

Identifikation von disseminierungsrelevanten Genen und Genexpressionsmustern beim primären Mammakarzinom

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ute Martina Wölfle
aus Steinach

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. med. K. PANTEL

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. J. OLCESE

Tag der Disputation: 25. April 2003

Hamburg, den 10. April 2003



A handwritten signature in black ink, consisting of a series of connected loops and a long horizontal stroke at the end.

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V-VI
1. Einleitung	1
1.1. Das humane Mammakarzinom	1
1.1.1. Histopathologische Charakterisierung	1
1.1.2. Therapie des Mammakarzinoms	3
1.2. Metastasierung epithelialer Tumore	5
1.2.1. Die metastatische Kaskade	5
1.2.2. Mechanismus der organspezifischen Metastasierung	6
1.3. Minimale residuelle Krebserkrankung	9
1.3.1. Nachweis und Relevanz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	10
1.3.2. Phänotyp der disseminierten Tumorzellen	12
1.3.3. Genotyp der disseminierten Tumorzellen	14
1.4. Nutzen der Mikroarraytechnik für die Tumorbilogie und Therapie	15
1.5. Aufgabenstellung	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Mammakarzinomzelllinie	19
2.1.2. Patientenmaterial	19
2.1.2.1. Tumorgewebe für die Expressionsstudie	19
2.1.2.2. Tumorgewebe des Mikrometastasenarrays	21
2.1.2.3. Tumorgewebe des Mammakarzinomprognosearrays	21
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3.1. Reagenzien	22
2.1.3.2. Antikörper	23
2.1.3.3. Enzyme	23
2.1.3.4. PCR-Primer	23
2.1.3.5. Kits	24
2.1.3.6. Radioaktives Material	24
2.1.3.7. Puffer und Lösungen	24
2.1.3.8. Sonstiges Material	25
2.1.3.9. Geräte	25
2.1.3.10. Softwareprogramme	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Zellkultur	26
2.2.2. Isolierung mikrometastatischer Tumorzellen aus dem Knochenmark	26
2.2.3. APAAP Färbung zur Detektion von zytokeratinpositiven Zellen	27
2.2.4. Isolierung und Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese	28
2.2.5. Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäure (OD-Messung)	29
2.2.6. cDNA-Expressionsarray	29
2.2.6.1. Gesamt-RNA-Isolation aus Kryogewebe	29
2.2.6.2. cDNA-Synthese	30
2.2.6.3. Hybridisierung der cDNA-Arrays	30
2.2.6.4. Datenanalyse	31
2.2.7. Northern-Blot zur Verifizierung der cDNA-Array-Daten	32
2.2.7.1. Präparation spezifischer Northern-Blot-Sonden mit der Polymerase-Kettreaktion (PCR)	32
2.2.7.2. Radioaktive Markierung von Sonden durch PCR und Nicktranslation	33
2.2.7.3. Auftrennung der RNA in einem denaturierenden Agarosegel	34
2.2.7.4. Hybridisierung des Northern-Blots	35

