „silenced“ *mutp53* Transgens (Krepulat *et al.*, 2005), wodurch eine *mutp53* Expression in zwei bis fünf Prozent der induzierten Epithelzellen detektiert werden. SV40 T-Ag komplexiert und eliminiert dabei funktionell das endogene *wtp53* Protein. Um zwischen einem dominant negativen Effekt, der lediglich auf der Inaktivierung von *wtp53* beruht, und einer echten „gain of function“ Aktivität von *mutp53* unterscheiden zu können, sollten vergleichende Analysen zwischen verschiedenen Tiermodellen durchgeführt werden.

Transkriptionsanalysen in Form semi-quantitativer RT-PCRs der mono-transgenen H22 und T1, sowie der bi-transgenen Linie T1-H22 am Tag fünf pp, d. h. während der Expression der Transgenkonstrukte dargestellt. Während *wtp53* in allen Geweben transkribiert wird, ist eine *mutp53* Transkription in keinem der Gewebe der untersuchten mono-transgenen H22 Maus zu detektieren, jedoch in den Brustdrüsen der bi-transgenen Tiere. Das Genom der T1 Tiere enthält kein *WAP-mutp53* Transgenkonstrukt und ist demzufolge ebenso negativ für die Transkription von *mutp53*, wie auch das Genom der mono-transgenen H22 Tiere kein WAP-T Konstrukt enthält und dementsprechend keine T-Ag Transkription detektierbar ist. LT, st und 17 kT sind alle in den untersuchten Drüsengeweben der mono-transgenen T1 und bi-transgenen T1-H22 Maus

transkribiert, nicht jedoch in anderen Geweben wie Leber, Milz, Niere oder Uterus, wodurch die WAP-Promotor vermittelte Gewebespezifität in diesem Mausmodell gezeigt wird. Im Abgleich der Bandenintensitäten mit Aktin lässt sich kein offensichtlicher Unterschied in den T-Ag Transkriptmengen der mono- und bi-transgenen Tiere feststellen.

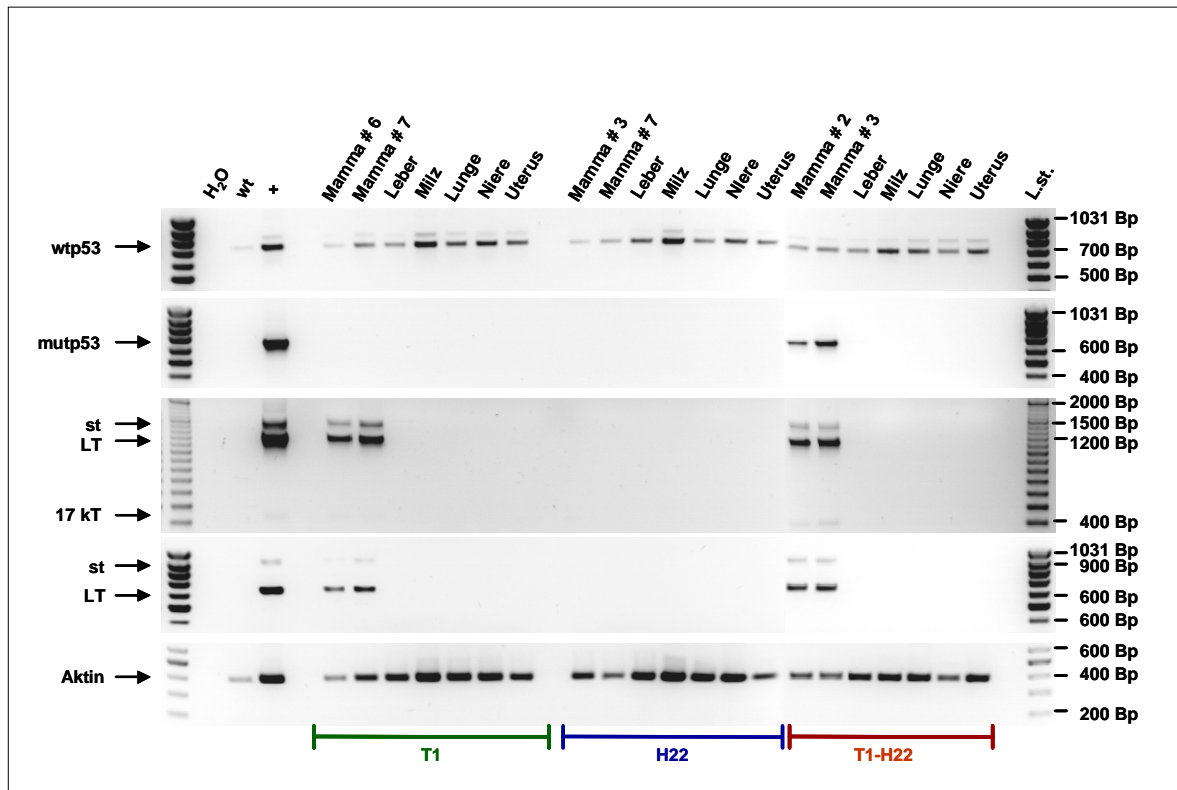


Abbildung 8: Semi-quantitative RT-PCR während der Transgen-Induktion

Darstellung der semi-quantitativen Bestimmung der Transkriptmenge von *mutp53* und der frühen SV40 Genregion (*LT*, *st*, und *17 kT*), sowie der Kontrolle *wtp53* und der Referenz Aktin. Die Analyse wurde mit Gewebe induzierter Tiere (Tag fünf post partum) durchgeführt. Während Aktin (390 Bp) und *wtp53* (690 Bp) in allen Geweben transkribiert wird, werden das große *T-Ag* (*LT*, 1160 Bp bzw. 600 Bp), das kleine *t-Ag* (*st*, 1440 Bp, bzw. 870 Bp) und *17 kT* (17 kT-Ag, 420 Bp) spezifisch in den Mammæ der T1 und T1-H22 Tiere transkribiert. *mutp53* (590 Bp) wird erst in Verbindung mit der T-Ag Expression in den bi-transgenen Tieren T1-H22 spezifisch im der Brustdrüse exprimiert, nicht jedoch in den mono-transgenen H22 Tieren. Als Kontrollen wurden Wasser (H₂O), BALB/c *wtp53* cDNA und cDNA aus einem induzierten bi-transgenen Mammagewebe verwendet, als Längenstandard (L.st.) wurde ein 100 bp und 100 bp + 500 bp Standard verwendet.

3.1 Phänotypischer Vergleich der T1 und T1-H22 Mäuse

Die Überlebensrate einmal verpaarter mono-transgener T1 Mäuse wurde mit der bi-transgener T1-H22 verglichen, um den Einfluss der Expression von mutp53 auf den Verlauf der Tumorkrankheit in diesem transgenen Mausmodell zu untersuchen. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, zeigen die Überlebenskurven beider Kohorten mit je 19 Tieren keinen Unterschied. Alle 38 untersuchten Tiere wurden in einem moribunden Zustand nach sieben bis maximal zehn Monaten aufgrund der nicht mehr tolerablen Tumorgroße und/oder eines schlechten Allgemeinzustandes getötet und präpariert (siehe V1.1). BALB/c wt Tieren, die in dieser Studie als Kontrollgruppe beobachtet wurden, erreichten zu 95% ein Alter von mehr als 18 Monaten.

mutp53 hat demzufolge keinen Einfluss auf die Überlebensrate in diesem transgenen Mausmodell.

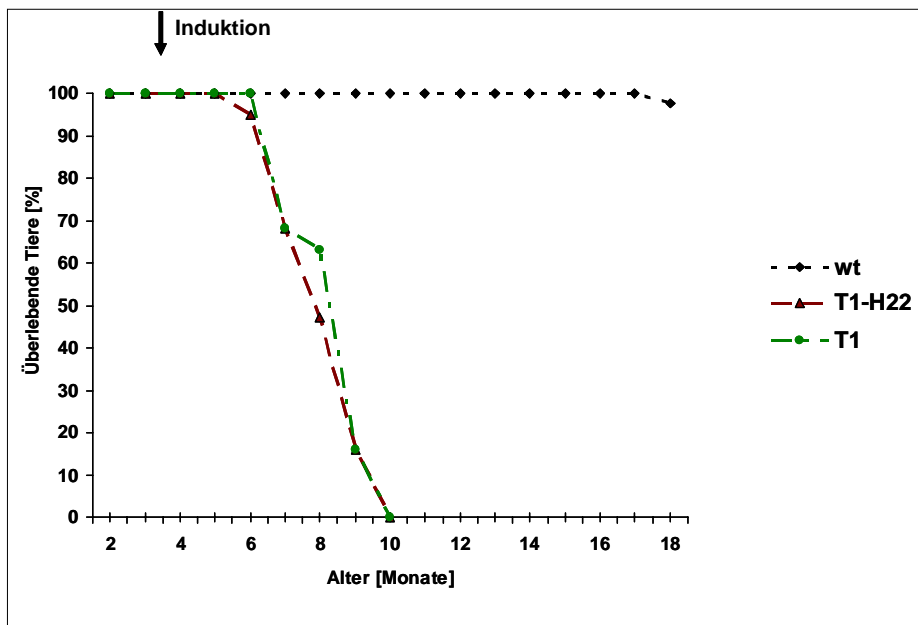


Abbildung 9: Überlebenskurve induzierter T1 und T1-H22 Mäuse

Das Schaubild zeigt die Überlebenskurven von je 19 T1 und T1-H22 Mäusen. Als Referenz ist die Überlebenskurve von 23 BALB/c wt Tieren aufgetragen, die zu 95% älter als 18 Monate wurden. Alle T1 und T1-H22 Tiere waren in einem Alter von maximal zehn Monaten moribund.

3.2 Phänotypischer Vergleich der Mammakarzinome mono- und bi-transgener Mäuse

In den folgenden Analysen wurden vergleichende Analysen der Brustdrüsen bzw. der Mammakarzinome mono- (T1) und bi-transgener (T1-H22) Mäuse morphologisch durchgeführt. Die erste makroskopische Beurteilung der Brustdrüsen erfolgte direkt nach dem Töten der Tiere während der Präparation mit Hilfe eines so genannten *Staging* Verfahrens. Dabei wurden alle acht Mammae pro Tier bewertet, woraus sich eine Gesamtzahl von 152 Brustdrüsen pro Kohorte ergab. Brustdrüsen mit multiplen Tumoren wurde ein *Staging*-Wert zugeordnet, der dem des größten

Tumors entsprach. Wie Abbildung 10 zeigt, gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen T1 und T1-H22 Mäusen bezüglich der Anzahl veränderter Brustdrüsen. Während ca. ein Viertel aller Brustdrüsen bei T1 Tieren makroskopisch unverändert aussieht (*Staging*-Wert 0), trifft dieser Befund nur für 11% der Brustdrüsen bi-transgener T1-H22 Tiere zu. Damit sind bei bi-transgenen Tieren 89% aller Brustdrüsen makroskopisch verändert. Darüber hinaus zeigen Brustdrüsen bi-transgener Mäuse prozentual durchgehend höhere *Staging*-Werte ab 1.

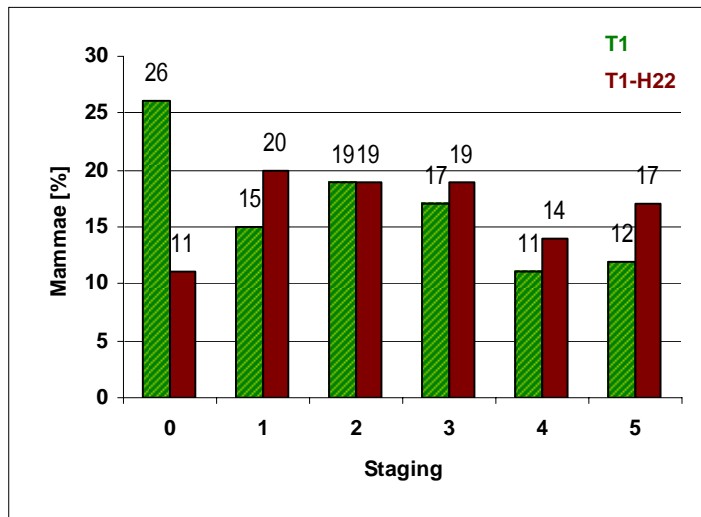


Abbildung 10: Phänotypische Beurteilung aller Brustdrüsen

Jeder Brustdrüse beider Kohorten (je 152) wurde ein *Staging*-Wert zugeordnet. Die prozentuale Verteilung der untersuchten Mammae auf die einzelnen *Staging*-Werte wurde in Form grüner (T1) und roter (T1-H22) Balken dargestellt; Staging 0 = ohne Befund, 1 = diffuse Verdickung der Brustdrüse, 2 = solide kleine Knötchen (bis 0,2 cm), 3 = Tumor 0,3-0,8 cm, 4 = Tumor < 1,6 cm, 5 = Tumor > 1,6 cm.

Brustdrüsen bi-transgener Tiere sind im Vergleich zu denen mono-transgener Tiere häufiger pathologisch verändert und weisen bei allen *Staging*-Werten, die eine Veränderung implizieren (1 bis 4) einen gleichen oder größeren Anteil auf. Die zusätzliche Expression von *mutp53* führt demzufolge in diesen nahezu 100% T-Ag exprimierenden Epithelzellen zur Bildung von mehr und größeren Mammakarzinomen.

Die Tumore wurden nach Bestimmung der Größe zur Hälfte in flüssigem Stickstoff asserviert, zur anderen Hälfte in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und ein Längsschnitt über das ganze Ausmaß des Präparats mikroskopisch analysiert. Zunächst wurden die Mammakarzinome histopathologisch nach einem *Grading*-System bewertet. Enthielt dabei ein Schnittpräparat multiple Tumore, so ging der Differenzierungsgrad des größten Tumors in diese Studie ein, in der mindestens drei Mammae aus jeder Maus der beiden Kohorten analysiert wurden. Die histopathologische Beurteilung der Brustdrüsen bezüglich des Differenzierungsgrades erfolgte in Anlehnung an die Richtlinien zur Klassifizierung muriner Mammakarzinome (Cardiff *et al.*, 2000). Den Differenzierungsgraden entsprechend wurden die Gewebe, bzw. Karzinome *Grading*-Werte von 0 bis 4 zugeordnet. Abbildung 11 zeigt repräsentative Beispiele dieses *Grading*-Systems. Als

Vergleich zu den neoplastisch veränderten Geweben ist in Abbildung 11A die H&E Färbung einer morphologisch unauffälligen Brustdrüse einer zehn Monate alten Balb/c wt Maus nach einmaliger Verpaarung dargestellt.

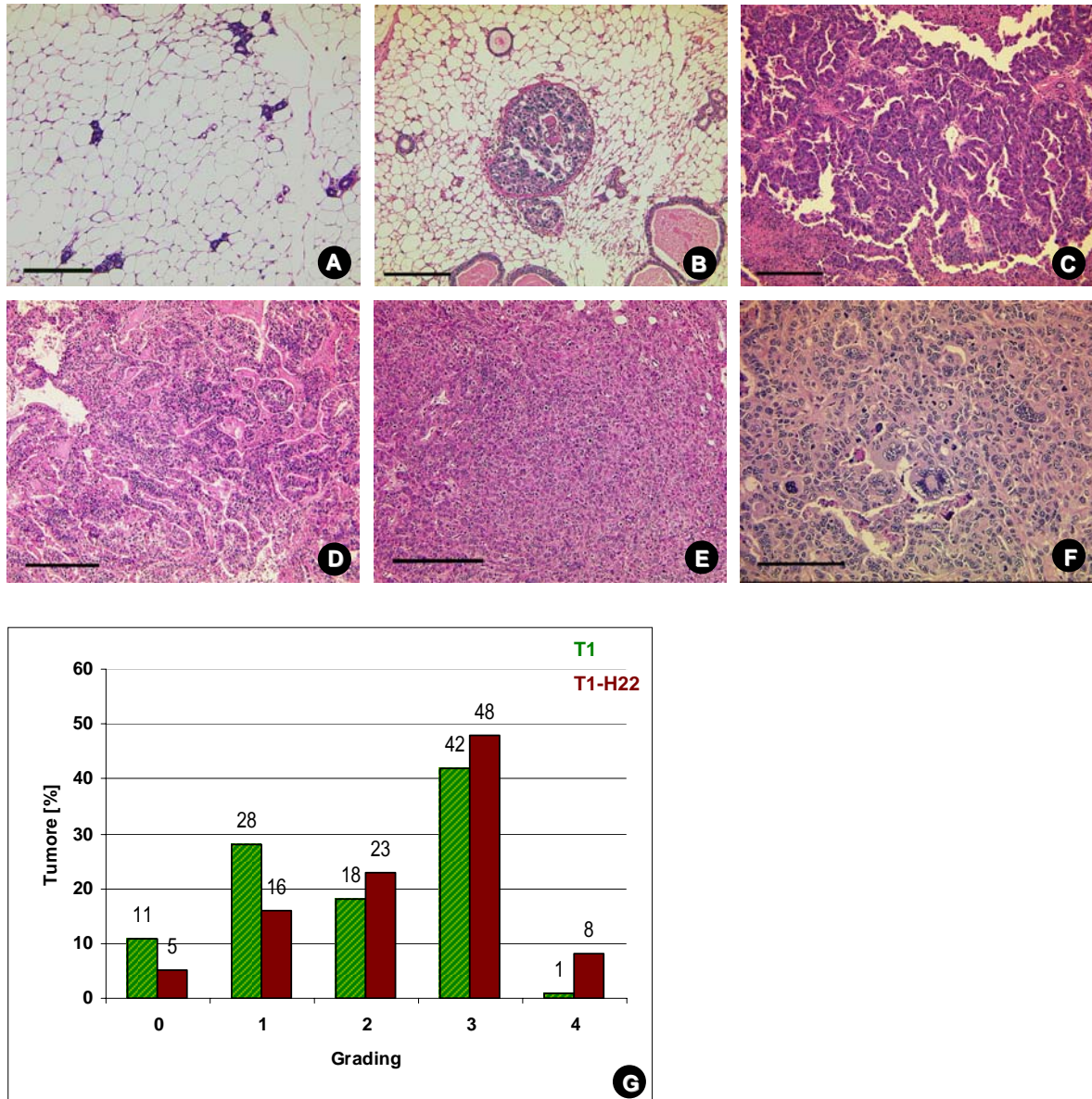


Abbildung 11: Histologische Beurteilung muriner Brustdrüsenpräparate

A-F: Paraffin Schnitte mit einer H&E Färbung zeigen unterschiedlich differenzierte murine T1-H22 Mammakarzinome, bzw. Mammae aus einmal verpaarten sieben bis zehn Monate alten Mäusen;

A: morphologisch unauffällige Mamma einer BALBc wt Maus, einzelne LA-Einheiten sind in Fettgewebe eingebettet, (Kontrolle); **B:** normale und dysplastische Drüsenstrukturen mit intraepithelialen Neoplasien, G0; **C:** papilläres Karzinom mit Tumornekrosen, G1; **D:** mäßig bis wenig differenziertes tubulopapilläres Mammakarzinom (G2); **E:** schlecht oder undifferenziertes, solides Mammakarzinom, G3; **F:** undifferenziertes, solides Mammakarzinom mit Atypien (Kernatypien, Tumor-Riesenzellen und Synzytien, G4; Maßstab: Balken entspricht 200 μ m (A-E), bzw. 100 μ m (F).