2.2.8. FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)	35
2.2.9 Array-CGH	37
2.2.9.1. Isolierung von DNA aus Paraffingewebe	37
2.2.9.2. Hybridisierung der Array-CGH	38
2.2.10. Immunhistochemische Färbung (IHC) von Paraffinschnitten	39
2.2.11. Hämalaun/Eosin-Färbung von Paraffinschnitten	39
2.2.12. Herstellung von Mikroarrays	40
2.2.13. Statistische Auswertung	41
2.2.13.1. Chi-square-Test	41
2.2.13.2. Univariate Analyse	41
2.2.13.3. Multivariate Analyse	41
3. Ergebnisse	42
3.1. Methodische Aspekte	42
3.1.1. Nachweis von hämatogen bzw. lymphogen disseminierten Tumorzellen	42
3.1.2. RNA-Isolation aus Gewebeschnitten	43
3.1.3. Reproduzierbarkeit und Plausibilitätskontrollen	45
3.1.4. Normalisierung und Ermittlung differenziell exprimierter Gene zwischen den Mammakarzinomproben	47
3.2. Genexpressionsanalysen an primären Mammakarzinomen	48
3.2.1. Differenziell exprimierte Gene in der KM-positiven im Vergleich zur KM-negativen Gruppe	48
3.2.2. Differenziell exprimierte Gene zwischen histopathologisch normalem Brustgewebe und Mammakarzinomgewebe	54
3.2.3. Differenziell exprimierte Gene zwischen der LK-positiven und der LK-negativen Gruppe	55
3.3. Verifizierung der differenziell exprimierten Gene	57
3.4. Validierung der differenziell exprimierten Gene	60
3.5. Analysen von Mammakarzinomzellen auf genomischer Ebene	67
3.5.1. Versuchsaufbau und Plausibilitätskontrollen	67
3.5.2. Ergebnisse der Array-CGH	71
4. Diskussion	74
4.1. Methodische Aspekte der Genexpressionsanalyse mit cDNA-Arrays	74
4.2. Disseminierungsrelevante Genexpression und Regulationwege	76
4.3. Disseminierungsrelevante genomische Aberrationen	83
4.5. Neues Modell der Tumordisseminierung	85
4.6. Ausblick	86
5. Literatur	88
6. Anhang	96
7. Abkürzungen und Glossar	109
7.1. Abkürzungen	109
7.2. Glossar	111
Danksagung	114

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung in der weiblichen Bevölkerung. Trotz operativer Entfernung des Primärtumors kommt es bei vielen Mammakarzinompatientinnen im weiteren Krankheitsverlauf zu einem Tumorrezidiv, das wahrscheinlich auf eine frühzeitige Tumorzell dissemination zurückzuführen ist. Mit klinisch-radiologischen Untersuchungen können einzelne disseminierte Tumorzellen nicht detektiert werden. Allerdings kann diese klinisch okkulte Disseminierung mit sensitiven immunzytochemischen und molekularen Methoden erfasst werden. Dabei zeigte sich, dass das Knochenmark (KM) ein Organ darstellt, das bevorzugt von disseminierten Tumorzellen besiedelt wird. Das Vorhandensein dieser Zellen im KM ist darüberhinaus mit einer schlechteren Prognose der Patientinnen korreliert (Braun et al., 2000). Neben dieser direkten hämatogenen Tumorzellaussaat können Tumorzellen auch lymphogen in die regionalen Lymphknoten (LK) streuen und von dort über die Blutbahn in Sekundärorgane gelangen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Genexpressionsmustern des primären Mammakarzinoms, die entweder für die hämatogene Disseminierung ins KM oder die lymphogene Metastasierung in die regionalen LK verantwortlich sind. Mit cDNA-Arrays wurde daher in dieser Arbeit das Transkriptom von primären Mammakarzinomen in Korrelation zum KM- und zum LK-Status vergleichend analysiert. Die für diese Analyse ausgewählten Patientinnen zeichneten sich durch kleine Tumoren ohne solide Metastasen aus (pT₁₋₂M0), d.h. es wurde der Beginn der hämatogenen bzw. lymphogenen Disseminierung untersucht. Das Genexpressionsmuster von Primärtumoren, das mit der hämatogenen Disseminierung von Tumorzellen assoziiert war, unterschied sich dabei beträchtlich von demjenigen Muster, das mit der lymphogenen Tumormetastasierung korrelierte. Die hämatogene Streuung von Tumorzellen scheint daher einen anderen Adaptationsprozess zu erfordern als die Metastasierung über das Lymphsystem. Dieser Adaptationsprozess schien bei der lymphogenen Metastasierung im Vergleich zu der hämatogenen Disseminierung allerdings weniger stark ausgeprägt zu sein. Bei der lymphogenen Disseminierung wurden nur etwa halb so viele differenziell exprimierte Gene identifiziert und diese Gene konnten nicht eindeutig einem Reaktionsweg oder einer größeren funktionellen Gruppe zugeordnet werden. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur die hämatogene Disseminierung weiter analysiert.

Allgemein zeigte sich, dass die hämatogene Disseminierung ein selektiver, kontrollierter Prozess ist, der hauptsächlich durch eine verminderte Genexpression determiniert wird. Dieses Ergebnis korreliert mit dem kürzlich veröffentlichten Konzept, wonach das Ausschalten mehrerer Gene (z.B. durch transkriptionelle Repressoren) die Metastasierung deutlich fördert (S. Varambally et al., 2002).

Die KM-positive im Vergleich zur KM-negative Gruppe wies eine differenzielle Expression mehrerer Gene auf, die in den Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix (n= 9), in die Zytoskelettplastizität (n=10) und in Signaltransduktionswege (n= 34) involviert sind.

Einige bedeutende Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurden mit einem Mikrometastasenarray bestehend aus 83 auswertbaren Primärtumoren von Patientinnen mit bekanntem KM-Status auf Proteinebene validiert. Dabei bestätigte sich, dass z.B. die herunterregulierte Genexpression der luminalen Zytokeratine (CK-8,-18 und-19) mögliche Indikatoren einer frühzeitigen hämatogenen Streuung ins KM sind. Zytokeratine stellen die strukturellen Bausteine des Zytoskelettes normaler und maligner Epithelzellen dar. Eine verminderte Zytokeratinexpression in Tumorzellen könnte den relativ starren epithelialen Zellen mehr Beweglichkeit verleihen, so dass ihre Wanderung im Blutstrom bzw. ihr Eindringen in ein Organparenchym erleichtert wird. Eine reduzierte Proteinexpression von CK-18 aber nicht von CK-8 oder -19 war auch signifikant mit der Entwicklung distanter Metastasen und dem tumorassoziierten Tod der Brustkrebspatientinnen korreliert. Dieses Ergebnis ergab sich aus den immunhistochemischen Färbungen eines umfangreichen Gewebearrays mit 650 Brusttumorproben und einer klinischen Nachbeobachtung der operierten Patientinnen von 160 Monaten. Die vorliegende Arbeit zeigt somit erstmals, dass humane Tumorzellen die für die Metastasierung relevanten genetischen Veränderungen frühzeitig in der Tumorentwicklung erwerben und dass Zytokeratine eine kritische Rolle als Metastasierungssuppressoren bei Brustkrebs zu spielen scheinen. Während CK-19 und -8 überwiegend in die Disseminierung von Tumorzellen zu Sekundärorganen involviert sind, hemmt CK-18 sowohl die Disseminierung als auch das Auswachsen der disseminierten Zellen zu manifesten Metastasen.

Darüberhinaus konnte durch komplexe molekarzytogenetische Untersuchungen mittels der sogenannten Array-CGH-Technik gezeigt werden, dass der mit der hämatogenen Disseminierung assoziierte Phänotyp primärer Mammakarzinome nicht vornehmlich genomisch prädisponiert ist, sondern überwiegend transkriptionell reguliert wird. Neben der Identifizierung möglicher Markerproteine (CK-8, 18 und 19 sowie HIF-1 α) für die hämatogene Disseminierung beim primären Mammakarzinom wurde in dieser Arbeit insbesondere auch die Biologie des Disseminierungsprozesses untersucht. Hierbei scheint für die hämatogene Disseminierung der RAS- und HIF-1 α -Reaktionsweg bedeutsam zu sein. Durch die Identifikation solcher Signalwege, die möglicherweise in die Tumorzelldisseminierung involviert sind, könnte die Entwicklung effizienterer anti-metastatischer Behandlungsmethoden (z.B. Antikörpertherapien und Therapien mit Tyrosinkinaseinhibitoren) ermöglicht werden.

1. Einleitung

1.1. Das humane Mammakarzinom

Das Mammakarzinom (Brustkrebs) ist mit 26% aller malignen Neuerkrankungen die häufigste Krebserkrankung in der weiblichen Bevölkerung. Etwa jede 10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom und rund ein Drittel der Patientinnen wird daran versterben. Allein in der Europäischen Union versterben etwa 70000 Frauen an einem Mammakarzinom, dazu kommen im gleichen Zeitraum mehr als eine Viertelmillion Neuerkrankungen (Robert-Koch-Institut, <http://www.rki.de>).