G: Prozentuale Darstellung der Häufigkeit definierter Differenzierungsstadien in Brustdrüsen mono- (T1) und bi-transgener (T1-H22) Mäuse. G0: intraepitheliale Neoplasien (i.e.N.: duktales Dysplasien, *in situ* Karzinome, minimal invasive Mammakarzinome); G1: gut differenzierte Mammakarzinome (glandulär, tubulär, papillär); G2: mäßig bis wenig differenzierte Mammakarzinome; G3: schlecht oder undifferenzierte Mammakarzinome; G4: undifferenzierte Karzinome mit anaplastischen Veränderungen

Das Bild zeigt eine altersentsprechende Verteilung der duktaalen und acinären Epithelstrukturen im Fettgewebe. Intraepitheliale Neoplasien, zu denen duktaale Dysplasien, *in situ* Karzinome, sowie minimal invasive Karzinome gehören werden in Grad 0 (G0) zusammengefasst (siehe Abbildung 11B). Die invasiven Adenokarzinome werden in G1 bis G4 untergliedert. Abbildung 11C zeigt ein gut differenziertes Mammakarzinom (G1), in dem papilläre Strukturen deutlich zu erkennen sind. Mammakarzinome, bei denen nur noch angedeutet die Drüsenstrukturen erkennbar sind, werden als moderat differenziert (G2) bezeichnet (siehe Abbildung 11D). Demgegenüber sind kaum noch differenzierte Strukturen in den undifferenzierten Karzinomen (G3 und G4) zu erkennen. Während die undifferenzierten Karzinome des G3 Differenzierungsgrades vorwiegend aus monomorphen Zellen solider Karzinome bestehen (siehe Abbildung 11E), sind in einem undifferenzierten G4 Karzinom deutliche vermehrt Zellatypien zu erkennen. Insgesamt wurden in diese Studie 65 Brustdrüsen aus T1 und 79 aus T1-H22 einbezogen. Abbildung 11G zeigt, dass mehr als die Hälfte aller analysierten, bi-transgenen Tumore einen undifferenzierten Status (Grad 3 und 4) zeigen, wohingegen die Mehrzahl mono-transgener Tumore einen differenzierteren Status aufweisen. Der prozentuale Anteil mono-transgener gegenüber bi-transgener Tumore überwiegt im direkten Vergleich bei G0 und G1, wohingegen ab G2 der prozentuale Anteil bi-transgener versus mono-transgener Mammakarzinome größer ist. Undifferenzierte Karzinome mit Anaplasien (G4) kamen in bi-transgenen Tieren deutlich öfter als in mono-transgenen Tieren vor. Die Expression von *mutp53* führt somit zu einer vermehrten Entstehung undifferenzierter maligner Mammakarzinome.

Aufgrund der Beobachtung, dass sich teilweise innerhalb eines Drüsengewebes mehrere Tumore entwickelten, wurde im Weiteren die Tumorzinzidenz in den beiden Tierkohorten untersucht. Da die T-Ag Expression für die Tumorentstehung notwendig, jedoch nicht ausreichend ist, konnte aus einem direkten Vergleich der Tumorherde mono- und bi-transgener Tiere der Einfluss von *mutp53* auf die Tumorzinzidenz bestimmt werden. Dazu wurde die Anzahl der Tumor Foci innerhalb der Brustdrüsen bestimmt, die auch für die zuvor beschriebene *Grading*-Studie verwendet wurden. Allerdings wurde für diese Analyse die Anzahl aller Tumore (unabhängig von der Größe) innerhalb eines Längsschnittes durch die gesamte, in Paraffin eingebettete Brustdrüse bestimmt. In den T1 Mäusen wurden 90 Tumore in 58 Längsschnitten, bzw. Brustdrüsen, in T1-H22 183 Tumore in 75 Brustdrüsen gezählt. Daraus ergibt sich eine höhere Fokalität und damit erhöhte Tumorzinzidenz in den bi-transgenen Tieren mit einer durchschnittlichen Tumoranzahl pro Mamma von 1,6 bei mono- und 2,3 bei bi-transgenen Tieren.

Im Zuge der Inzidenz-Studie wurde die Tumoranzahl innerhalb einer Brustdrüse gezählt. Die histopathologische Beurteilung ergab multiple Mammakarzinome innerhalb einer Brustdrüse, die sowohl alle das gleiche, als auch bis zu vier unterschiedliche Differenzierungsgrade aufwiesen konnten. Diese Heterogenität wurde bestimmt, in dem alle histopathologisch beurteilten Brustdrüsen in Gruppen eingeteilt wurden, deren Tumore entweder einen einheitlichen, zwei, drei

oder vier unterschiedliche Differenzierungsgrade zeigten. In Abbildung 12 ist die Auszählung dieser Analyse in einem Balkendiagramm für die mono- und bi-transgenen Tiere dargestellt. Die Mehrheit der mono-transgenen Mammae ist einheitlich differenziert, während in 28% zwei unterschiedliche Differenzierungsgrade und nur sehr selten (drei Prozent) drei unterschiedliche Differenzierungsgrade in einer Schnittebene zu sehen waren. Im Gegensatz dazu ist nur die Hälfte der analysierten Brustdrüsen bi-transgener Tiere einheitlich differenziert und hat prozentual deutlich mehr Drüsen mit zwei, drei und vier unterschiedlichen Differenzierungsgraden.

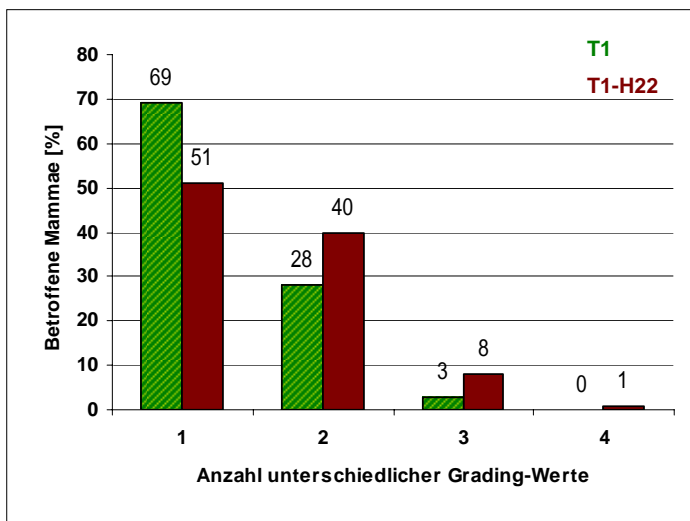


Abbildung 12: Heterogenität der *Grading*-Werte innerhalb der Brustdrüsen

Die Anzahl unterschiedlicher *Grading*-Werte innerhalb einer Mamma sind prozentual für die mono- und bi-transgenen Tiere als Balken dargestellt. Bis zu vier unterschiedliche Differenzierungsstadien innerhalb eines Drüsengewebes wurden beurteilt.

Wie aus diesen Vergleichen hervorgeht, erhöht die Expression von mutp53 in T-Ag exprimierenden Mammaepithelzellen sowohl die Inzidenz als auch die Anzahl unterschiedlicher Differenzierungsgrade der in den einzelnen Mammae gewachsenen Mammakarzinome.

Bei vielen Krebserkrankungen kann es zur Bildung von Metastasen kommen. Man unterscheidet lokale Metastasen, die sich in der unmittelbaren Nachbarschaft von den Tumoren ansiedeln, regionale Metastasen im Bereich des drainierenden Lymphknotens und Fernmetastasen, die in der Regel über die Blutbahn in entfernte Organe gelangen. Beim Krankheitsverlauf humaner Mammakarzinome spielen Metastasen eine wichtige Rolle, da meist nicht der Primärtumor, sondern die Metastasierung bei dieser Krebserkrankung die Todesursache ist. Bei humanen Mammakarzinomen erfolgt eine hämatogene Metastasierung vorwiegend in das Knochenmark, die Leber und die Lunge. In unserem Mausmodell konnten Metastasen dagegen ausschließlich in der Lunge detektiert werden. Inwiefern die Expression von mutp53 eine Rolle bei der Metastasierung spielt wurde anhand der Lungenpräparate aller 19 mono- und bi-transgenen Tiere untersucht. Dazu wurden die beiden großen Lungenflügel in Paraffin eingebettet und mindestens zwei Längsschnitte

durch das gesamte Lungengewebe mikroskopisch bewertet. In zwei von 19 T1 Mäusen konnten Mikrometastasen (d. h. kleiner als ca. 100 Zellen) detektiert werden. Im Gegensatz hierzu wurden bei den bi-transgenen T1-H22 Tieren in acht von 19 Lungenschnitten Metastasen detektiert, wovon sechs Mikrometastasen und zwei größere Metastasen waren. Metastasen konnten demnach viermal häufiger in bi-transgenen als in mono-transgenen Tieren beobachtet werden. Metastasen mit einem *Staging*-Wert größer als eins konnten nur in Lungen bi-transgener, nicht aber in denen mono-transgener Tiere detektiert werden. Aufgrund der geringen Größe bzw. Zellzahl der detektierten Metastasen war es sehr schwierig, alle hinsichtlich der T-Ag und mutp53 Expression immunhistologisch zu untersuchen. In einigen Metastasen konnte eine mutp53 und T-Ag Expression nachgewiesen werden. Als Beispiel hierfür ist in Abbildung 13 eine pulmonale Metastase eines T1-H22 Tieres abgebildet, die eine disseminierte mutp53 Expression und eine globale T-Ag Expression zeigt.

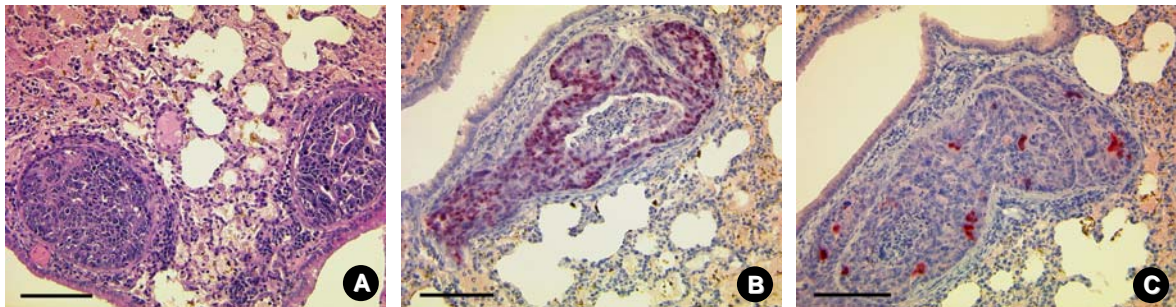


Abbildung 13: Histopathologie und Immunhistologie einer pulmonalen Metastase einer T1-H22 Maus

Pulmonale Metastasen **A**: H&E Färbung; **B**: Folgeschnitt; die LT Markierung zeigt eine globale T-Ag Expression; **C**: weiterer Folgeschnitt; die HA-Tag Markierung zeigt eine vereinzelte disseminierte mutp53 Expression; Maßstab: Balken entspricht 100 μ m.

Bei der Bewertung der Invasivität wurden bei den T1-H22 Tieren vereinzelt Tumore gefunden, die in die Muskulatur, sowie in Lymph-, Blutgefäße und regionale Lymphknoten infiltrieren. Die detektierte Infiltration der Mammakarzinome in umgebendes Gewebe und eine vierfach erhöhte Metastasierungsrate in die Lunge bi-transgener Tiere lassen darauf schließen, dass die Expression von mutp53 auch mit einer erhöhten Invasivität einhergeht.

Der phänotypische Vergleich von Mammakarzinomen mono-transgener T1 und bi-transgener T1-H22 Tiere im Endpunktstadium zeigt, dass die zusätzliche Expression von mutp53 in T-Ag exprimierenden Brustdrüsengewebe mit der Entstehung größerer Tumore, einer erhöhten Tumorinzidenz und Heterogenität der Differenzierung, einer vermehrten Anzahl undifferenzierter Karzinome, sowie einer erhöhten Metastasierungsrate einhergeht.

3.3 Molekularer Vergleich der Mammakarzinome mono- und bi-transgener Mäuse

Mögliche Ursachen der phänotypisch festgestellten Unterschiede sollten im Folgenden durch den molekulargenetischen Vergleich der mono- und bi-transgenen Tumore ermittelt werden. Dazu wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Mammakarzinome eingesetzt, deren andere Hälfte zuvor histopathologisch beurteilt und in den zuvor beschriebenen phänotypischen Analysen verwendet worden waren.

Ramel *et al.*, konnten zeigen, dass die SV40 vermittelte Zelltransformation mit einer T-Ag induzierten Aneuploidie in initiierten Tumorzellen einhergeht (Ramel *et al.*, 1995). Weiterhin konnte auch schon für die Expression von mutp53 in einigen humanen Mammakarzinomen eine erhöhte genetische Instabilität gezeigt werden, die mit dem Grad der Differenzierung zunimmt (Kleivi *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, inwieweit die Expression von mutp53 in den Mammæ die T-Ag induzierte chromosomale Instabilität noch erhöht, wurden Proben der Mammakarzinome in durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen (FACS Analysen) eingesetzt. Bei dieser Methode wird der DNA-Gehalt von Zellen über die Fluoreszenzintensität des DNA-Interkalators Propidiumiodid erfasst. So kann die Verteilung einer Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus wie auch Abweichungen vom normalen diploiden DNA-Gehalt und damit genomische Instabilität detektiert werden.

Stickstoffgefrorene Tumor Proben von T1, wie auch T1-H22 Mäusen mit unterschiedlichen *Grading*-Werten wurden durchflusszytometrisch analysiert. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, haben nahezu alle Zellen gesunder Mammagewebe sowie der größte Anteil der Milzzellen (Kontrolle) den normalen DNA-Gehalt diploide Zellen (2N). Einige wenige Zellen haben einen höheren DNA-Gehalt (bis zu 4N) und repräsentieren replizierende S-Phase bzw. G2/M Zellen. Die untersuchten Tumore hingegen weisen bis auf eine Ausnahme durchweg ein abnormes FACS Profil mit einem hohen Grad an Aneuploidie auf. Neben einer kleinen Zellpopulation, die einen diploiden (2N) DNA-Gehalt zeigt, besteht die große Mehrheit aller untersuchten Mammakarzinome aus Zellpopulationen mit individuell verschiedenem hyperdiploiden DNA-Gehalt. Ein hyperdiploider DNA-Gehalt kommt durch abnorme Amplifikation einzelner Chromosomen, bzw. Chromosomenstücke eines diploiden Chromosomensatzes zustande. Eine Ausnahme bildet der Tumor 11391-3, der ein nicht aneuploides FACS Profil mit einem hohen Anteil von S-Phase Zellen zeigt.

Trotz gleichem Differenzierungsgrad und isogenem Hintergrund unterscheiden sich die FACS Profile individueller Tumore beträchtlich, was gleichermaßen für mono- wie auch bi-transgene Tiere gilt. Diese Heterogenität gleichartiger Tumore bezüglich des DNA-Gehalts weist darauf hin, dass die durch die Expression von T-Ag bzw. T-Ag und mutp53 induzierte chromosomale Instabilität nicht durch ein spezifisch definiertes Programm bestimmt wird, sondern wahrscheinlich

das Ergebnis unregelmäßiger und stochastischen Gesetzen folgender Prozesse ist. Nichtsdestoweniger weisen die meisten FACS Profile einen klaren Haupt-Peak mit einem korrespondierenden kleineren Peak doppelt so hohen DNA-Gehalts auf, was zeigt, dass sich in diesen Tumoren eine klar definierte hyperdiploide und proliferierende Zellpopulation aufgrund eines Selektionsvorteils durchgesetzt hat. Diese Tumore erweisen sich damit als relativ homogenes Probenmaterial, was Voraussetzung für den Einsatz in Expressions- und andere molekulargenetischen Analysen ist.

Da die FACS Profile mono- und bi-transgener Tumore keine signifikant spezifischen Unterschiede aufweisen, zeigt sich, dass die zusätzliche Expression von mutp53 keinen global auffälligen Effekt auf die T-Ag induzierte chromosomale Instabilität vermittelt.

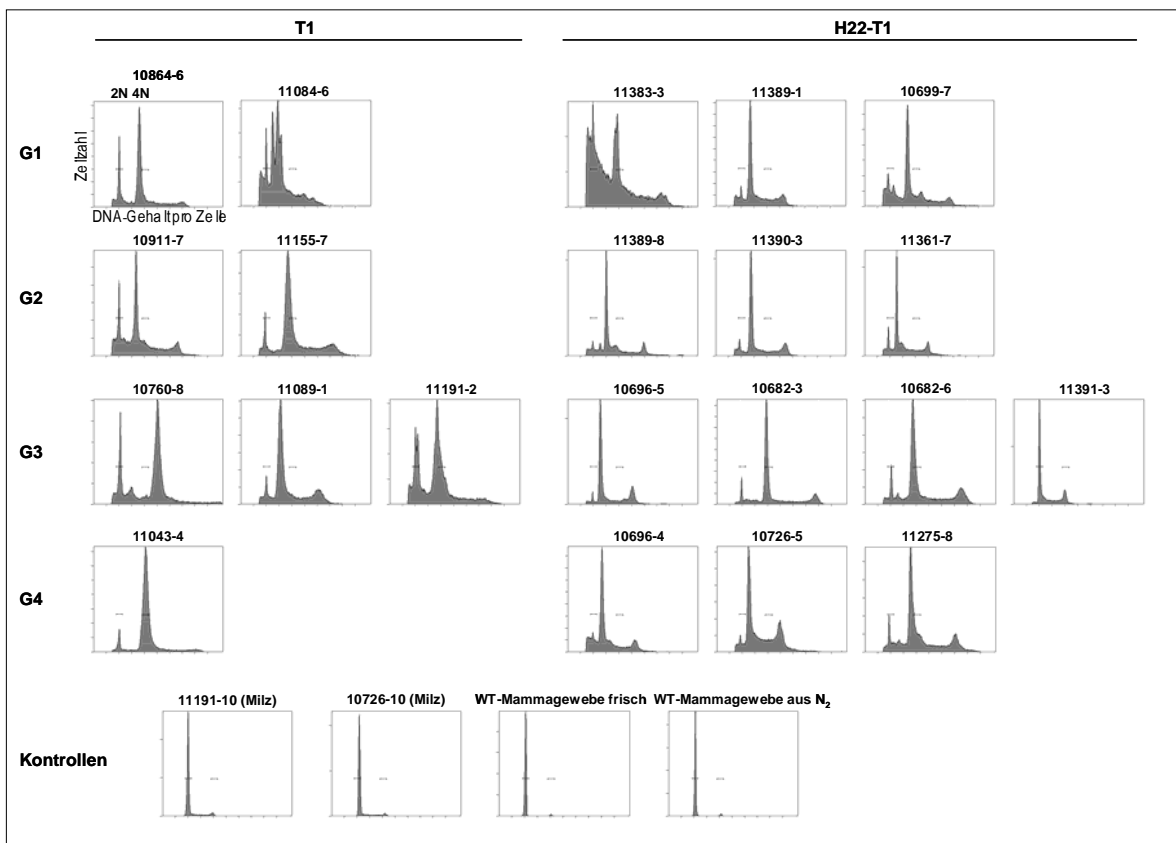


Abbildung 14: DNA-Gehalt von Tumorzellen unterschiedlich differenzierter Mammakarzinome

Zellzyklusprofile unterschiedlich differenzierter Tumore aus T1 und T1-H22 transgener Mäusen. Die Histologienummer der jeweiligen Maus mit der Nummer des Brustdrüsengewebes, aus dem sich der Tumor entwickelte, ist über dem entsprechenden Profil angegeben. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 50.000 Zellen erfasst. Die große Mehrheit der Tumorzellen zeigt bis auf eine Ausnahme (11391-3) einen DNA-Gehalt größer als 2N. Als Kontrollen dienten Zellen aus der Milz von Tumortieren, sowie pathologisch unauffälliges Mammagewebe aus BALB/c wt Mäusen (frisch und nach Einfrieren verarbeitet). Anhand der Kontrollen wurden die 2N und 4N Positionen (durch einen Balken dargestellt) festgelegt und bei gleichen Messeinstellungen in jedes Diagramm übertragen.