1.1.1. Histopathologische Charakterisierung

Unter dem Sammelbegriff Mammakarzinom werden diejenigen bösartigen Tumore zusammengefasst, die von den Epithelien ausgehen und Merkmale von Milchgängen (duktale Karzinome) oder von lobulären Drüsenläppchen (lobuläre Karzinome) besitzen (Abb. 1.1). Bei 85% der Fälle handelt es sich um duktales Karzinome. Die Tumorzellen breiten sich dabei zunächst nur innerhalb der Milchgänge und Lläppchen aus und wachsen nicht in das Nachbargewebe ein. Wenn diese *in-situ* Karzinome die Basalmembran der Milchgänge zerstören und in das angrenzende Stroma, später auch in das Lymphsystem und die Blutgefäße, einwandern, spricht man von einem invasiven Karzinom. Das lobuläre Karzinom *in situ* (LCIS) geht seltener in ein invasives Karzinom über als das duktales Karzinom *in situ* (DCIS) und ist deshalb mit einem besseren Krankheitsverlauf assoziiert.

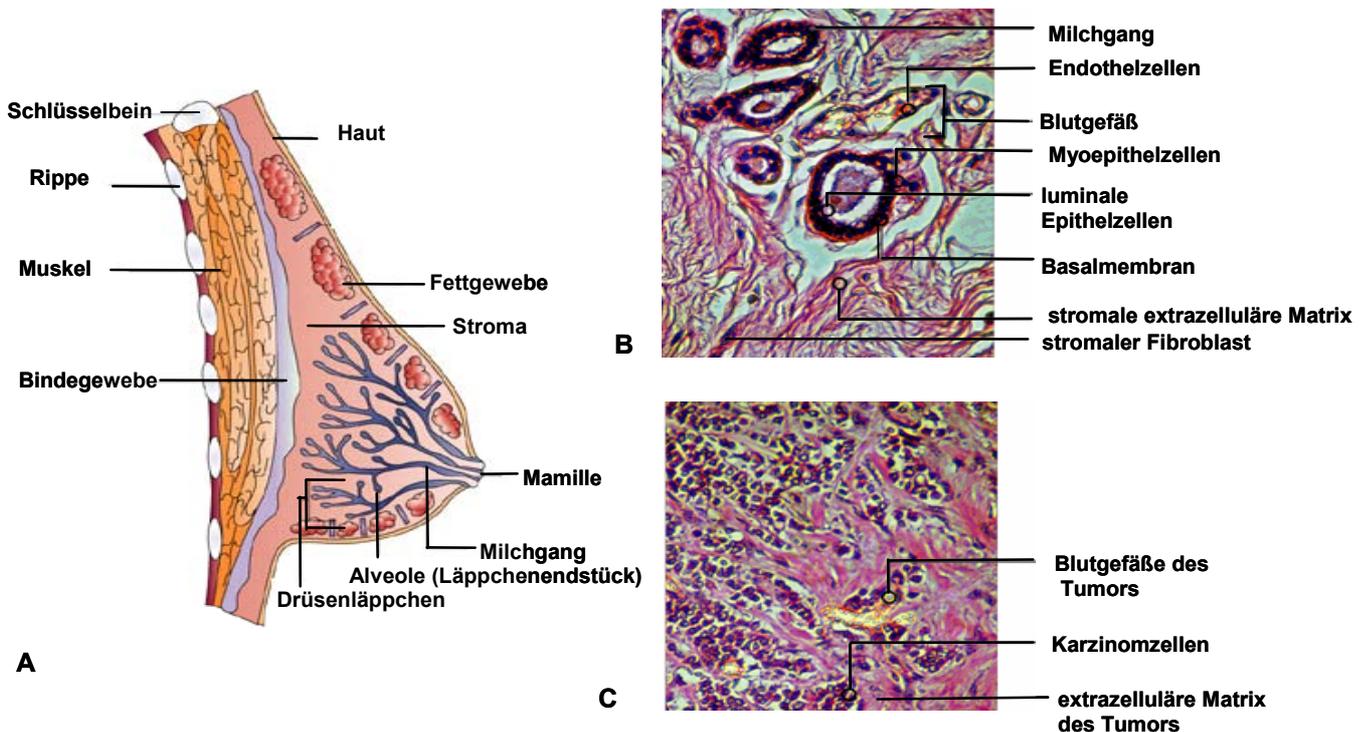


Abbildung 1.1 Anatomischer Aufbau der Brustdrüse und histopathologische Darstellung von normalem Brustgewebe und lobulärem Mammakarzinomgewebe. (A) Jede Brustdrüse besitzt zwischen 15-20 Drüsenläppchen, die über mehrere Milchgänge in die Mamille münden. (B) Hämalaun-Eosin gefärbtes, in Paraffin eingebettetes normales Brustgewebe, das eine geordnete Struktur besitzt. Die Milchgänge sind von luminalen Epithelzellen, die für die Milchproduktion verantwortlich sind, ausgekleidet und werden von kontraktiven Myoepithelien umgeben. Beide Zellschichten sind von einer Basalmembran umschlossen und in das Stroma eingebettet, wobei stromale Fibroblasten eine collagenhaltige extrazelluläre Matrix (ECM) sezernieren. Alle Blutgefäße sind zentral lokalisiert. (C) Hämalaun-Eosin gefärbtes, in Paraffin eingebettetes lobuläres Mammakarzinomgewebe, das eine unstrukturiertere Anordnung zeigt als normales Brustgewebe: Das Karzinom wird von kleinen Blutgefäßen versorgt und die Karzinomzellen vermischen sich mit den Stromazellen (Fibroblasten, Immunzellen und Fettzellen). (modifiziert nach Ali and Coombes, 2002; Bissell and Radisky, 2001).