Die zusätzliche T-Ag Immunfluoreszenzmarkierung ermöglicht die analytische Trennung T-Ag positiver und negativer Zellen, sowie deren getrennte Darstellung im Zellzyklusprofil. In Abbildung 15 ist eine Auswahl so analysierter Zellen aus Tumoren dargestellt, die schon in Abbildung 14 als gesamtes Zellzyklusprofil abgebildet ist. Von den 50.000 gemessenen Zellen wurden nur die eindeutig T-Ag positiven und negativen Zellen im Zellzyklusprofil dargestellt. In allen analysierten Tumoren ist der T-Ag positive Zellanteil des Tumors um ein vielfaches größer als der negative Zellanteil. Die Profile zeigen, dass die Zellpopulation, die einen DNA-Gehalt von 2N aufweist in allen analysierten Tumoren, d. h. sowohl in differenzierten (G1 und G2) und undifferenzierten (G3 und G4) als auch in mono- und bi-transgenen Tumoren T-Ag negativ ist.

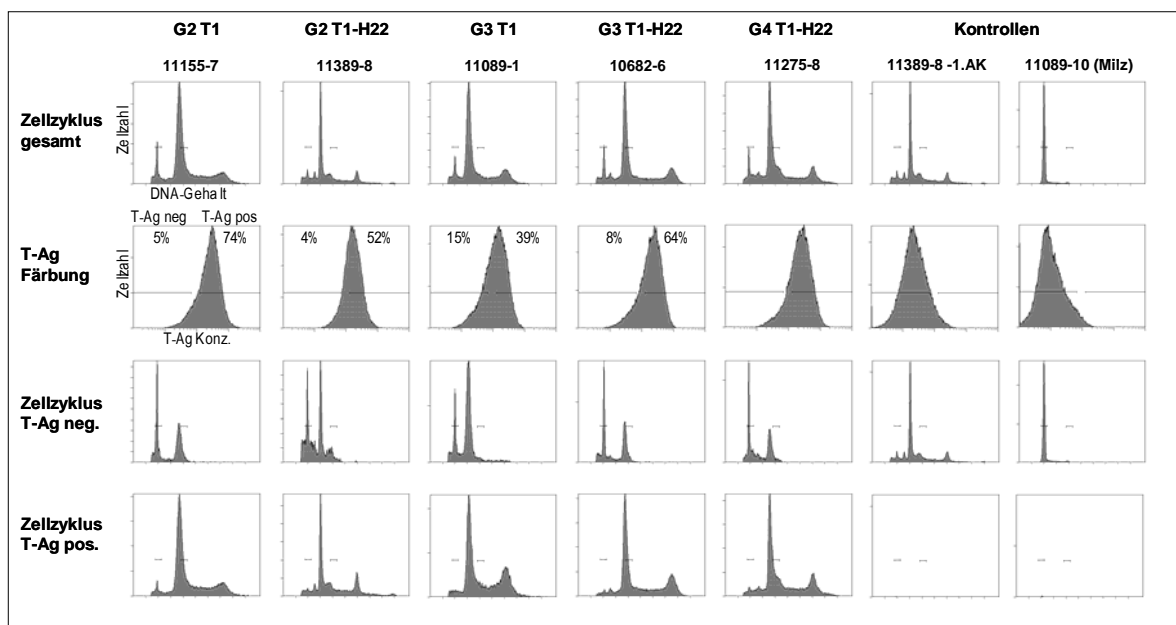


Abbildung 15: DNA-Gehalt T-Ag positiver und negativer Zellen unterschiedlich differenzierter Tumore mono- und bi-transgener Mäuse

Beispiele einiger T-Ag Immunfluoreszenzmarkierungen im Zellzyklusprofil. Einige Tumore aus T1 und T1-H22 Mäusen (siehe Abbildung 14) unterschiedlicher Differenzierungen wurden analysiert. In der durchflusszytometrischen Messung wurden T-Ag positive und negative Zellen je getrennt erfasst und sind einmal als Gesamtprofil des jeweils analysierten Tumors, als Verteilungskurve T-Ag positiver und negativer Zellen, sowie als Profil T-Ag positiver und negativer Zellen dargestellt. Als Negativ-Kontrolle und zur Einstellung der T-Ag negativen bzw. positiven Bereiche wurden Zellen aus Tumoren verwendet, die ohne ersten Antikörper gefärbt wurden (11389-8 -1.AK) und Zellen aus Milzgewebe der Tumortiere, die ebenso wie die Tumore T-Ag markiert wurden. Die große Mehrheit der Zellen aus den Tumoren sind T-Ag positiv (der prozentuale Anteil bezieht sich auf den Gesamtanteil der gemessenen 50.000 Zellen pro Gewebe) und zeigen eine Aneuploidie mit einem DNA-Gehalt der Zellen, der größer als 2N ist. Die wenigen T-Ag negativen Zellen zeigen meist zwei Populationen, von denen eine den 2N DNA-Gehalt einer diploiden Population aufweist.

Bei dieser Zellpopulation handelt es sich vermutlich um Stromazellen, in denen im Gegensatz zu den Epithelzellen die Transgene nicht exprimiert werden und die einen verhältnismäßig kleinen Anteil des murinen Mammakarzinoms ausmachen. Weiterhin ist in den Zellzyklusprofilen der T-Ag negativen Zellen eine meist kleinere Population zu erkennen, die einen hyperdiploiden, jedoch hypotetraploiden DNA-Gehalt hat. Diese Zellpopulation stellt in den Profilen der T-Ag positiven

Zellen jeweils die größte Zellpopulation dar. Es könnte sich hierbei um Tumorzellen handeln, die T-Ag unabhängig geworden sind und die Expression des Onkogens eingestellt haben, aber auch um eine nicht epitheliale Zellfraktion, die mit den T-Ag positiven Zellen dieser Fraktion aus gemeinsamen Vorläuferzellen entstanden sind. Die T-Ag positiven Zellen zeigen durchweg einen hyperdiploiden DNA-Gehalt, was darauf hinweist, dass T-Ag auch in diesem Tiermodell ursächlich für die chromosomale Instabilität verantwortlich ist. In der Milz der Tumortiere konnte keine T-Ag Markierung detektiert werden, wodurch die gewebespezifische Expression des T-Ag bestätigt wird.

Wie aus diesen FACS-Profilen hervorgeht, induziert T-Ag auch *in vivo* eine hohe chromosomale Instabilität, die zwischen den einzelnen Mammakarzinomen sehr heterogen, innerhalb eines Tumors aber homogen ist. Unterschiede in der globalen chromosomalen Instabilität zwischen den Tumoren mit unterschiedlichen *Grading*-Werten sind nicht zu erkennen, d. h. die Aneuploidie ist schon in den G1 Stadien (differenzierte Karzinome) sehr hoch und bleibt in ihrem Ausmaß über alle Differenzierungsstadien hinweg bis zu G4 (undifferenzierten Karzinome mit Anaplasien) in T1 und T1-H22 sehr hoch. Die Expression von mutp53 zusätzlich zu T-Ag führt in T-Ag induzierten Mammakarzinomen nicht zu einer weiteren global erhöhten chromosomalen Instabilität.

Die durchflusszytometrische Analyse ermöglicht eine globale Darstellung der unterschiedlichen Zellpopulationen anhand des DNA-Gehalts einzelner Zellen im Zellzyklusprofil. Die Analyse lässt jedoch keine Aussage über die Aberrationen der einzelnen Chromosomen zu. Um festzustellen, ob es auf Ebene der einzelnen Chromosomen bzw. Gene Unterschiede zwischen Mammakarzinomen aus mono- und bi-transgenen Tieren bzw. zwischen verschiedenen Differenzierungsstadien gibt, wurden CGH (Comparative Genomic Hybridization) Analysen durchgeführt. Diese Analysen wurden auf Basis von Oligo-Arrays durchgeführt und erlauben das Erfassen unterschiedlicher genetischer Veränderungen sowohl auf der Ebene der Chromosomen in Form von Abweichungen der normalen Kopienzahl, als auch auf der Ebene einzelner Gene bzw. Gen-Bereiche in Form von Amplifikationen und Deletionen entlang des gesamten Genoms. Die Auflösung dieser Arrays betrug dabei 100 kBp.

Die Untersuchungen wurden mit hochmolekularer DNA von in flüssigem Stickstoff asserviertem Gewebe aus 32 Tumoren durchgeführt, die teilweise auch in die FACS Analyse eingesetzt wurden. Die Hybridisierung der Tumor-DNA gegen die Leber-DNA eines Tumortieres aus T1 bzw. T1-H22 sowie die Erstellung der Rohdaten wurden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Ylstra (Micro Array Facility, Abteilung für Pathologie, VUmc, Amsterdam) durchgeführt (siehe V4.10). Einige Tumor Proben wurden zusätzlich von der Firma Agilent analysiert. Insgesamt wurden je vier G1 und G2, sechs G3 und aufgrund der Verfügbarkeit nur ein bzw. drei G4 Mammakarzinome aus den mono- und bi-transgenen Tieren mit CGH Arrays analysiert. Eine Übersicht der einzelnen Mammakarzinome, die in CGH- FACS- und Transkriptionsanalysen eingesetzt wurden, ist in Tabelle 3 des Methodenteils zusammengestellt.

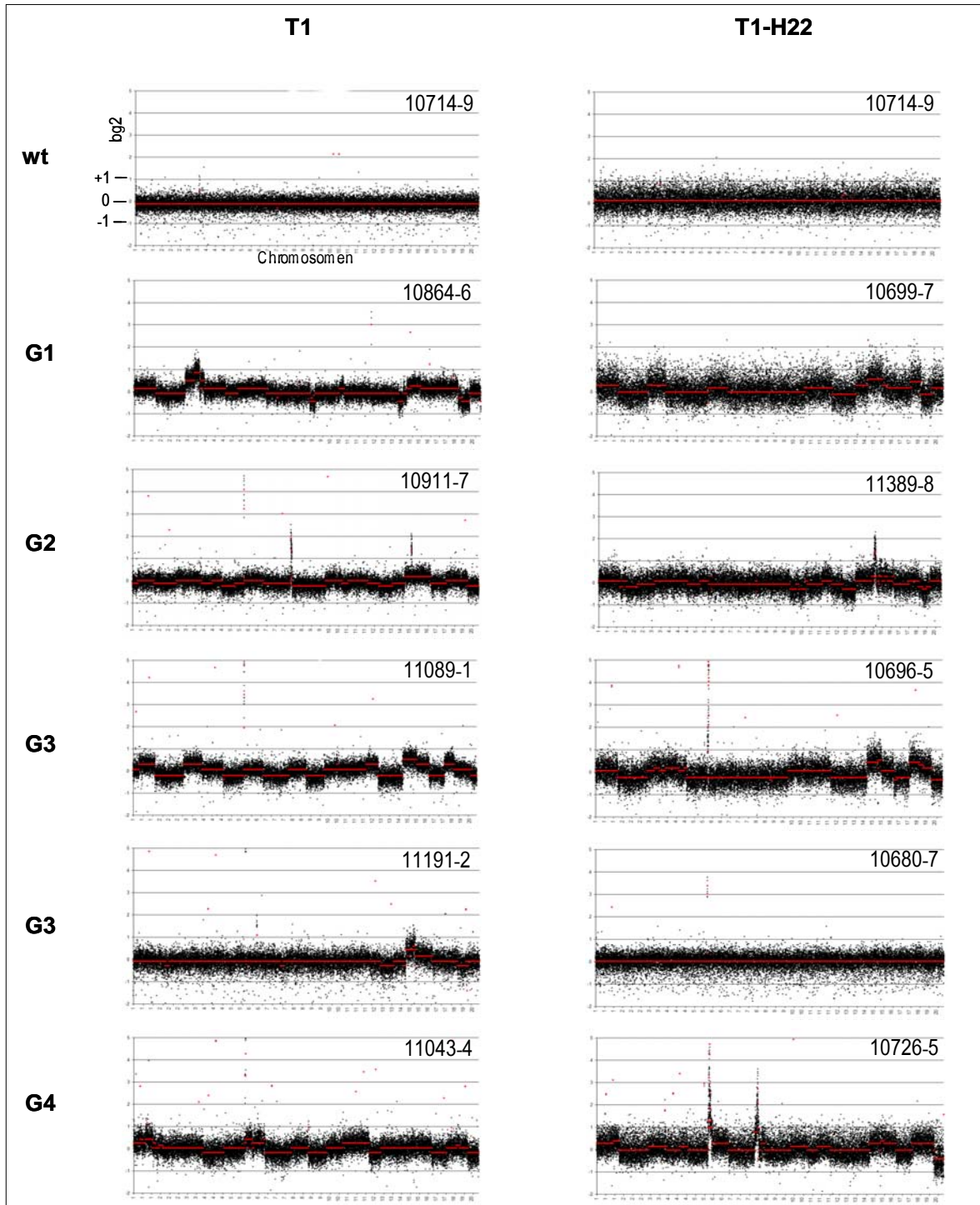


Abbildung 16: Genom überspannende Oligo-Array CGH Profile

Darstellung einiger repräsentativer CGH Profile unterschiedlich differenzierter Mammakarzinome sowie der Leber Kontrollen mono- (T1) und bi-transgener (T1-H22) Mäuse. Die unauffälligsten CGH Profile der beiden G3 Tumore (11191-2 und 10680-7) sind Ausnahmen. Die Werte sind nach der chromosomalen Position von links (Chromosom 1) nach rechts (Chromosom 20) angeordnet. Das DNA-Verhältnis von der Tumor- zur Referenz-DNA (schwarze Punkte) wird als \log_2 Wert angegeben. Die roten Linien stellen das Verhältnis nach dem *Smoothing* (rote Linien) dar.

In Abbildung 16 sind exemplarisch die CGH Profile über das gesamte Genom einiger Mammakarzinome dargestellt. Wie an den Profilen der Kontrollen zu sehen ist, entspricht der \log_2 Wert 0 dem Verhältnis 1:1 von Proben-DNA zu Referenz-DNA. Die Proben-DNA bestand in diesem Fall aus DNA von BALB/c wt Leber, die Referenz-DNA war, wie bei den anderen CGH Analysen auch, Leber eines T1- bzw. T1-H22 Tumortieres. Durch das sogenannte Smoothing wurden durch statistisch mathematische Berechnungen die einzelnen Signale zueinander in Verhältnis gesetzt und auf die Signalhöhe der benachbarten Regionen abgeglichen. Dadurch lassen sich Aberrationen einzelner Genbereiche oder auch ganzer Chromosomen in einer Übersicht gut darstellen (rote Linien). Die CGH Profile der Mammakarzinome sowohl mono- als auch bi-transgener Tiere zeigen starke sequenzielle Abweichungen im DNA-Gehalt. Dadurch, dass einzelne Bereiche, ganze Chromosomen oder Chromosomenstücke einen Zugewinn bzw. Verlust zeigen, wird die hohe Aneuploidie aus der FACS Analyse bestätigt. Diese prominente Aneuploidie setzt sich - wie schon die Daten der FACS Studie gezeigt haben - in allen Differenzierungsstadien hindurch fort. So lässt sich kein offensichtlicher Unterschied im Grad der Aneuploidie zwischen differenzierten und undifferenzierten sowie mono- und bi-transgenen Tumoren erkennen. Auch die FACS Profile der Tumore 10680-7 und 11191-2 korrelieren mit dem Ergebnis der CGH Analyse. Das CGH Profil des Tumors 10680-7 lässt bis auf einen Locus in Chromosom 6 keine chromosomalen Zugewinne, bzw. Verluste über das gesamte Genom erkennen. In Übereinstimmung damit zeigt die FACS Analyse ein Zellzyklusprofil, das dem normaler diploider Zellen gleicht, was sehr ungewöhnlich für einen SV40 induzierten Tumor ist. Betrachtet man hingegen das Profil des Tumors 11191-2, erkennt man ab Chromosom 13 größere Sequenzbereiche bis hin zu ganzen Chromosomen, die von der „Normal-Linie“ abweichen. Das FACS Profil zeigt, dass sich die beiden Haupt-Zellpopulationen im Bereich des DNA-Gehalts von 2N bis 4N befinden, jedoch auch Zellen mit hypertetraploidem DNA Gehalt zu erkennen sind. In der Genom überspannenden Darstellung der CGH Profile wurde die durchgehend hohe, individuelle Aneuploidie, die zuvor in den durch FACS Analysen untersuchten Mammakarzinome detektiert wurde, bestätigt.

Die Oligo-Array CGH Methode ermöglicht aufgrund der hohen Anzahl Genom überspannender Oligonukleotide die Detektion von Amplifikationen und Deletionen einzelner Genloci bis hin zu einzelnen Genen. Ziel dieser detaillierten Genom-Analyse jedes einzelnen Tumors war es, Unterschiede und/oder Gemeinsamkeiten bezüglich der Gen-Aberrationen innerhalb und zwischen den einzelnen Differenzierungsgraden sowie zwischen den einzelnen Mammakarzinomen aus mono- und bi-transgenen Tieren zu detektieren. Dazu wurde in den Datensätzen der CGH Analysen nach Amplifikationen und Deletionen, die in mehr als zwei Drittel der analysierten Tumoren eines einheitlichen Differenzierungsgrades einer Kohorte vorkamen, gesucht. Diese werden im Folgenden als gemeinsame Amplifikationen bezeichnet.