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach der pathologischen TNM-Klassifikation (Staging) und der Bestimmung des Differenzierungsgrades (Grading). Die TNM-Klassifikation gibt gemäß der Internationalen Union gegen Krebs (UICC) die Tumorgroße (T), den Status der regionalen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose an. Die pathologischen Charakteristika der Tumorgroße und des Lymphknotenstatus, die nach der Operation bestimmt werden, besitzen die Bezeichnung pT und pN.

PTis: Carcinoma in situ

pT1: Tumorgroße kleiner als 2 cm im Durchmesser

pT2: Tumorgroße zwischen 2 und 5 cm im Durchmesser

pT3: Tumorgroße übersteigt 5 cm im Durchmesser

pT4: Tumor jeder Größe mit infiltrierter Haut oder Thoraxwand

N0/N+: Lymphknotenstatus (tumorfrei/mit nachgewiesenen Tumorzellen)

M0/M+: Fernmetastasen (nicht vorhanden/vorhanden)

Der Differenzierungsgrad (G) erfasst verschiedene histologische und zytologische Merkmale und wird in drei Differenzierungsstufen angegeben. G1 stellt dabei ein gut differenziertes, G2 ein mäßig differenziertes und G3 ein schlecht differenziertes Karzinom dar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kriterien zur Bestimmung des Differenzierungsgrades (Zellarrangement, Kernpleomorphie und Mitosezahl) wurden von Bloom und Richardson beschrieben (Bloom and Richardson, 1957).

1.1.2. Therapie des Mammakarzinoms

Trotz Resektion des Primärtumors kommt es bei rund 50% aller Mammakarzinompatientinnen im weiteren Krankheitsverlauf zu einem Tumorrezidiv (Di Pietro et al., 1976). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf eine frühzeitige Tumorzell dissemination zurückzuführen, die der initialen klinisch-radiologischen Tumordetektion entgangen ist. Beim Mammakarzinom handelt es sich somit um eine systemische Erkrankung, bei der die Tumorzell dissemination die Prognose und Überlebenszeit der betroffenen Patientinnen bestimmt (Braun et al., 2000b; Diel et al., 1996; Mansi et al., 1999; Solomayer et al., 2001). Deshalb wurde die operative Radikalität in den letzten Jahrzehnten reduziert und parallel dazu die medikamentöse systemische Therapie intensiviert. Prospektive randomisierte Studien zeigten, dass durch eine adjuvante (operationsbegleitende) Chemotherapie sowohl das krankheitsfreie Intervall als auch das Gesamtüberleben verbessert werden kann (Cole et al., 2001).

Mammakarzinompatientinnen mit metastasenfremden Lymphknoten (LK-negativ) besitzen ein 30%iges Risiko ein Rezidiv zu entwickeln (Clark and McGuire, 1988; Overgaard et al. 1997). Traditionelle histomorphologische und klinische Faktoren wie das Alter der Patientin, die Tumorgröße, der Differenzierungsgrad und der Hormonrezeptorstatus werden verwendet, um LK-negative Patientinnen zu identifizieren, die von einer adjuvanten systemischen Therapie profitieren könnten (Harbeck et al., 1998). Nach der im Jahre 2001 stattgefundenen Siebten St. Gallen Konsensuskonferenz zur adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms werden LK-negative Patientinnen in eine Niedrigrisikogruppe (Tumor kleiner als 2 cm, Differenzierungsgrad 1, östrogenrezeptorpositiv, Alter über 35 Jahre), die keine Chemotherapie erhalten sollte, und eine Hochrisikogruppe (Tumor größer als 2 cm, Differenzierungsgrad 2-3, östrogenrezeptornegativ, Alter unter 35 Jahre), die eine Chemotherapie erhalten sollte, eingeteilt (Goldhirsch et al., 2001). Die Niedrigrisikogruppe umfasst etwa 10% der Patientinnen, so dass sich 90% der LK-negativen Patientinnen nach Empfehlung der St. Gallen Konferenz einer Chemotherapie unterziehen sollten. Von dieser Therapie profitieren allerdings nur etwa 8% der Patientinnen, während 25% erfolglos und 67% unnötig behandelt werden. Die allein auf den bestehenden prognostischen Faktoren

basierende Therapieentscheidung resultiert somit oft in einer „Übertherapierung“ der Patientinnen. Da eine derartige Therapie gewöhnlich von belastenden Nebenwirkungen begleitet wird, werden zusätzliche prognostische Marker benötigt, um Risikopatientinnen besser identifizieren zu können und um einen individuellen Ansatz der adjuvanten systemischen Therapie zu finden. Alle bislang in Einzeluntersuchungen analysierten Faktoren, z.B. der Wachstumsfaktorrezeptor ERBB-2 (HER-2/NEU), der Proliferationsmarker Ki-67 oder der mit der Invasion und Metastasierung verbundene Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und sein Inhibitor (PAI-1; Harbeck et al., 1998), reichen nicht aus, um den individuellen Krankheitsverlauf (= prognostische Bedeutung) und das Ansprechen auf bestimmte medikamentöse Therapien (= prädiktive Bedeutung) zuverlässig vorherzusagen.

Der wichtigste traditionelle Prognosefaktor bei Mammakarzinompatientinnen ist der LK-Status. Das Vorhandensein von Tumorzellen in axillären LK markiert den Beginn eines systemischen Krankheitsverlaufes, der in 60% der Fälle zu einem Rezidiv führt (De Vita, 1989; Overgaard et al., 1997). Zur Standardoperation beim Mammakarzinom gehört deshalb nach wie vor die Entfernung der LK aus der Achselhöhle, um die Anzahl der befallenen LK zu bestimmen.

Mammakarzinompatientinnen mit manifesten Fernmetastasen können grundsätzlich nicht mehr geheilt werden; die durchgeführten Therapien dienen nur der Lebensverlängerung oder der Verbesserung der Lebensqualität (Chambers et al., 2002). Mit einem Anteil von 70% treten unter den Fernmetastasen am häufigsten Knochenmetastasen auf, die sich bevorzugt im stark vaskulierten roten Knochenmark (KM) des Beckens, der Wirbelkörper und der Schädelkalotte ansiedeln. Des Weiteren metastasiert das Mammakarzinom häufig in die Lunge (60%) und die Leber (50%) und selten in das Gehirn.

Beim in das KM metastasierten Mammakarzinom wird eine Therapie mit Biphosphaten empfohlen, die mit hoher Affinität an die mineralisierte Knochenoberfläche binden und somit den osteoklastischen Knochenabbau, der von den ins KM metastasierten Tumorzellen ausgelöst wird, verhindern. Auf diese Weise kann den Patientinnen durch Linderung der Knochenschmerzen eine bessere Lebensqualität geboten werden (Paterson, 2002).