Liegt im Tumor ein Gen im Verhältnis doppelt so oft vor wie in der Referenz, so beträgt das Verhältnis theoretisch $4/2 = 2$ ($\log_2 2 = +1$). Als Amplifikation wurden daher \log_2 Werte ≥ 1 , als Verlust $\log_2 \leq -1$ gewertet. Im Falle der Deletionen konnte nie ein ganzer Bereich, sondern eine Vielzahl einzelner Gene detektiert werden. Aufgrund der Datenmenge werden diese Deletionen in nachfolgenden Projekten genauer ausgewertet und wurden deshalb im Zuge dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Die Auswertung der CGH Daten wird in dieser Arbeit auf die gemeinsamen Amplifikationen beschränkt. Eine Übersicht der gemeinsamen Amplifikationen ist in Abbildung 17 dargestellt. In den differenzierten G1 Mammakarzinomen sind weder in denen der mono- noch in denen der bi-transgenen Tieren gemeinsame Genloci oder einzelne Gene amplifiziert, was die Heterogenität dieser Tumore bestätigt. In den mäßig differenzierten G2 Karzinomen wurden vereinzelt gemeinsame Amplifikationen detektiert, die auf Expressionsebene bestätigt werden konnten, u. a. das einzeln amplifizierte Gen *clca2*, das für einen Chloridkanal kodiert, als Tumorsuppressor klassifiziert wurde (Gruber & Pauli, 1999) und in der Funktion als Tumorsuppressor bei Brustkrebs epigenetisch reguliert wird (Li *et al.*, 2004). Kollagen 4a1 ist als ganzer Locus, d. h. mit Genen in direkter Nachbarschaft in einigen differenzierten mono-transgenen Karzinomen amplifiziert und konnte auch durch eine erhöhte Expression bestätigt werden. Die Expressionsanalysen wurden mit Affymetrix Microarrays durchgeführt. Die ermittelten Daten sollten nicht Gegenstand dieser Arbeit sein, wurden aber für Korrelationsanalysen mit den CGH-Daten herangezogen.

Im Gegensatz zu den differenzierten zeigten die undifferenzierten Karzinome mehr gemeinsam amplifizierte Gene. Dabei finden sich viele Übereinstimmungen zwischen den als G3 und G4 klassifizierten Karzinomen und betreffen meist sowohl die Kohorte der T1 als auch die der T1-H22 Tiere. Neben einigen noch nicht näher bestimmten Genen weisen auch einige schon näher charakterisierte Gene, wie *pax2* und *sipa11* und *lamal*, gemeinsame Amplifikationen auf. Die größte Amplifikation, die einen ganzen Genlocus betrifft, befindet sich auf Chromosom 6. So ist in 15 von 16 untersuchten undifferenzierten Karzinomen der Genlocus um das *c-met* Gen stark amplifiziert. Das *c-met* Onkogen gehört zur Gruppe der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Veränderungen dieser Onkogene und Proteinprodukte wurden in Verbindung mit Invasivität für verschiedene solide Tumore, auch für das Mammakarzinom beschrieben (Boccaccio & Comoglio, 2006). Die Micro-Array Analysen zeigen bei allen Mammakarzinomen, bei denen das *c-met* Gen amplifiziert ist, unabhängig vom Differenzierungsgrad, eine 50 bis 100-fache erhöhte Expression des *c-met* Transkripts. In den übrigen differenzierten Mammakarzinomen, in denen keine DNA Amplifikation zu detektieren ist, zeigen die Daten der Micro-Arrays eine ca. 10-fach erhöhte Transkription im Vergleich zu BALB/c wt Mammae. Dies legt die Vermutung nahe, dass unabhängig vom Differenzierungsstatus in allen T-Ag induzierten Mammakarzinomen die Transkription des *c-met* Onkogens hochreguliert wird, die Amplifikation des *c-met* Gens auf DNA-

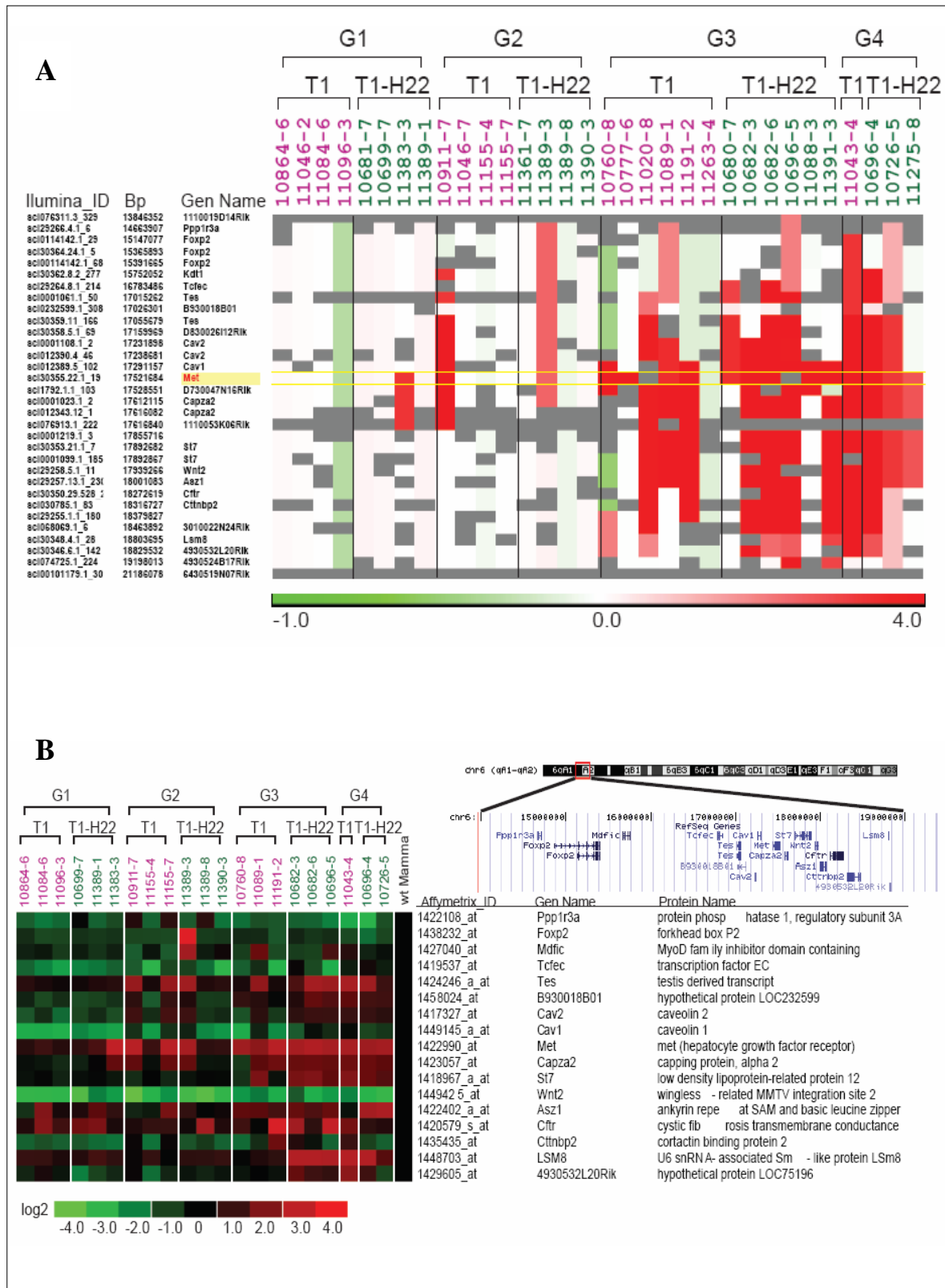


Abbildung 18: Darstellung der Variation in Amplifikation und Deletion sowie Expression von Genen des c-met Lokus in unterschiedlich differenzierten Mammakarzinomen der T1 und T1-H22 Mäuse

A: Die Amplifikationen und Deletionen (log₂ transformiert) der c-met Loci aus 32 analysierten Mammakarzinomen mono- und bi-transgener Tiere sind in einem Dendrogramm dargestellt. Jede Spalte repräsentiert eine Gewebeprobe und jede Zeile ein Gen. Neben dem Gen ist die Bezeichnung (Illumina_ID) sowie die Startposition (Bp) des entsprechenden Oligonukleotides angegeben. Grüne Quadrate entsprechen einem Verlust, rote einem Gewinn bzw. einer Amplifikation. Weiße Quadrate stellen einen unveränderten Status dar, graue ein fehlendes Signal. Das gelb markierte *c-met* Gen ist bis auf eine Ausnahme in allen

undifferenzierten und vereinzelt in differenzierten Karzinomen amplifiziert, während die Anzahl der amplifizierten Gene in direkter Umgebung für die einzelnen Gewebeproben variiert. **B:** Das Dendrogramm zeigt die Daten der unterschiedlich exprimierten Gene der *c-met* Loci (log-2 transformiert) aus einigen, auch durch CGH analysierten Tumoren in Verhältnis zu einer Brustdrüse einer zehn Monate alten wt Maus, die ebenso wie die Tumortiere einen Wurf hatte. Dabei repräsentiert jede Spalte eine Gewebeprobe und jede Zeile ein Gen. Neben dem Gen ist der Protein Name sowie die Bezeichnung (Affymetrix_ID) des entsprechenden Oligonukleotides angegeben. Grüne Quadrate entsprechen einer reduzierten, rote Quadrate einer erhöhten, schwarze Quadrate einer unveränderten und graue Quadrate einer fehlenden Expression des betreffenden Gens. In der Vergrößerung des schematisch dargestellten murinen Chromosom 6 ist der *c-met* Locus dargestellt. Das Dendrogramm zeigt die erhöhte Expression des *c-met* Gens, die in den undifferenzierten Genen signifikant zunimmt. Die Expressionsstärken der einzelnen Gene korrelieren nur teilweise mit den Veränderungen auf DNA-Ebene.

Ebene jedoch vorwiegend mit der Entstehung undifferenzierter Mammakarzinome einhergeht. Zusätzlich zu der Amplifikation des *c-met* Gens wurden einige Amplifikationen in der direkten Nachbarschaft von *c-met* detektiert, u. a. *capza7* und *st7*, deren biologische Funktion noch unverstanden ist, die ein ähnliches Expressionsprofil wie das *c-met* Gen zeigen. Eine Gen-Amplifikation konnte jedoch auch ohne damit einhergehende erhöhte Expression detektiert werden. So ist beispielsweise das *wnt2* Gen spezifisch in undifferenzierten Mamakarzinomen amplifiziert, während das *wnt2* Transkript im Vergleich zur Kontrolle und gleichermaßen für differenzierte und undifferenzierte Karzinome durchgehend reprimiert ist. Eine Übersicht der Amplifikationen bzw. Deletionen und die Expressionsstärke der einzelnen Gene des *c-met* Locus aller analysierten Mammakarzinome ist in Abbildung 18 dargestellt. Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, variiert die Größe des amplifizierten Locus bei den einzelnen Mammakarzinomen sehr stark. Das G3 Mammakarzinom eines mono-transgenen T1 Tieres (10777) zeigt beispielsweise nur eine starke Amplifikation des *c-met* Gens. Allerdings konnten die Signale zweier direkt benachbarter Oligonukleotide nicht ausgewertet werden. Bei den meisten undifferenzierten Tumoren, die eine *c-met* Amplifikation aufweisen, ist ein großer Locus von bis zu drei MBp amplifiziert. In zwei Arrays fehlte die Signalauswertung für das *c-met* präsentierende Oligonukleotid. Da jedoch die gesamte umgebende Region amplifiziert ist, wurde in diesen Fällen das *c-met* Gen als amplifiziert gewertet. Auch in einem T1 und zwei T1-H22 differenzierten Tumoren konnte eine *c-met* Amplifikation mit umgebenden Genen detektiert werden. Die Mehrheit der differenzierten Mammakarzinome zeigt jedoch keine *c-met* Amplifikation.

Die Verifizierung der *c-met* Amplifikationen in undifferenzierten Mammakarzinomen erfolgte durch FISH Analysen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. R. Siebert in Kiel. Tupfpräparate der in flüssigem Stickstoff asservierten Tumore wurden dabei mit Fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden hybridisiert. Als Sonden wurden dafür zwei sich überlappende Sequenzen des *c-met* Gens und als Kontrolle zwei sich überlappende Sequenzen des *cntn3* Gen, die mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, verwendet. Das *cntn3* Gen befindet sich wie *c-met* auf dem murinen Chromosom 6 jedoch am entgegengesetzten Ende.

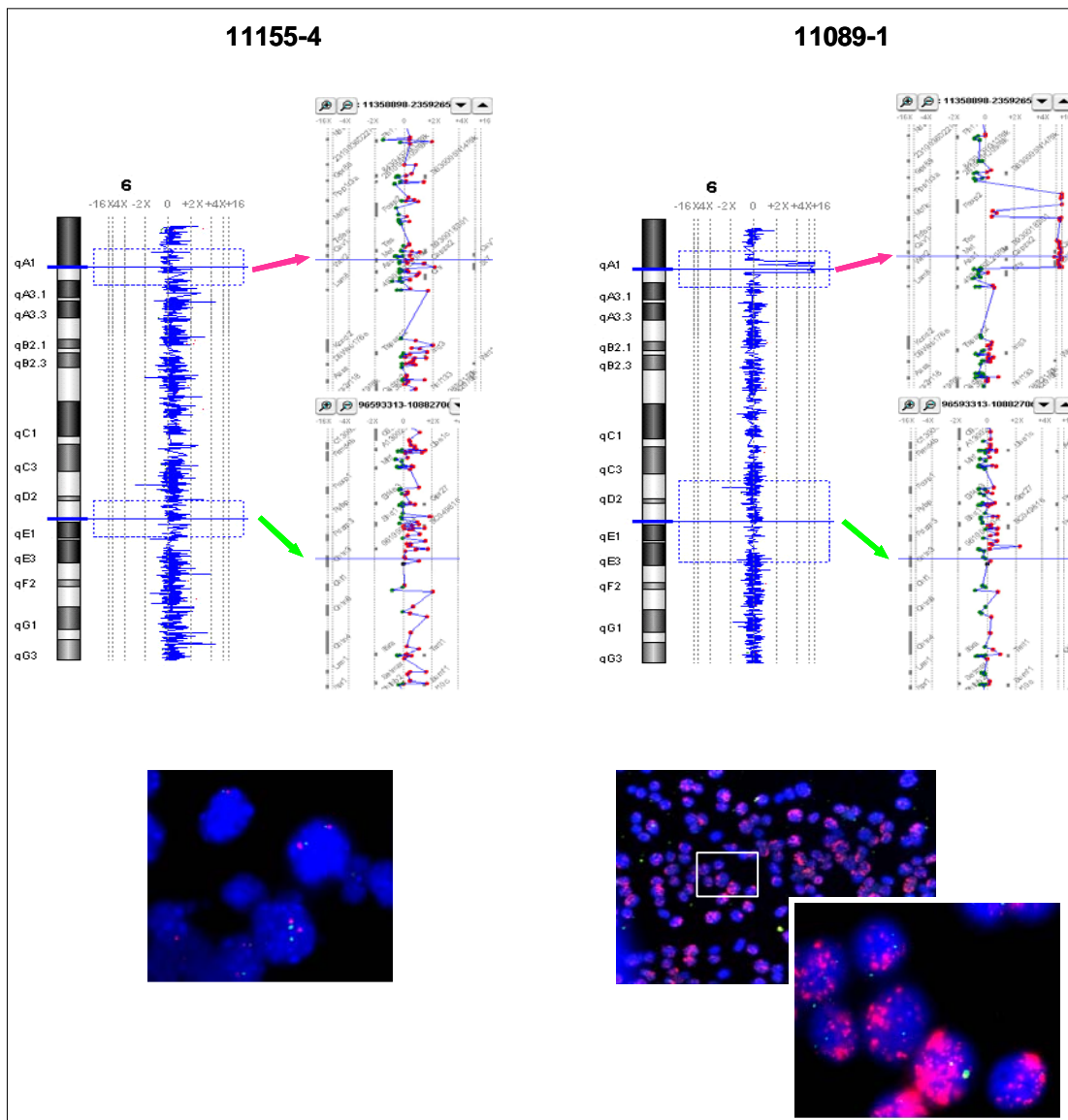


Abbildung 19: Darstellung von *c-met* in der CGH und FISH Analyse

Der obere Teil der Abbildung zeigt das CGH Profil des murinen Chromosoms 6 aus einem differenzierten G2 Mammakarzinom (1155-4) und einem undifferenzierten G3 Mammakarzinom (11089-1) monotransgener T1 Mäuse. In der Vergrößerung sind diese Genbereiche zu sehen, in der die FISH Sonden lokalisiert sind. Dabei ist der Bereich mit dem *c-met* Gen durch einen rosa Pfeil, der Bereich um das *cntn3* Kontroll-Gen durch einen grünen Pfeil gekennzeichnet. Der untere Teil der Abbildung zeigt einzelne Zellen der oben bezeichneten Tumore, die in eine FISH Analyse mit markierten Sonden gegen das *c-met* Gen (Cy3, rosa) und das *cntn3* Kontroll-Gen (Cy5, grün) eingesetzt wurden. Beide Methoden zeigen eine Amplifikation des *c-met* Gens in der DNA des G3 Mammakarzinoms 11089-1. In dem G2 Mammakarzinom 11155-4 hingegen ist das *c-met* Gen nicht amplifiziert, genau wie die Kontrolle *cntn3*, die in beiden Tumor Proben nicht amplifiziert ist.

In Abbildung 19 ist exemplarisch ein CGH Profil des Chromosoms 6, sowie die Aufnahme einiger Zellen aus der FISH Analyse eines Mammakarzinoms mit *c-met* und eines Karzinoms ohne *c-met* Amplifikation dargestellt. Die Bilder der FISH Analyse zeigen in den Zellen beider Tumore zwei grüne (Cy5), in der Intensität etwa gleich starke Signale für das Kontroll-Gen *cntn3*. Daraus geht

hervor, dass das Chromosom mit dem Kontroll-Gen in zwei Kopien, also in normal diploiden Zustand vorliegt. Dies ist auch der Fall für das *c-met* Gen in dem differenzierten G2 Tumor (11155-4), da zwei rosa Signale (Cy3) pro Zelle zu sehen sind. Die Zellen des undifferenzierten G3 Tumors 11089-1 hingegen zeigen eine Vielzahl Cy3 markierter Stellen mit starker Intensität. Demnach liegt die starke Amplifikation der *c-met* DNA in Form von zusätzlichen Miniatur-Chromosomen, den sogenannten *double minutes* vor. Den FISH Analysen entsprechend zeigt das CGH Profil von Chromosom sechs des Tumors 11089-1 eine starke *c-met* Amplifikation, wohingegen die Kopienzahl des *c-met* Gens in dem Tumor 11155-4 der des Kontroll-Gens *cntn3* entspricht.

Der molekulare Vergleich zwischen den Mammakarzinomen der mono- und bi-transgenen Tiere ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der globalen chromosomalen Instabilität. FACS und CGH Analysen zeigen, dass in allen untersuchten Mammakarzinomen, sowohl in denen aus T-Ag allein exprimierenden Tieren, als auch in denen, die neben T-Ag auch noch *mutp53* exprimieren, Tumore aller Differenzierungsstadien eine sehr große Aneuploidie aufweisen. Diese Aneuploidie ist bei Vergleichen gleichartiger Karzinome individuell. Demnach verursacht die Expression von *mutp53* in diesem Mausmodell keine zusätzliche chromosomale Instabilität in den Mammakarzinomen.

3.4 Expressionsanalysen von T-Ag und *mutp53* in den Mammae und Karzinomen aus T1-H22 Mäusen

T-Ag wird in Mammaepithelzellen laktierender und damit induzierter T1-H22 Mäuse global exprimiert (siehe Abbildung 20B), während eine *mutp53* Expression nur in einem kleinen Prozentsatz der Mammaepithelzellen (siehe Abbildung 20C) zu detektieren ist. Nach abgeschlossener Involution ist trotz Abwesenheit des Induktionssignals in Form laktotropher Hormone eine fokal gehäufte T-Ag Expression in T1 und T1-H22 Tieren zu beobachten. Dabei wird T-Ag vorwiegend in Epithelzellen der Peripherie einiger LA Einheiten (siehe Abbildung 21A) und nur sehr vereinzelt in Duktalen des Drüsenepithels exprimiert.

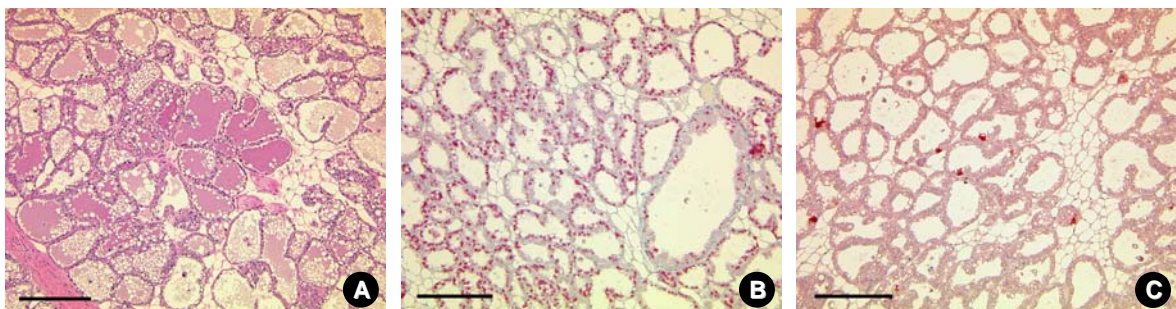


Abbildung 20: Morphologie und Immunhistologie von murinem T1-H22 Mammagewebe

Ausschnitt eines Brustdrüsenepithels einer laktierenden T1-H22 Maus nach einem Wurf, Tag 5 pp; **A:** Morphologie des Brustdrüsenepithels, H&E-Färbung; **B:** globale T-Ag Expression, LT-Färbung; **C:** geringe disseminierte *mutp53* Expression; HA-Tag-Färbung; Maßstab: Balken entspricht 200 μ m.

Morphologische Veränderungen in Form von duktalem Hyperplasien sowie intraepithelialen Neoplasien, jedoch noch keine invasiven Karzinome, wurden ab ca. 50 Tage pp detektiert. Ein Beispiel solch einer Dysplasie in Form einer intraepithelialen Neoplasie ist in Abbildung 20 abgebildet. Die thorakale Brustdrüse eines T1-H22 Tieres wurde zunächst nach einer *Whole Mount* Färbung in der Übersicht aufgenommen (A). In der Vergrößerung sind zum einen die hyperplastischen Veränderungen in Form verdickter Dükte und Seiten- sowie Endsprossen, als auch die bläschenartigen dysplastische Veränderung zu erkennen. Die Mamma wurde anschließend in Paraffin eingebettet und Schnitte dieser Dyperplasie einer Immunmarkierung gegen den HA-Tag und das LT unterzogen. Wie die Abbildung zeigt, wird in dieser intraepithelialen Neoplasie T-Ag nahezu global exprimiert (E), mutp53 hingegen nur vereinzelt disseminiert (F).

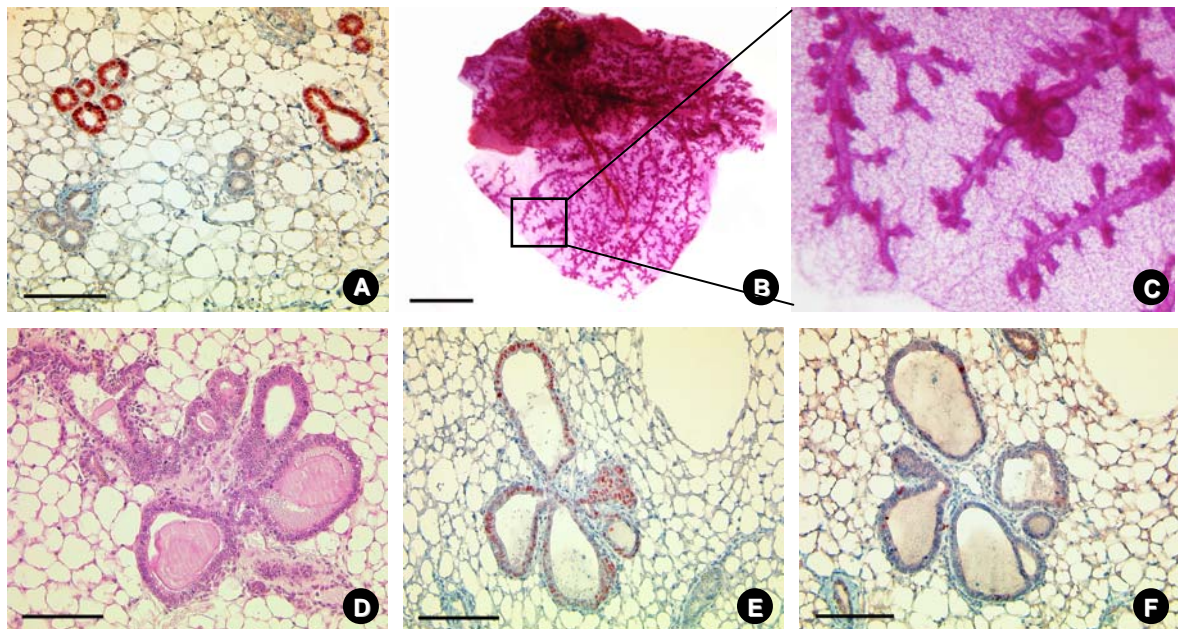


Abbildung 21: Murines Brustdrüsenewebe mit Hyperplasie und Dysplasie einer T1-H22 Maus nach abgeschlossener Involution

Thorakale Brustdrüse einer T1-H22 Maus am Tag 53 pp; **A**: fokale T-Ag Expression in einigen Acini hyperplastischer LA Einheiten; LT-Färbung; **B** und **C**: Whole Mount Färbung der gesamten Brustdrüse, Carminrot (**C**), mit Vergrößerung der Hyperplasie (**B**); **D-F**: Morphologie und Immunhistologie der intraepithelialen Neoplasie (i.e.N.) in Folgeschnitten; **D**: Morphologie der i.e.N., H&E Färbung; **E**: nahezu globale T-Ag Expression in der i.e.N., LT Färbung; **F**: geringe disseminierte mutp53 Expression, HA-Tag Färbung, Maßstab: Balken entspricht 100 µm, bzw. 3 mm (C).

Um festzustellen, ob die Menge von mutp53, bzw. die Anzahl mutp53 exprimierender Zellen mit dem Differenzierungsgrad der Mammakarzinome korreliert, wurden aus der Kohorte der 19 bi-transgenen Mäuse die Mammae, denen bei der pathologischen Begutachtung von Herrn Dr. Löhler ein *Grading*-Wert zugeordnet wurde, d. h. die pathologisch verändert waren, in immunhistologische HA-Tag und LT Färbungen eingesetzt.

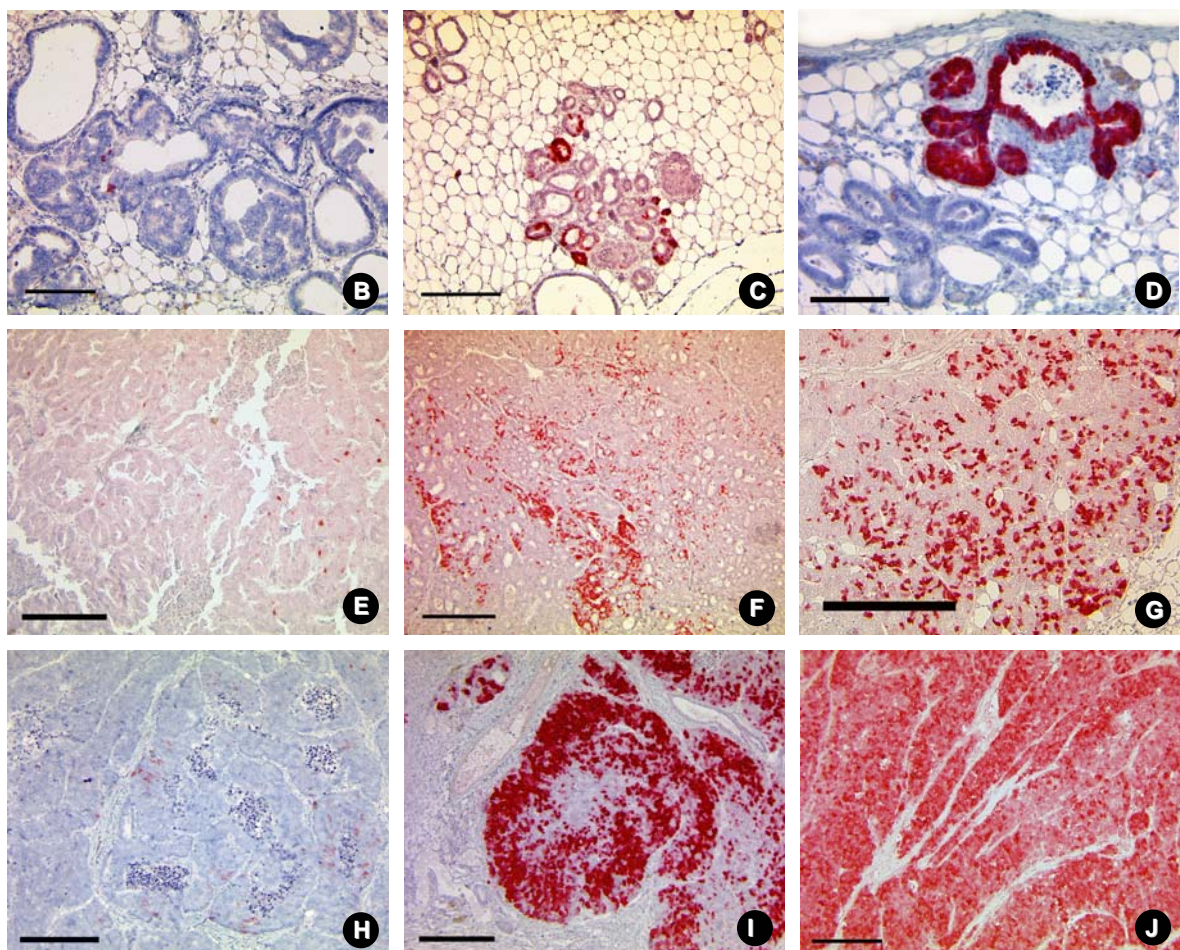
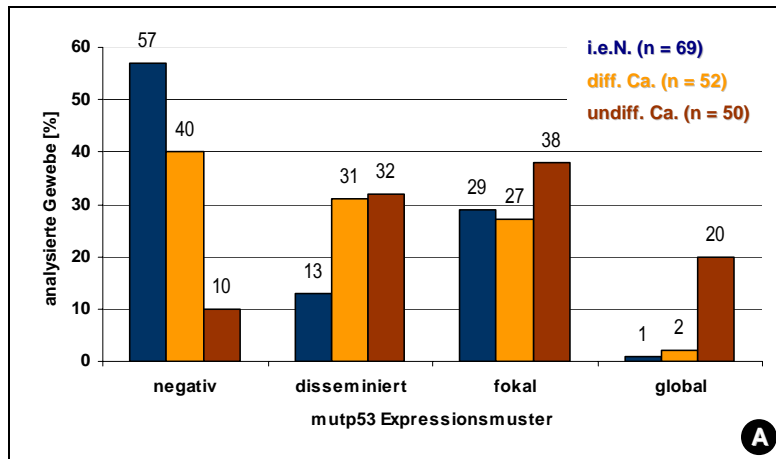


Abbildung 22: mutp53 Expressionsmuster in unterschiedlich differenzierten Mammakarzinomen

A: Darstellung der prozentualen Verteilung unterschiedlicher mutp53 Expressionsmuster (keine, disseminiert, fokal und global) in unterschiedlichen Differenzierungsstadien: intraepitheliale Neoplasien, differenzierte und undifferenzierte T1-H22 Mammakarzinome; B-J: Immunhistologie unterschiedlich differenzierter Mammagewebe, bzw. -Karzinome mit mutp53 Expressionsmuster; HA-Tag Färbung; Zeile 1: G0, Zeile 2: differenzierte Mammakarzinome (G1-G2), Zeile 3: undifferenzierte Mammakarzinome (G3-G4), Spalte 1: disseminierte mutp53 Expression, Spalte 2: fokale mutp53 Expression, Spalte 3: globale mutp53 Expression; B: duktales *in situ* Karzinom, G0; C: i.e.N., G0; D: i.e.N., G0, globale mutp53 Expression in der LA Einheit; E: papilläres Mammakarzinom, G1; F: mäßig differenziertes Mammakarzinom, G2; G: tubuloglanduläres Mammakarzinom, (G1-G2); H: undifferenziertes Mammakarzinom mit Tumornekrosen, G3; I: undifferenziertes Mammakarzinom, G3; J: undifferenziertes Mammakarzinom mit Anaplasien, G4; Maßstab: Balken entspricht 200 µm, bzw. 100 µm (B, D und H).

Im Gegensatz zu der durchgehend globalen T-Ag Expression, die in undifferenzierten Karzinomen jedoch schwächer wird, ist das Expressionsmuster von mutp53 in den analysierten Brustdrüsengeweben bzw. Tumoren sehr unterschiedlich. In 69 untersuchten intraepithelialen Neoplasien und 52 differenzierten Mammakarzinomen wurde vorwiegend ein mutp53 negatives Expressionsmuster detektiert (58- bzw. 40%), wohingegen in 50 untersuchten undifferenzierten Mammakarzinomen in nur 10% aller Fälle keine HA-Tag Markierung gefunden wurde. Eine globale mutp53 Expression konnte hingegen in 20% der undifferenzierten und nur in zwei bzw. ein Prozent der differenzierten Karzinome und intraepithelialen Neoplasien detektiert werden. Ein sporadisch disseminiertes, sowie fokal gehäuftes Expressionsmuster von mutp53 konnte in undifferenzierten und differenzierten Karzinomen zu ungefähr gleichen Prozentsätzen gefunden werden (siehe Abbildung 22).

Die immunhistologisch detektierte Expression des mutp53 Proteins, die vermehrt in undifferenzierten Mammakarzinomen beobachtet wurde, läßt keine Aussage darüber zu, ob die vermehrte mutp53 Detektion durch Stabilisierung des Proteins oder durch eine erhöhte transkriptionelle Aktivität zustande kam. Die RT-PCR Analyse stellt darüber hinaus auch eine weit sensitivere Methode als die Immunhistologie dar. Das wtp53 Protein ist zum Beispiel in so geringen Mengen in einer normalen, nicht gestressten Zelle vorhanden, dass es unter der Nachweisgrenze in der Immunhistologie liegt, aber die RNA durch RT-PCR detektiert werden kann.

Mittels RT-PCR wurde in diesem Versuch auch untersucht, ob alle drei T-Ag Spleissformen des T-Ag in allen Differenzierungsstadien nachweisbar sind, und/oder ob sie auf bestimmte Differenzierungsstadien beschränkt sind und eventuell von der mutp53 Expression beeinflusst werden. Für diese Studie wurde aus Tumoren beider Kohorten RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und verschiedene semi-quantitative PCRs durchgeführt. Eine Übersicht ist in Abbildung 23 zusammengestellt. Sowohl *wtp53*, als auch *LT*, *st* und *17 kT* werden in allen Differenzierungsstadien der untersuchten mono- und bi-transgenen Tumore transkribiert. Gleich man die Bandenintensität mit der Aktin-Kontrolle ab, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Transkriptionsstärke zwischen den unterschiedlichen Differenzierungsgraden erkennen. Die Oligonukleotide der Aktin-Referenz wurden so ausgesucht, dass das entstehende Produkt in der genomischen DNA eine Exon-Intron Struktur überspannt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die isolierte RNA nicht mit genomischer DNA kontaminiert war. Wäre dies der Fall, würden mit diesen Oligonukleotiden zwei unterschiedlich große Produkte synthetisiert werden, zum einen das 390 Bp große cDNA Fragment, das kein Intron enthält, zum anderen ein 500 Bp großes Fragment aus genomischer DNA, das ein Intron enthält, und dadurch ein um dessen Länge größeres Produkt ergibt. Eine *mutp53* Transkription war weder in der BALB/c wt Kontrolle, noch in den Karzinomen der mono-transgenen T1 Tiere, die das WAP-

mutp53 Konstrukt nicht enthalten, zu detektieren. In den undifferenzierten Tumoren (G1 und G2) wurde in zwei von drei G1 Tumoren und einem der drei untersuchten G2 Tumoren eine schwache *mutp53* Expression detektiert, wohingegen in allen untersuchten undifferenzierten bi-transgenen Karzinomen eine deutlich höhere *mutp53* Transkription zu erkennen war.