Beim ERBB-2 (HER-2/NEU)-überexprimierenden metastasierten Mammakarzinom kann durch die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin) gegen den Wachstumsfaktorrezeptor ERBB-2 in Kombination mit einer Chemotherapie das Leben um durchschnittlich 5 Monate verlängert werden (Vogel et al., 2002).

1.2. Metastasierung epithelialer Tumore

1.2.1. Die metastatische Kaskade

Die Fähigkeit von Karzinomzellen, in sekundären Organen Metastasen zu bilden, ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess (Abb. 1.2).

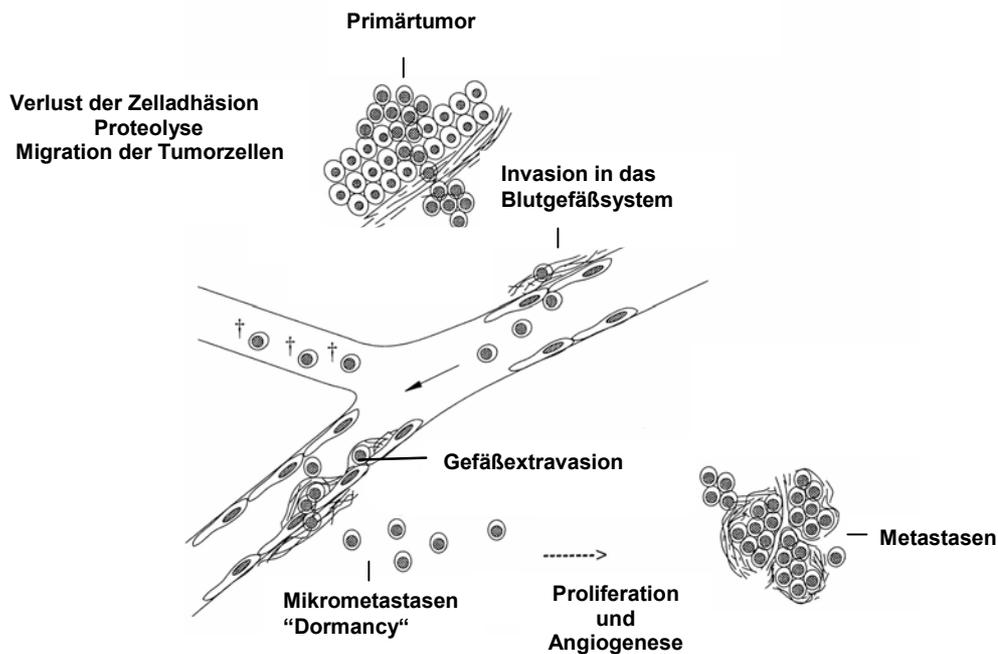


Abb. 1.2 Schema der Tumorzellmetastasierung. Die Disseminierung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor in das umliegende Stroma wird durch proteolytische Enzyme und den Verlust von Zell-Zell-Kontakten ermöglicht. Nach der Invasion besonders motiler Tumorzellen durch die Basalmembran in das Stroma des Primärtumors erhalten die Tumorzellen Zugang zu dem Blutgefäßsystem. Die im Blut zirkulierenden Tumorzellen werden entweder apoptotisch († = apoptotische Tumorzellen) oder können nach Gefäßextravasation und Einwanderung in das Organparenchym Mikrometastasen bilden. Nach der Proliferation dieser mikrometastatischen Tumorzellen und der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) können klinisch manifeste Fernmetastasen entstehen. (modifiziert nach Pantel et al., 1999)

Fidler und Hart haben die genetische Variabilität in Primärtumoren eingehend untersucht und konnten zeigen, dass sich bereits in der frühen Wachstumsperiode eines Tumors Zellklone mit unterschiedlichem metastatischem Potential entwickeln (Fidler and Hart, 1982). In einem ersten Schritt lösen sich Tumorzellen von dem Zellverband des Primärtumors ab und verschaffen sich nach Invasion und Penetration des stromalen Gewebes Zugang zum