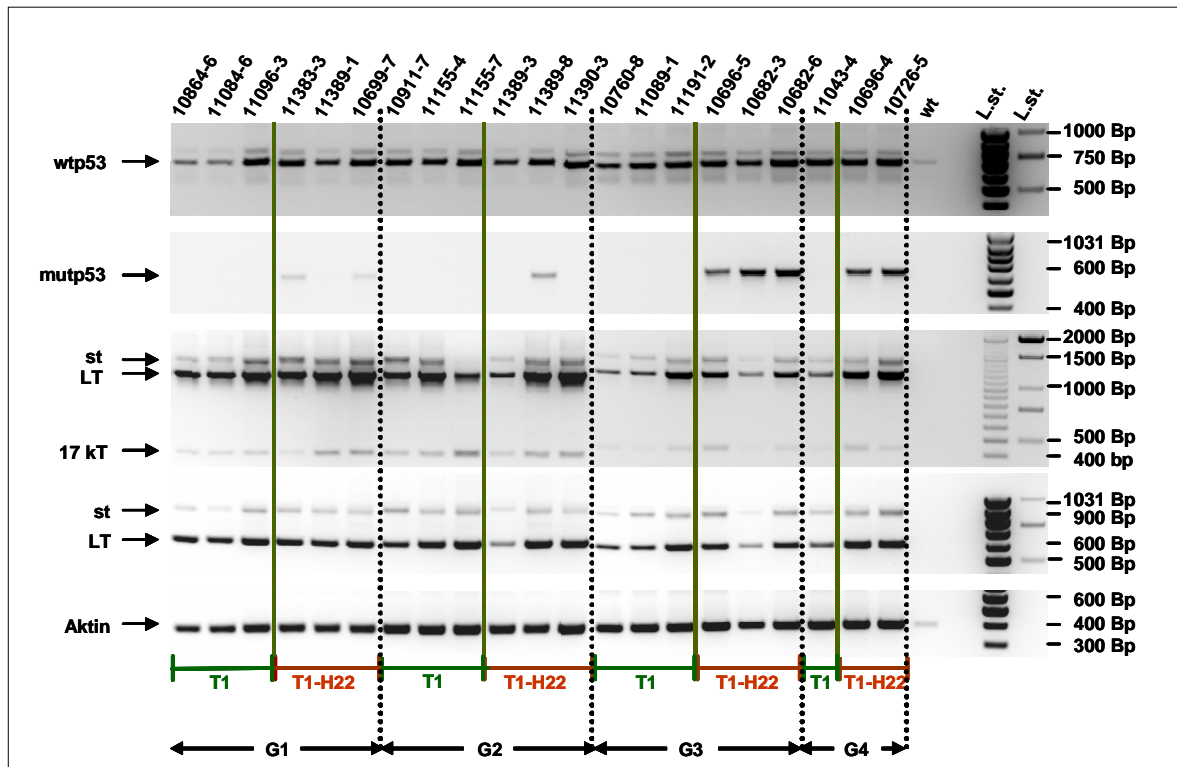


Abbildung 23: semi-quantitative Transkriptionsanalyse aus Tumoren mono- und bi-transgener Tiere

Semi-quantitative RT-PCR Analysen für *wtp53*, *mutp53*, T-Ag und Aktin aus Tumoren mono- und bi-transgener Tiere unterschiedlicher Differenzierungsgrade (G1 bis G4). *wtp53* zeigt mit den Oligonukleotiden FKR12 und 1270 ein 690 Bp großes Produkt in allen untersuchten Karzinomen und der wt Kontrolle. Auch alle drei, durch Spleißvarianten entstehenden T-Ag Formen *LT*, *st* und *17 kT* wurden in allen Karzinomen detektiert. Dabei wurden mit den Oligonukleotiden T11 und T9 für das *st* ein 1440 Bp, für das *LT* ein 1160 Bp und für *17 kT* ein 420 Bp großes Fragment detektiert. Mit den Oligonukleotiden T4 und T9 konnten *st* (870 Bp) und *LT* (600 Bp) detektiert werden. Das 690 Bp große *mutp53* Produkt (aus FKR12 und FKR4) konnte sehr schwach in zwei von drei G1 und einem von drei G2 Tumoren detektiert werden. In allen analysierten undifferenzierten Tumoren bi-transgener Mäuse konnte eine starke *mutp53* Transkription detektiert werden. Als Referenz wurde ein 390 Bp großes Fragment mit den Oligonukleotiden actin-fw und actin-rev synthetisiert. Die Histologienummern der Tiere, bzw. der Tumore sind über den entsprechenden Spuren aufgelistet. Die PCR-Produktgröße wurde mit dem Vergleich der Längenstandarde (L.st.) bestimmt (100 bp, 100+500 bp und 1 kb Längenstandard).

Diesen Analysen zufolge tritt eine *mutp53* Transkription verstärkt in undifferenzierten Mammakarzinomen auf. Die T-Ag Transkription scheint in differenzierten und undifferenzierten Mammakarzinomen gleichermaßen hoch zu sein, wobei in der Immunhistologie eine Abnahme der T-Ag Expression in Zellen undifferenzierter Tumorbereiche zu erkennen war.

In die FACS, CGH und Micro-Array Analysen wurden bewusst Mammakarzinome mit einem einheitlichen Differenzierungsstatus eingesetzt. Die Tatsache, dass es neben einheitlich differenzierten Mammakarzinomen auch Tumore gab, die Areale unterschiedlicher Differenzierungsgrade aufwiesen, konnte zum direkten Vergleich von Differenzierungsgrad und eventuell korrelativer Expression der Transgene mutp53 und T-Ag verwendet werden.

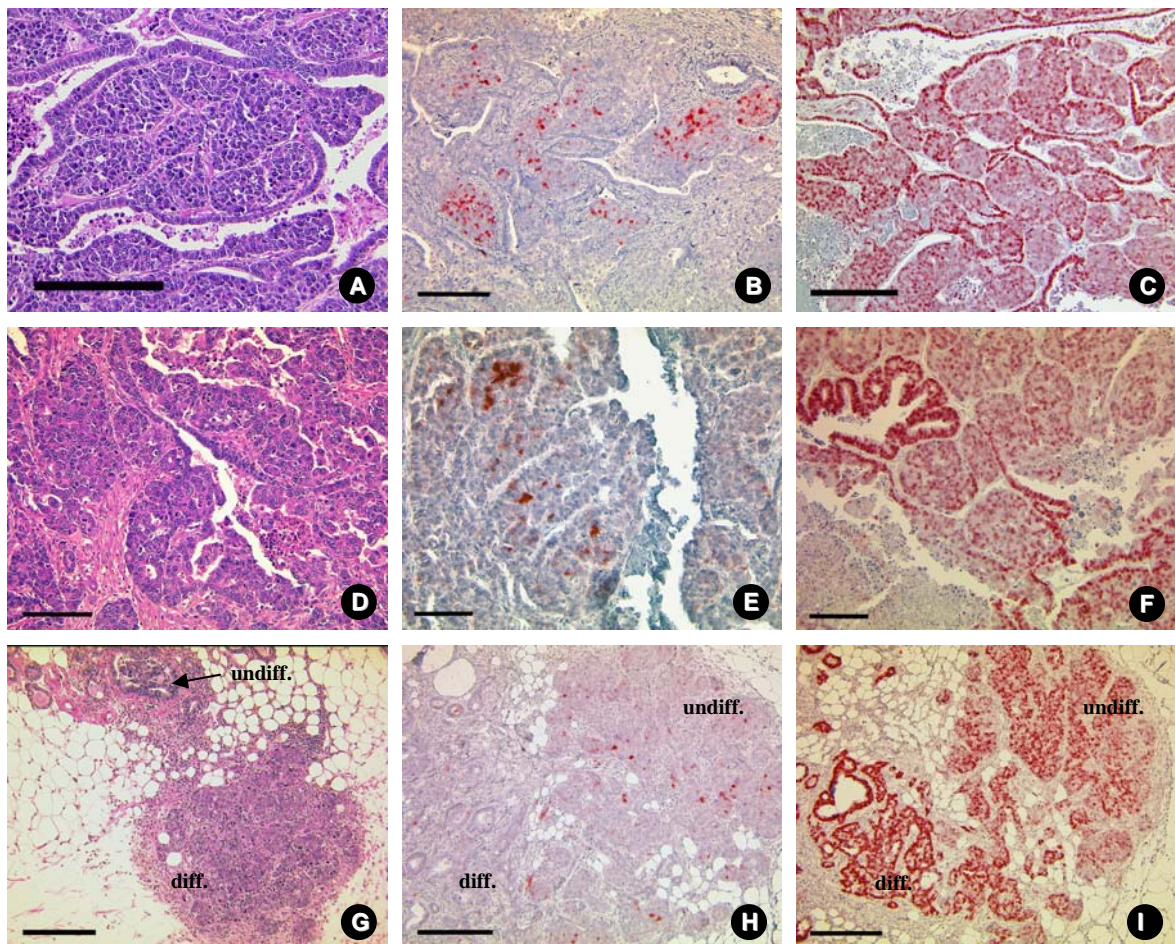


Abbildung 24: Morphologie und Immunhistologie einzelner muriner Mammakarzinome mit unterschiedlich differenzierten Arealen aus T1-H22 Mäusen

A-C: undifferenziertes Mammakarzinom (G3) ist von mäßig differenzierten Arealen (G2) umgeben, H&E Färbung (**A**), die HA-Tag Färbung zeigt eine mutp53 Expression in den undifferenzierten G3 Arealen, nicht aber in den differenzierten Arealen (**B**) und die LT Färbung ist in Zellen differenzierter Mammakarzinombereiche stark, in denen undifferenzierter Arealen hingegen schwächere (**C**); **D-E:** differenziertes Mammakarzinom (G1) mit undifferenzierten (G3) Bereichen, H&E Färbung (**D**). Die HA-Tag Färbung zeigt eine mutp53 Expression in den undifferenzierten G3 Arealen, nicht aber in den differenzierten Arealen (**E**), wohingegen die LT Färbung (**F**) in den Zellen differenzierter Mammakarzinombereiche eine starke, in denen undifferenzierter Arealen eine schwächere T-Ag Expression zeigt. **G-I:** differenziertes (diff.) Mammakarzinom (G2) neben undifferenziertem (undiff.) G3 Bereich, H&E Färbung (**G**). Die HA-Tag Färbung zeigt eine vereinzelt disseminierte mutp53 Expression in den undifferenzierten G3 Arealen, nicht aber in den differenzierten Arealen (**H**), wohingegen die globale LT Färbung (**I**) in den Zellen differenzierter Mammakarzinombereiche eine starke, in denen undifferenzierter Arealen eine schwächere T-Ag Expression zeigt. Maßstab: Balken entspricht 200 µm, bzw. 100 µm (D-F).

In Abbildung 24 sind Beispiele von Mammakarzinomen dargestellt, die innerhalb eines Tumors sowohl differenzierte, als auch undifferenzierte Areale aufweisen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass eine erhöhte mutp53 Expression mit dem Auftreten undifferenzierten Arealen korreliert, d. h. es werden mehr Zellen mit einer mutp53 Expression detektiert, während die T-Ag Expression in undifferenzierten Bereichen leicht abnimmt. Tumore in T1-H22 Mäusen entstehen aus T-Ag exprimierenden Mammapithelzellen, wobei in einem bestimmten Prozentsatz der transformierten Mammapithelzellen die zusätzliche Expression von mutp53 zu erkennen ist. So entstehen in den Mammagewebe aus T1-H22 Tieren sowohl Mammakarzinome, in denen nur T-Ag alleine exprimiert wird, und solche, in denen neben T-Ag auch noch mutp53 exprimiert wird. Die Expression von mutp53 in den T-Ag induzierten Mammakarzinomen verursacht keinen Effekt, der nicht auch in den mono-transgenen WAP-T1 Mäusen gefunden wurde und zeigt nach den CGH-Daten keine zusätzliche global erhöhte chromosomale Instabilität und andere genetisch veränderte Signalweg in Form von Gen-Amplifikationen in der Tumorprogression auf. In bi-transgenen Mäusen wurden jedoch eine erhöhte Inzidenz, mehr undifferenzierte Mammakarzinome, eine größere Heterogenität des Differenzierungsstatus, und eine erhöhte Invasivität in Form von Metastasenbildung gefunden. Außerdem zeigten vergleichende Analysen der Mammakarzinome aus T1-H22 Tieren eine verstärkte mutp53, sowie abgeschwächte T-Ag Expression in undifferenzierten versus differenzierten Tumor Arealen. mutp53 beeinflusst demnach die Tumorprogression in T-Ag induzierten Mammakarzinomen über einen quantitativen und keinen qualitativen Effekt.

VII Diskussion

1 mutp53 INITIIERT IM WAP-mutp53 MAUSMODELL NICHT OFFENSICHTLICH DIE ENTSTEHUNG VON MAMMAKARZINOMEN

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Inaktivierung von wtp53 die Tumorentstehung fördert. Mäuse, die kein p53 besitzen (*p53-knockout* Mäuse) kommen als normale, lebensfähige Mäuse zur Welt, die jedoch im Laufe ihres Lebens häufig Lymphome und Sarkome, selten auch Karzinome entwickeln und in einem Alter von zwei bis acht Monaten sterben (Kwan, 2002; Olive *et al.*, 2004). Punktmutationen im *p53* Gen scheinen Tumorzellen oftmals einen zusätzlichen Wachstumsvorteil zu verleihen, und das Vorkommen von mutp53 in Tumoren geht häufig mit einer Therapieresistenz einher (Aas *et al.*, 1996; Rahko *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004). So korrelieren *p53* Mutationen in Mammakarzinomen oft mit einer schlechten Prognose.

Diese Befunde unterstützen die Hypothese eines Funktionsgewinns („gain of function“) für bestimmte *p53* Mutationen. Bislang wurde diese Rolle von mutp53 *in vivo* vorwiegend an *knock-in* Mäusen analysiert. Dies bedeutet jedoch, dass mutp53 auch schon während der Entwicklung exprimiert wird, wodurch ein eventuell auftretender Tumor-fördernder mutp53 Effekt zeitlich nicht in die Tumorentwicklung eingeordnet werden kann. Zusätzlich wird mutp53 in diesen Modellen unspezifisch in allen Organen exprimiert und stellt daher für die Nachahmung der humanen Brustkrebs-Situation, in der die Mutation meist spontan im adulten Organ auftritt, kein geeignetes Modell dar. Mausmodelle, die eine *p53* Mutation heterozygot exprimieren eignen sich hingegen als Modell für die Untersuchung von mutp53 im Li-Fraumeni-Syndrom, dessen Ursache eine Keimbahnmutation in *p53* ist. So konnten K. Olive *et al.* für die Mutation R270H in einem *p53* heterozygoten ($p53^{R270H/+}$) Mausmodell im Vergleich zu den *p53*^{+/-} Tieren eine etwa doppelt so hohe Tumorlast detektieren (Olive *et al.*, 2004). Studien verschiedener Mausmodelle zeigen, dass der Effekt von mutiertem *p53* aufgrund einer Organ-spezifischen Regulation und einem Zusammenspiel mit vielen verschiedenen Faktoren, seien es Onkogene, endogene Mutationen, Kanzerogene oder nur der genetische Hintergrund, sehr heterogen ist. Aufgrund dessen lassen sich Ergebnisse unterschiedlicher Mausmodelle nur sehr bedingt generalisieren (Attardi & Donehower, 2005; Soussi & Lozano, 2005).

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss verschiedener *p53* Hot-Spot-Mutationen, die besonders häufig in humanen Mammakarzinomen detektiert wurden und mit einer schlechten Prognose korrelieren (Rahko *et al.*, 2003; Olivier *et al.*, 2006), in einem transgenen Mausmodell auf die Entstehung von Mammakarzinomen zu untersuchen. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Tiermodellen wurde je eine der *p53* Hot-Spot-Mutationen R270H und R245W

spezifisch unter der Kontrolle des WAP-Promotors in somatischen Zellen, den Epithelzellen der Mammae, exprimiert. Weiterhin wurde das Transgen erst in Zellen adulter Tiere und außerdem nicht konstitutiv exprimiert, auch wenn mutp53 nicht nur während der Laktation, sondern in geringen Mengen schon ab der Geschlechtsreife detektiert werden konnte. Aufgrund dieser Eigenschaften simuliert dieses Tiermodell die humane Situation hinsichtlich einer spontanen p53 Mutation in Zellen eines bestimmten Organs besser als andere bislang untersuchte Tiermodelle.

Die vergleichenden Untersuchungen der Überlebenszeit zeigten keinen Unterschied zwischen den mutp53 transgenen Tieren und den BALB/c wt Tieren, und auch die Tumorzinzidenz der mutp53 exprimierenden Tiere war nicht höher. Zwar entwickelten zwei Tiere der hoch mutp53 exprimierenden Linie H8 und ein Tier der nicht exprimierenden Linie H22 im Gegensatz zu den beiden Linien W1 und W10 je ein Mammakarzinom, jedoch konnte auch bei zwei BALB/c wt Tieren je ein spontan entwickeltes Mammakarzinom detektiert werden, so dass insgesamt keine signifikant höhere, auf mutp53 Expression zurückzuführende, Tumorzinzidenz nachgewiesen werden konnte.

Bemerkenswerterweise wurde in allen drei Mammakarzinomen, die in Tieren mit der Mutation R270H auftraten, mutp53 global exprimiert. Selbst das Mammakarzinom der Linie H22, bei der bislang während der Laktation keine Expression des Transgens nachweisbar war, zeigte in dem undifferenzierten Mammakarzinom eine globale mutp53 Expression. In den Mammae 18 Monate alter Tiere, die oft altersentsprechende Hyperplasien aufweisen, konnten bisweilen vereinzelte mutp53 positive Epithelzellen detektiert werden. Da diese Hyperplasien jedoch auch in wt Tieren zu sehen sind, kann es sich hierbei nicht um einen direkten Effekt von mutp53 handeln. Vielmehr legt diese Beobachtung die Vermutung nahe, dass mit dem Alter zunehmende genetische Alterationen mit einer vereinzelt auftretenden mutp53 Expression einhergehen, diese Zellen dadurch einen Wachstumsvorteil erhalten, wodurch Mammakarzinome entstehen können. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass auch in BALB/c wt Tieren ohne die Expression von mutp53 spontan Mammakarzinome entstehen können, sprechen gegen eine Funktion von mutp53 (R270H und R245W) als offensichtlicher Initiationsfaktor in Anwesenheit von wtp53, sind jedoch kompatibel mit der Annahme, dass mutp53 während der Progression eine Rolle spielen könnte.

2 IN KOOPERATION MIT SV40 T-Ag ERHÖHT mutp53 SOWOHL DIE TUMORINZIDENZ ALS AUCH DIE METASTASIERUNGSRATE UND FÖRDERT DIE VERMEHRTE ENTSTEHUNG UNDIFFERENZierter MAMMAKARZINOME

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Aktivität von mutp53 in der Progression der Mammakarzinogenese zu untersuchen. Die vergleichenden Analysen der Mammakarzinome aus den mono-transgenen *WAP-T1* Tieren, einer Linie des bereits etablierten WAP-T Tiermodells für

duktale *in situ* Karzinome der Brustdrüse, mit den bi-transgenen Tieren *WAP-T1* x *WAP mutp53^{R270H}-H22* ergaben, dass *mutp53* in Kooperation mit SV40 T-Ag die Progression der Mammakarzinome signifikant beeinflusst und die vermehrte Entstehung undifferenzierter Karzinome und Lungenmetastasen begünstigt.

Wie bereits gezeigt wurde ist das *WAP-T1* Transgen *per se* ein sehr starkes Onkogen. Neben der Inaktivierung von *wtp53* binden und inaktivieren die Proteine der SV40 „frühen“ Genregion auch verschiedene andere Proteine, die in zellulären Prozessen, wie Apoptose, Zellzyklusregulation und Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen, und tragen dadurch maßgeblich zu der Zelltransformation, sowie der Tumorprogression bei (Boyapati *et al.*, 2003; Ahuja *et al.*, 2005). Das schon charakterisierte *WAP-T1* transgene Mausmodell diente als Grundlage zur Erfassung *mutp53* vermittelter Effekte während der Tumorprogression. Die Induktion des *WAP-T1* Transgens erfolgt durch die Verpaarung. Dadurch kann der Zeitpunkt festgelegt werden, an dem die Zelltransformation eingeleitet wird. Weiterhin zeigen die T-Ag induzierten Mammakarzinome alle Stadien der Tumorprogression von Dysplasien, über intraepitheliale Neoplasien bis hin zu differenzierten und undifferenzierten invasiven Mammakarzinomen. Die bi-transgenen *WAP-T1* x *WAP-T1-H22* Mäuse stellen demnach ein ausgezeichnetes Modell dar, um einen zusätzlichen Effekt von *mutp53* hinsichtlich der Tumorprogression auf ein bereits induziertes Mammakarzinom mit schon weitgehend charakterisierter Progression zu untersuchen.

Die phänotypische Untersuchung der Brustdrüsen bzw. entstandenen Mammakarzinome im Endpunktstadium der T1 Tiere hat gezeigt, dass die Expression von T-Ag zur Entstehung multifokaler, differenzierter und undifferenzierter Mammakarzinome führt. Die zusätzliche Expression von *mutp53* in T-Ag exprimierenden Brustdrüsengewebe führt zu vergleichbaren Tumoren, jedoch mit signifikant erhöhter Inzidenz. So wurden in betroffenen Mammæ der bi-transgenen Tiere 50% mehr Tumore detektiert, als in denen mono-transgener T1 Mäuse. Darüber hinaus sind die Tumore bi-transgener Tiere größer, zu einem größeren Prozentsatz undifferenziert und zeigen eine verstärkte Invasivität in Form vermehrter Metastasierung in die Lunge, wohingegen mono-transgene T1 Mäuse nur selten Lungenmetastasen entwickelten. Die signifikante „Verschlimmerung“ des Tumor-Phänotyps durch die *mutp53* Expression erscheint umso bedeutungsvoller, als *mutp53* im Gegensatz zu T-Ag nur in wenigen Zellen exprimiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *mutp53* in diesem analysierten Mausmodell die Progression der Mammakarzinome durch einen quantitativen, und keinen qualitativen Effekt beeinflusst. Dies entspricht der Situation, wie sie in humanen Mammakarzinomen gefunden wird, in der eine *mutp53* Expression zwar oft mit der Entstehung eines malignen Tumor-Phänotyps einhergeht, ein maligner Phänotyp aber auch ohne *p53* Mutation entstehen kann (Done *et al.*, 2001).

Die Beobachtung, dass eine *mutp53* Expression in der Progression T-Ag induzierter Mammakarzinome primär zu einem quantitativen Effekt führt, wird durch die Resultate der CGH Analysen bestätigt. Die Zellen der untersuchten differenzierten G1 und G2 Mammakarzinome zeichnen sich durch eine hohe Aneuploidie und Proliferationsrate aus, die morphologischen Strukturen der Mammae bleiben jedoch teilweise erhalten. Dies geht mit Amplifikationen einzelner Gene einher, die in jedem Tumor scheinbar individuell und sporadisch über das Genom verteilt entstehen. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die undifferenzierten G3 und G4 Tumore neben den verschiedenen individuellen Mutationen durch eine Anzahl gemeinsam amplifizierter Gene aus. Der Vergleich zwischen den differenzierten und undifferenzierten Mammakarzinomen zeigt keine gemeinsamen Amplifikationen, was darauf hinweist, dass die Progression der T-Ag initiierten Mammakarzinome von differenzierten zu undifferenzierten Graden vorwiegend nicht linear aus einer Zellpopulation verläuft. Demnach wird sehr früh in der Progression die Benignität bzw. Malignität durch entsprechende Mutationen und andere genetische Alterationen festgelegt.

Bis auf eine Ausnahme ist in allen analysierten undifferenzierten murinen Mammakarzinomen das *c-met* Gen amplifiziert und korreliert mit einer 50- bis 100-fach erhöhten Transkription der *c-met* mRNA. Die Entwicklung „maligner“ undifferenzierter Tumore der T-Ag induzierten Mammakarzinome sind demnach mit einer Amplifikation des *c-met* Gens und erhöhten Expression verbunden, wohingegen bei den differenzierten Mammakarzinomen bei einer etwa zehnfachen Erhöhung der Expression nur in wenigen Ausnahmefällen eine Amplifikation zu detektieren ist. *c-met* wurde als Proto-Onkogen klassifiziert und kodiert für einen Transmembran-Rezeptor mit Tyrosin-Protein Kinase Aktivität. In vielen humanen Krebsarten wurde eine Überexpression und Amplifikation des *c-met* Gens gefunden und in Zusammenhang mit Zellmobilität und Metastasierung gebracht. Hinsichtlich Brustkrebs gibt es Hinweise, dass eine *c-met* Überexpression als prognostischer, HER2/neu unabhängiger Faktor invasiver, d.h. maligner Mammakarzinome dienen kann, was mit unseren Beobachtungen übereinstimmt (Birchmeier *et al.*, 2003; Welm *et al.*, 2005; Boccaccio & Comoglio, 2006). Zusätzlich zu der Amplifikation des *c-met* Gens wurden auch einige Gene in der direkten Nachbarschaft amplifiziert, die ein ähnliches Expressionsprofil wie das *c-met* Gen zeigen. Obwohl die biologische Funktion einiger dieser Gene, z.B. *capza7* und *st7* noch nicht verstanden ist, deutet diese Co-Regulation darauf hin, dass sie eine bestimmte Funktion in der Tumorprogression haben. Interessanterweise scheint die Co-Amplifikation eines Gens nicht notwendigerweise mit dessen Co-Expression einherzugehen. Während beispielsweise das *wnt2* Gen in undifferenzierten Mamakarzinomen in Verbindung mit *c-met* co-amplifiziert ist, zeigt die Expressionsanalyse eine durchgehende Repression sowohl in differenzierten, als auch in undifferenzierten Mammakarzinomen. Diese Daten deuten darauf hin, dass durch die Nachbarschaft des *c-met* Gens das Gen zwar amplifiziert ist, dies jedoch keine funktionelle Auswirkung hinsichtlich einer erhöhten Expression mit sich bringt.

3 MÖGLICHE MECHANISMEN DES mutp53-EFFEKT AUF DIE PROGRESSION VON MAMMAKARZINOMEN

Zahlreiche Studien führen einen pro-tumorigenen Effekt von mutp53 auf eine erhöhte globale genomische Instabilität zurück (Smith *et al.*, 2000; Hoglund *et al.*, 2002; Shackney & Silverman, 2003; Kleivi *et al.*, 2005). Der abnorme Chromosomengehalt der Zellen, die Aneuploidie, ist das geläufigste Merkmale solider humaner Tumore (Kops *et al.*, 2005). Ramel *et al.* beschrieben 1995 die SV40 vermittelte Zelltransformation in Korrelation mit einer T-Ag induzierten Aneuploidie in einem Pankreasadenokarzinom Modell. Zusätzlich konnte kürzlich von zwei Arbeitsgruppen die Induktion chromosomaler Instabilität und damit einhergehende erhöhte Metastasierung als mutp53-vermittelte Funktion in einem durch das Onkogen *Kras* induzierten Mausmodell für duktales Pankreasadenokarzinome gezeigt werden (Hingorani *et al.*, 2005; Siveke & Schmid, 2005). Für eine WAP-mutp53^{R172H} transgene Mauslinie konnte die Arbeitsgruppe um J. Rosen (Murphy & Rosen, 2000) eine erhöhte Aneuploidie in Mammakarzinomen transgener Tiere im Vergleich zu Mammakarzinomen aus wt Kontrolltieren, die durch das Kanzerogen DMBA induziert wurden, nachweisen. Weiterhin zeigten Vergleiche unterschiedlich differenzierter humaner Mammakarzinome eine Zunahme genetischer Instabilität mit dem Differenzierungsgrad (Shackney & Silverman, 2003; Woodward *et al.*, 2005).

All diese Hinweise legten nahe, dass die Expression von T-Ag in Mammakarzinomen zu einer Aneuploidie führt, die sowohl durch zusätzliche Expression von mutp53 in den Mammakarzinomen bi-transgener Tumore, als auch in undifferenzierten Tumoren verstärkt wird. Erstaunlicherweise konnte jedoch in den vergleichenden Analysen kein signifikanter Unterschied im Grad der Aneuploidie detektiert werden. So zeigten alle analysierten Tumore, sowohl differenzierte und undifferenzierte, wie auch der Vergleich mono- und die bi-transgener Tiere eine gleichermaßen ausgeprägte und für jeden einzelnen Tumor individuell verschiedene Aneuploidie. Dies zeigt, dass der beobachtete Effekt von mutp53 in der Tumorprogression T-Ag induzierter Mammakarzinome nicht auf einer erhöhten globalen genetischen Instabilität, sondern auf einen bislang unentdeckten Mechanismus beruht.

Das Brustdrüsengewebe enthält multipotente Stammzellen, die Ursprung aller, im Brustdrüsengewebe vorhandenen differenzierten Zelltypen sind (Woodward *et al.*, 2005). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Mammakarzinome aus einer Art Stammzelle entstehen können, die in der Literatur sehr divergent als Krebsstammzellen, aber auch als Tumor initiiierende Zellen bezeichnet werden (Dontu *et al.*, 2003; Smalley & Ashworth, 2003; Chang, 2006). Man geht davon aus, dass es sich bei solchen Zellen nicht um die „klassische“ Stammzelle mit totipotenten Eigenschaften handelt, sondern um eine determiniertere Progenitorzelle, die Abkömmling einer adulten Stammzelle ist. Eine solche Progenitorzelle weist hinsichtlich ihrer Regenerationsfähigkeit Stammzeleigenschaften auf, ist andererseits auf einen künftigen Funktionsbereich festgelegt -

allerdings ist diese "Festlegung" noch umkehrbar (Al-Hajj & Clarke, 2004; Vogelstein & Kinzler, 2004). Im Folgenden werden diese Zellen der Einfachheit halber als „Progenitorzellen“ bezeichnet. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der murinen Mammakarzinome bzw. der Involutionsstudien der Mäuse geben Hinweise darauf, dass die in den T1 und T1-H22 entstehenden Mammakarzinome den Ursprung in solchen Progenitorzellen haben. So ist die Entstehung der Mammakarzinome aus Progenitorzellen eine mögliche Erklärung für die große Individualität der Tumoren, wie sie sowohl bei den T1 wie auch den T1-H22 Tieren beobachtet wurde. Indizien dafür sind die Heterogenität in Ploidie, chromosomalen Aberrationen sowie Expressionsprofilen der einzelnen Tumoren, für die man in Anbetracht des isogenen Hintergrundes und der Prädisposition von BALB/c Mäusen für Mammakarzinome bei einem genetisch klar definierten tumorauslösenden Programm ein einheitlicheres Bild hätte erwarten können. Die individuelle genetische Variabilität der Mammakarzinome hat ihre Ursache demzufolge in der Anreicherung verschiedener genetischer Alterationen in diesen Progenitorzellen, welche offensichtlich als Folge stochastischer Ereignisse auftreten und im weiteren Verlauf der Tumorgenese durch Differenzierungsprogramme selektioniert werden.

Einen weiteren Hinweis auf die Entstehung der T-Ag induzierten Mammakarzinome aus Progenitorzellen liefert auch die Beobachtung, dass T-Ag exprimierende Mammaepithelzellen in den Brustdrüsengewebe nach der Involution in Clustern vorliegen und die Tumore sich durch eine deutliche Fokalität auszeichnen.

Immunhistologische Untersuchungen, die die Expression der Marker für die jeweiligen Zellen unterschiedlichen epithelialen Charakters erfassen, untermauern die Hypothese, dass die T-Ag induzierten Mammakarzinome aus Progenitorzellen hervor gehen. So konnten in Tumor Arealen einerseits Zellen detektiert werden, die Zytokeratin 14 exprimieren, das als Marker von Zellen mit myoepithelialelem Charakter gilt. Andererseits konnten in diesen Arealen auch Zytokeratin 18 positive Zellen detektiert werden, und damit als luminal Epithelzellen charakterisiert werden. Gleichzeitig wurden auch Zytokeratin 6 positive Zellen gefunden, wobei Zytokeratin 6 in frühen Differenzierungsstadien sowohl in Zellen mit myoepithelialelem, als auch luminal epithelialelem Charakter exprimiert wird (Birnbaum *et al.*, 2004). Diese Beobachtung kann nur mit der Annahme erklärt werden, dass diese Zellen aus einem gemeinsamen Progenitor entstanden sind (Dontu *et al.*, 2004).

Auch der Ursprung der T-Ag negativen aneuploiden Zellpopulation, die in den FACS Profilen detektiert wurden, ist auf gemeinsame Progenitorzellen zurückzuführen. Neben der Zellpopulation, die einen DNA Gehalt diploider Zellen darstellt ist noch eine meist kleinere Zellpopulation in allen Profilen T-Ag negativer Zellen, d.h. sowohl in denen der differenzierten, als auch in denen der undifferenzierten Karzinome, zu erkennen. Diese Population zeichnet sich durch einen hyperdiploiden, jedoch hypotetraploiden DNA-Gehalt aus und stellt in den Profilen der T-Ag

positiven Zellen jeweils die größte Zellpopulation dar. Theoretisch könnte es sich hierbei um transformierte Zellen handeln, die T-Ag unabhängig geworden sind. Die immunhistochemische T-Ag Färbungen der differenzierten und undifferenzierten Mammakarzinome zeigen, dass die T-Ag Expression in den Zellen sowie die Anzahl der T-Ag exprimierenden Zellen nur in undifferenzierten Mammakarzinomen häufig abnehmen. Eine T-Ag negative aneuploide Zellpopulation ist jedoch sowohl in differenzierten, als auch in undifferenzierten Karzinomen zu finden und unterscheidet sich in der Menge nicht maßgeblich.

Aufgrund dieser Befunde lässt sich zwar noch keine definitive Aussage darüber machen, ob es sich bei diesen Zellen um ehemals T-Ag exprimierende Zellen handelt, oder es sich um eine Zellpopulation handelt, die mit den T-Ag positiven Zellen aus gemeinsamen tumorigenen Progenitorzellen hervorgegangen sind. Im Zuge der Differenzierung könnten Klone T-Ag exprimierender Epithelzellen, sowie Klone myoepithelialen Charakters, die keine Epithelzell-spezifische T-Ag Expression zeigen, jedoch dieselbe Aneuploidie aufweisen, aus diesen Progenitorzellen entstanden sein.

Basierend auf der Annahme, dass die Tumorgenese der Mammakarzinome in den hier untersuchten Tiermodellen durch Aberrationen in Progenitorzellen initiiert wird und vor dem Hintergrund, dass sich T1 mono- und T1-H22 bi-transgene Tiere vor allem in der Tumorinzidenz sowie dem Anteil undifferenzierter Karzinome unterscheiden, kann folgendes hypothetisches Modell postuliert werden. Hierin beruht die Wirkung von mutp53 vor allem auf der Funktion eines Inhibitors der Differenzierung. Die Arbeitsgruppe um V. Rotter zeigte für die auch in dieser Arbeit untersuchten p53 Mutation R270H die Funktion eines Inhibitors der myeloiden Differenzierung (Matas *et al.*, 2004). Ein p53-induzierter zumindest partieller Differenzierungsblock in Tumorprogenitorzellen würde den Erhalt eines undifferenzierten Phänotyps während der Tumorentwicklung und – Progression begünstigen, wodurch ein größerer Anteil undifferenzierter Mammakarzinome, wie das bei T1-H22 der Fall ist, entstehen würde. Ebenso könnte ein Differenzierungsblock in Progenitorzellen den Anteil dieser Vorläuferzellen erhöhen, wodurch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass durch zusätzliche genetische Alterationen mehr initiierte Tumorzellen entstehen. Dies könnte die erhöhte Tumorinzidenz der bi-transgenen Tiere erklären (siehe Abbildung 25).

Zur Verifizierung dieses hypothetischen Modells sind weitere Untersuchungen zwingend notwendig. In jedem Fall bieten sich die WAP-T bzw. WAP-T x WAP-mutp53 transgenen Mäuse als potentes experimentelles System an, um den hier beschriebenen „gain of function“ von mutp53 in der Tumorprogression von Mammakarzinomen an einem realitätsnahen und human ähnlichen Modell im Detail zu untersuchen.

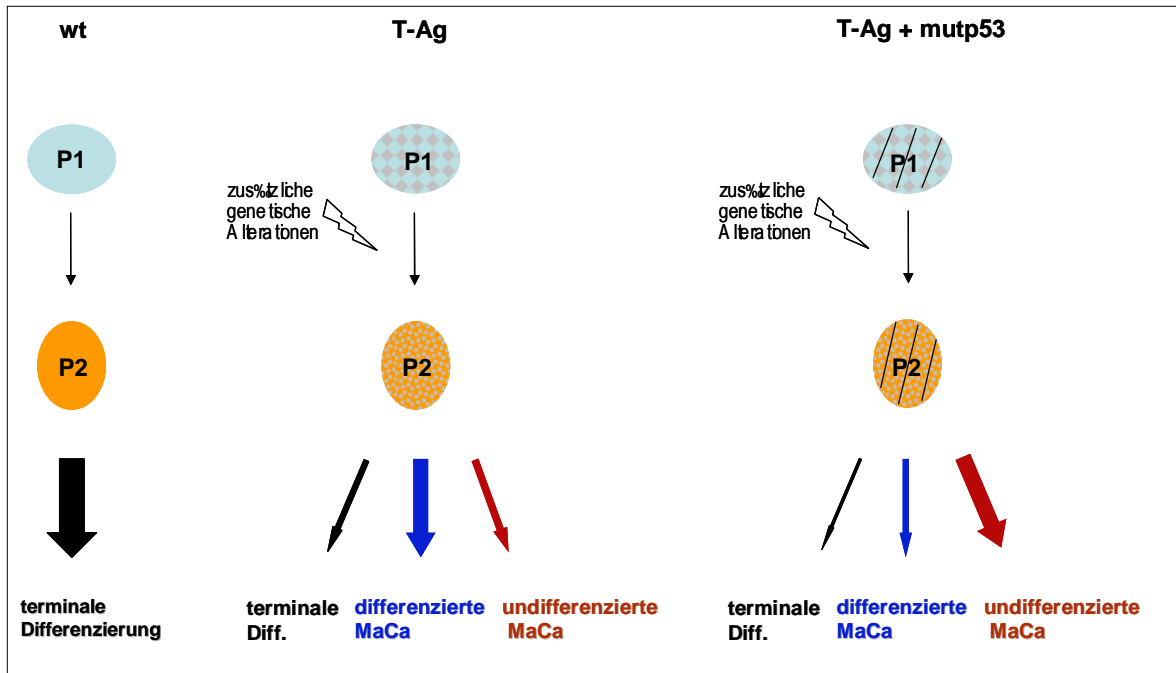


Abbildung 25: Hypothetisches Modell zum Einfluss von SV40 T-Ag und mutp53 auf die Entwicklung von Mammakarzinomen

T-Ag bzw. T-Ag und mutp53 exprimierende Progenitorzellen (P1) differenzieren weiter zu P2 Progenitorzellen. Zusätzlich können stochastisch genetische Alterationen auftreten. Im Weiteren wird entweder die terminale Differenzierung, die Entstehung differenzierter oder undifferenzierter Mammakarzinome (MaCa) eingeleitet. Die Dicke des Pfeils gibt die Häufigkeit des jeweiligen Ereignisses wieder. Wird in den Progenitorzellen nur T-Ag exprimiert kommt es vorwiegend zur Entstehung differenzierter Karzinome, während eine zusätzliche mutp53 Expression die Differenzierung teilweise blockiert, wodurch insgesamt mehr Karzinome mit bevorzugt undifferenziertem Charakter entstehen. Progenitorzellen ohne T-Ag und mutp53 differenzieren auch zu P2 Progenitorzellen. Oft kommt es trotz genetischer Alteration (siehe p16/p19 Punktmutation im BALB/c Mausstamm) zu einer terminalen Differenzierung, die in einem phänotypisch gesunden und funktionsfähigen Organ bzw. Mammagewebe endet.

VIII Literaturverzeichnis

- Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA & Lonning PE (1996). Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* **2**, 811-814.
- Ahuja D, Saenz-Robles MT & Pipas JM (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* **24**, 7729-7745.
- Al-Hajj M & Clarke MF (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* **23**, 7274-7282.
- Albertson DG, Collins C, McCormick F & Gray JW (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* **34**, 369-376.
- Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmuller L & Deppert W (1999). Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* **18**, 7706-7717.
- Ali-Seyed M, Laycock N, Karanam S, Xiao W, Blair ET & Moreno CS (2006). Cross-platform expression profiling demonstrates that SV40 small tumor antigen activates Notch, Hedgehog, and Wnt signaling in human cells. *BMC Cancer* **6**, 54.
- Attardi LD & Donehower LA (2005). Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models. *Mutat Res* **576**, 4-21.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Orntoft T, Lukas J & Bartek J (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864-870.
- Bensaad K, Le Bras M, Unsal K, Strano S, Blandino G, Tominaga O, Rouillard D & Soussi T (2003). Change of conformation of the DNA-binding domain of p53 is the only key element for binding of and interference with p73. *J Biol Chem* **278**, 10546-10555.
- Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Heath V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X & Crook T (2003). p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **3**, 387-402.
- Bernards R & Weinberg RA (2002). A progression puzzle. *Nature* **418**, 823.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E & Vande Woude GF (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 915-925.
- Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C, Tagett R, Jacquemier J & Charafe-Jauffret E (2004). Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). *Int J Oncol* **25**, 249-258.
- Boccaccio C & Comoglio PM (2006). Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* **6**, 637-645.
- Bode AM & Dong Z (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**, 793-805.

- Borresen-Dale AL (2003). TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* **21**, 292-300.
- Boyapati A, Wilson M, Yu J & Rundell K (2003). SV40 17KT antigen complements dnaj mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts. *Virology* **315**, 148-158.
- Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF & MacDonald IC (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* **60**, 2541-2546.
- Cardiff RD, Anver MR, Gusterson BA, Hennighausen L, Jensen RA, Merino MJ, Rehm S, Russo J, Tavassoli FA, Wakefield LM, Ward JM & Green JE (2000). The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* **19**, 968-988.
- Chang CC (2006). Recent translational research: stem cells as the roots of breast cancer. *Breast Cancer Res* **8**, 103.
- Chen W, Possemato R, Campbell KT, Plattner CA, Pallas DC & Hahn WC (2004). Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell* **5**, 127-136.
- Dean M, Fojo T & Bates S (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* **5**, 275-284.
- Deppert W, Gohler T, Koga H & Kim E (2000). Mutant p53: "gain of function" through perturbation of nuclear structure and function? *J Cell Biochem Suppl* **Suppl 35**, 115-122.
- Deppert W & Pates R (1979). Simian virus 40 specific proteins on surface of HeLa cells infected with adenovirus 2--SV40 hybrid virus Ad2+ND2. *Nature* **277**, 322-324.
- Done SJ, Eskandarian S, Bull S, Redston M & Andrulis IL (2001). p53 missense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* **93**, 700-704.
- Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF & Wicha MS (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* **36 Suppl 1**, 59-72.
- Dontu G, El-Ashry D & Wicha MS (2004). Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 193-197.
- Dumitrescu RG & Cotarla I (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* **9**, 208-221.
- El-Deiry WS (2003). The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* **22**, 7486-7495.
- Eliyahu D, Michalovitz D & Oren M (1985). Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* **316**, 158-160.
- Feinberg AP & Tycko B (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**, 143-153.
- Fidler IJ & Hart IR (1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* **217**, 998-1003.

- Ford JM (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res* **577**, 195-202.
- Fridman JS & Lowe SW (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030-9040.
- Gohler T, Reimann M, Cherny D, Walter K, Warnecke G, Kim E & Deppert W (2002). Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J Biol Chem* **277**, 41192-41203.
- Gruber AD & Pauli BU (1999). Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca²⁺-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res* **59**, 5488-5491.
- Hahn WC & Weinberg RA (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 331-341.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Harms K, Nozell S & Chen X (2004). The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **61**, 822-842.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramautd TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S & Tuveson DA (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469-483.
- Ho J & Benchimol S (2003). Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ* **10**, 404-408.
- Hoglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Sall T & Mitelman F (2002). Multivariate analysis of chromosomal imbalances in breast cancer delineates cytogenetic pathways and reveals complex relationships among imbalances. *Cancer Res* **62**, 2675-2680.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B & Harris CC (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.
- Ingvarsson S (2004). Genetics of breast cancer. *Drugs Today (Barc)* **40**, 991-1002.
- Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmuller L, Grosse F & Deppert W (1999). Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* **19**, 2155-2168.
- Jong K, Marchiori E, Meijer G, Vaart AV & Ylstra B (2004). Breakpoint identification and smoothing of array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics* **20**, 3636-3637.
- Kim E & Deppert W (2004). Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss. *J Cell Biochem* **93**, 878-886.
- Kleivi K, Diep CB, Pandis N, Heim S, Teixeira MR & Lothe RA (2005). TP53 mutations are associated with a particular pattern of genomic imbalances in breast carcinomas. *J Pathol* **207**, 14-19.
- Knudson AG, Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-823.

- Ko LJ & Prives C (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**, 1054-1072.
- Koga H & Deppert W (2000). Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245-->Ser) in vivo. *Oncogene* **19**, 4178-4183.
- Kops GJ, Weaver BA & Cleveland DW (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**, 773-785.
- Krepulat F, Lohler J, Heinlein C, Hermannstadter A, Tolstonog GV & Deppert W (2005). Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice. *Oncogene* **24**, 4645-4659.
- Kuperwasser C, Hurlbut GD, Kittrell FS, Dickinson ES, Laucirica R, Medina D, Naber SP & Jerry DJ (2000). Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *Am J Pathol* **157**, 2151-2159.
- Kwan KM (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* **32**, 49-62.
- Lacroix M & Leclercq G (2005). The "portrait" of hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **89**, 297-304.
- Lane DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- Lane DP & Crawford LV (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-263.
- Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK & Lozano G (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**, 861-872.
- Laptenko O & Prives C (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* **13**, 951-961.
- Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME & George DL (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* **6**, 443-450.
- Levine AJ, Hu W & Feng Z (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* **13**, 1027-1036.
- Li L & Naves WB (2006). Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* **66**, 4553-4557.
- Li X, Cowell JK & Sossey-Alaoui K (2004). CLCA2 tumour suppressor gene in 1p31 is epigenetically regulated in breast cancer. *Oncogene* **23**, 1474-1480.
- Linzer DI, Maltzman W & Levine AJ (1979). The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology* **98**, 308-318.
- Liu G & Chen X (2006). Regulation of the p53 transcriptional activity. *J Cell Biochem* **97**, 448-458.
- Liu G, Parant JM, Lang G, Chau P, Chavez-Reyes A, El-Naggar AK, Multani A, Chang S & Lozano G (2004). Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat Genet* **36**, 63-68.

- Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H & Borg A (2001). Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1215-1223.
- Maki H (2002). Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu Rev Genet* **36**, 279-303.
- Malkin D (1993). p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* **66**, 83-92.
- Massague J (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.
- Matas D, Milyavsky M, Shats I, Nissim L, Goldfinger N & Rotter V (2004). p53 is a regulator of macrophage differentiation. *Cell Death Differ* **11**, 458-467.
- Melchior F & Hengst L (2002). SUMO-1 and p53. *Cell Cycle* **1**, 245-249.
- Miled C, Pontoglio M, Garbay S, Yaniv M & Weitzman JB (2005). A genomic map of p53 binding sites identifies novel p53 targets involved in an apoptotic network. *Cancer Res* **65**, 5096-5104.
- Moll UM, Wolff S, Speidel D & Deppert W (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 631-636.
- Morris SM (2002). A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res* **511**, 45-62.
- Morrison SJ & Kimble J (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068-1074.
- Mullis KB & Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W & Grosse F (1996). p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* **85**, 1089-1099.
- Munot K, Bell SM, Lane S, Horgan K, Hanby AM & Speirs V (2006). Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer. *Hum Pathol* **37**, 989-999.
- Murphy KL & Rosen JM (2000). Mutant p53 and genomic instability in a transgenic mouse model of breast cancer. *Oncogene* **19**, 1045-1051.
- Nakamura Y (2004). Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Sci* **95**, 7-11.
- Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D & Jacks T (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**, 847-860.
- Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bieche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P & Borresen-Dale AL (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 1157-1167.

- Pandis N, Jin Y, Gorunova L, Petersson C, Bardi G, Idvall I, Johansson B, Ingvar C, Mandahl N, Mitelman F & et al. (1995). Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* **12**, 173-185.
- Pittius CW, Hennighausen L, Lee E, Westphal H, Nicols E, Vitale J & Gordon K (1988). A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5874-5878.
- Polyak K & Hu M (2005). Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**, 231-247.
- Quelle DE, Ashmun RA, Hannon GJ, Rehberger PA, Trono D, Richter KH, Walker C, Beach D, Sherr CJ & Serrano M (1995). Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene* **11**, 635-645.
- Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R & Jukkola A (2003). A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* **39**, 447-453.
- Ramel S, Sanchez CA, Schimke MK, Neshat K, Cross SM, Raskind WH & Reid BJ (1995). Inactivation of p53 and the development of tetraploidy in the elastase-SV40 T antigen transgenic mouse pancreas. *Pancreas* **11**, 213-222.
- Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW & Anderson SM (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 227-241.
- Robinson GW, McKnight RA, Smith GH & Hennighausen L (1995). Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation. *Development* **121**, 2079-2090.
- Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D & Russo IH (2005). The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* **7**, 131-142.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Schedin P (2006). Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nat Rev Cancer* **6**, 281-291.
- Schulze-Garg C, Lohler J, Gocht A & Deppert W (2000). A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. *Oncogene* **19**, 1028-1037.
- Sears LE, Moran LS, Kissinger C, Creasey T, Perry-O'Keefe H, Roskey M, Sutherland E & Slatko BE (1992). CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* **13**, 626-633.
- Shackney SE & Silverman JF (2003). Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol* **10**, 278-290.
- Sheng Q, Love TM & Schaffhausen B (2000). J domain-independent regulation of the Rb family by polyomavirus large T antigen. *J Virol* **74**, 5280-5290.
- Sherr CJ (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 731-737.

- Sigal A & Rotter V (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* **60**, 6788-6793.
- Silva J, Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Cantos B, Rodriguez R, Larrondo FJ, Provencio M, Espana P & Bonilla F (2003). Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms. *J Pathol* **199**, 289-297.
- Siveke JT & Schmid RM (2005). Chromosomal instability in mouse metastatic pancreatic cancer--it's Kras and Tp53 after all. *Cancer Cell* **7**, 405-407.
- Smalley M & Ashworth A (2003). Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer* **3**, 832-844.
- Smith CA, Pollice AA, Gu LP, Brown KA, Singh SG, Janocko LE, Johnson R, Julian T, Hyams D, Wolmark N, Sweeney L, Silverman JF & Shackney SE (2000). Correlations among p53, Her-2/neu, and ras overexpression and aneuploidy by multiparameter flow cytometry in human breast cancer: evidence for a common phenotypic evolutionary pattern in infiltrating ductal carcinomas. *Clin Cancer Res* **6**, 112-126.
- Smith KL & Robson ME (2006). Update on hereditary breast cancer. *Curr Oncol Rep* **8**, 14-21.
- Soussi T, Asselain B, Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M & Beroud C (2006a). Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin Cancer Res* **12**, 62-69.
- Soussi T & Beroud C (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **1**, 233-240.
- Soussi T, Ishioka C, Claustres M & Beroud C (2006b). Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer* **6**, 83-90.
- Soussi T & Lozano G (2005). p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 834-842.
- Strano S, Fontemaggi G, Costanzo A, Rizzo MG, Monti O, Baccarini A, Del Sal G, Levrero M, Sacchi A, Oren M & Blandino G (2002). Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J Biol Chem* **277**, 18817-18826.
- Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH & Itakura K (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6613-6617.
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y & Nakamura Y (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**, 42-49.
- Tzeng YJ, Guhl E, Graessmann M & Graessmann A (1993). Breast cancer formation in transgenic animals induced by the whey acidic protein SV40 T antigen (WAP-SV-T) hybrid gene. *Oncogene* **8**, 1965-1971.
- Varley JM (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* **21**, 313-320.
- Vogelstein B & Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-799.

- Vogelstein B, Lane D & Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Voorhoeve PM & Agami R (2003). Knockdown stands up. *Trends Biotechnol* **21**, 2-4.
- Vousden KH & Lu X (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594-604.
- Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P & King MC (2006). Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *Jama* **295**, 1379-1388.
- Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, Lee YL, Kuznetsov VA, Sung WK, Miller LD, Lim B, Liu ET, Yu Q, Ng HH & Ruan Y (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**, 207-219.
- Weinberg RA (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* **49**, 3713-3721.
- Weinberg RL, Freund SM, Veprintsev DB, Bycroft M & Fersht AR (2004). Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J Mol Biol* **342**, 801-811.
- Weisz L, Zalcenstein A, Stambolsky P, Cohen Y, Goldfinger N, Oren M & Rotter V (2004). Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. *Cancer Res* **64**, 8318-8327.
- Welm AL, Kim S, Welm BE & Bishop JM (2005). MET and MYC cooperate in mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4324-4329.
- Woodward WA, Chen MS, Behbod F & Rosen JM (2005). On mammary stem cells. *J Cell Sci* **118**, 3585-3594.
- Zalcenstein A, Stambolsky P, Weisz L, Muller M, Wallach D, Goncharov TM, Krammer PH, Rotter V & Oren M (2003). Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene* **22**, 5667-5676.
- Zerrahn J & Deppert W (1993). Analysis of simian virus 40 small t antigen-induced progression of rat F111 cells minimally transformed by large T antigen. *J Virol* **67**, 1555-1563.
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH & Levine AJ (2000). The transcriptional program following p53 activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**, 475-482.
- Zhou J, Ahn J, Wilson SH & Prives C (2001). A role for p53 in base excision repair. *Embo J* **20**, 914-923.

Danksagung

Herrn Prof. Deppert danke ich für die Möglichkeit, dieses spannende Thema in seiner Abteilung zu bearbeiten, für die Betreuung, die Unterstützung und die zahlreichen Diskussionen. Ein besonderes Dankeschön für das rasche Korrekturlesen dieser Arbeit!

Bei Herrn Prof. Lörz möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Löhler danke ich besonders für die Weitergabe seines scheinbar unendlich großen Wissens und für die Betreuung in allen pathologischen und immunhistologischen Gebieten.

Bei der Stiftung Krebsforschung International (KFI) möchte ich mich ganz herzlich für die großzügige finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums bedanken.

Frauke Krepulat möchte ich ganz herzlich für alle Arten der Unterstützung, auch dem Korrekturlesen der Arbeit danken; ein großer Dank geht auch an die zwei „fleißigen Bienchen“ Andrea Diesterbeck und Jasmin Oehlmann.

Bei Daniel Speidel bedanke ich mich unter anderem für die „abendliche Laborgesellschaft“, die produktiven Diskussionen, die Motivation sowie seine tatkräftige Hilfe im Labor und beim Korrigieren dieser Arbeit.

In besonderer Weise bin ich dankbar für die Freundschaft und die große Unterstützung von Andrea Hermannstädter, die auch noch gerade rechtzeitig aus dem Urlaub kam!

Auch Lars Tögel, Peter Pably, Heike Helmbold und Sathish Babu gebührt Dank für allerlei Hilfe, Freundschaft und Spaß im Labor. Rudolph Reimer danke ich herzlich für die Unterstützung in allen technischen Angelegenheiten, Martina Hintz-Malchow für das „Rundumprogramm“, auch für das rasante Korrekturlesen dieser Arbeit. Genrich Tolstonog möchte ich für die Hilfe bei der Auswertung der Array-Daten danken.

Allen Kollegen des HPI, die mir ein freundliches und fruchtbares Arbeitsumfeld geschaffen haben, danke ich herzlich, vor allem aber auch Silvia Wegerich, die die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt hat, sowie den Tierpflegern Hasso Münd, Beate Miksche, Anke Dorendorf und Matthias Timmermann.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden – außerhalb des Labors - bedanken. Vor allem bei meiner Mama, die mir diesen Berufsweg ermöglicht hat, immer an mich geglaubt hat und für mich da war; und vor allem die letzten Jahre trotz allem so tapfer gemeistert hat. Auch meinem Bruder Markus, der immer für mich da war und mich in allem bestärkt und unterstützt hat, möchte ich von Herzen danken. Derjenige, der alle Hochs und Tiefs des Laboralltags „miterleben durfte“ und auch in allen sonstigen Situationen immer für mich da war und mir Halt gegeben hat, war Jörg. Danke für alles!