Lymph- oder Blutgefäßsystem (Hart and Saini, 1992). Diese Prozesse werden durch die Produktion proteolytischer Enzyme (z.B. Matrix-Metalloproteinasen; Nabeshima et al., 2002) in den Tumor- oder Stromazellen und durch den Verlust von Zelladhäsionsmolekülen (z.B. E-Cadherin; Frixen et al., 1991; Pierceall et al., 1995) auf den Tumorzellen ermöglicht. Im Primärtumor können Blutgefäße auch neu gebildet werden (Angiogenese), über die die Tumorzellen den Primärtumor verlassen und in den Körperblutkreislauf eintreten können. Darüber hinaus können Tumorzellen das Blutkreislaufsystem indirekt über das Lymphsystem erreichen. Die im Blut zirkulierenden Tumorzellen werden mechanischen Scherkräften und immunologischen Interaktionen mit Lymphozyten oder natürlichen Killerzellen ausgesetzt, so dass wahrscheinlich nur wenige Tumorzellen (weniger als ein Prozent) diese Phase überleben (Liotta and Kohn, 1990). Möglicherweise besitzen Tumorzellen innerhalb von Aggregaten einen Überlebensvorteil im Blut, da somit einzelne Zellen im Inneren dieser Aggregate vor mechanischen Scherkräften im Blutstrom oder vor Anoxie geschützt sind (Mundy, 1997). Diese Tumorzellen können nach Gefäßextravasion (Wiederaustritt von Tumorzellen aus dem Blut in das Gewebe) und Einwanderung in das Organparenchym Fernmetastasen bilden. Es wird angenommen, dass einzelne isolierte Tumorzellen als Mikrometastasen primär noch nicht autonom proliferieren, sondern sich in einer Art Latenzzustand befinden, der im englischen Sprachraum als „Dormancy“ bezeichnet wird. In diesem Latenzzustand können die Tumorzellen über viele Jahre verharren (siehe Kap. 1.3.2.).

Bis jetzt wird die Frage nach dem Selektionsprozess bei der Metastasierung noch kontrovers diskutiert. Cameron et al. gehen davon aus, dass sich die in Sekundärorganen nachweisbaren, disseminierten Tumorzellen von dem Primärtumor abgeschilfert haben und die Selektion erst nach der Extravasion stattfindet (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 von dem Primärtumor ablösen (Bernards and Weinberg, 2002; Fidler and Hart, 1982).

1.2.2. Mechanismen der organspezifischen Metastasierung

Ein weiteres bis heute noch nicht aufgeklärtes Phänomen der Metastasierung stellt der sogenannte Organotropismus dar, d.h. die seit langem bekannte Beobachtung, dass Tumore epithelialen Ursprungs dazu neigen, in bestimmten Organen Metastasen zu bilden, während andere Gewebe nur selten besiedelt werden (Paget, 1889). Verschiedene Theorien wurden entworfen, um dieses Phänomen zu erklären. Gemäß der bereits im Jahre 1889 von Paget entwickelten „Seed and Soil“ – Hypothese hängt das Wachstum von Metastasen hauptsächlich von den Wechselwirkungen bestimmter Tumorzellen („Seed“) mit dem jeweiligen

Organmilieu („Soil“, z.B. Anwesenheit von Wachstums- oder Hemmfaktoren) ab (Paget, 1889). Nur wenn sich Tumorzellen in einer für ihr Wachstum geeigneten Umgebung befinden, kann es zur Proliferation und damit zur Ausbildung klinisch relevanter Metastasen kommen. Ein Beispiel für diese Hypothese wird in Abb. 1.3 für den vor einigen Jahren beschriebenen Faktor PTHrP (Parathyroid Hormone related Protein) gezeigt. PTHrP spielt bei der hämatogenen Metastasierung von Mammakarzinomzellen in das KM eine bedeutende Rolle (Mundy, 1991; Yoneda et al., 1994). Mammakarzinomzellen, die in das KM metastasiert sind, weisen eine deutlich höhere PTHrP-Expression auf als in andere Sekundärorgane metastasierte Tumorzellen (Guise et al., 1996). Des Weiteren sind primäre Mammakarzinome mit nachgewiesenen Knochenmetastasen zu über 90% PTHrP-positiv, wohingegen Primärtumore mit einer Metastasierung in andere Sekundärorgane nur zu 17% PTHrP-positiv sind (Guise, 1997).

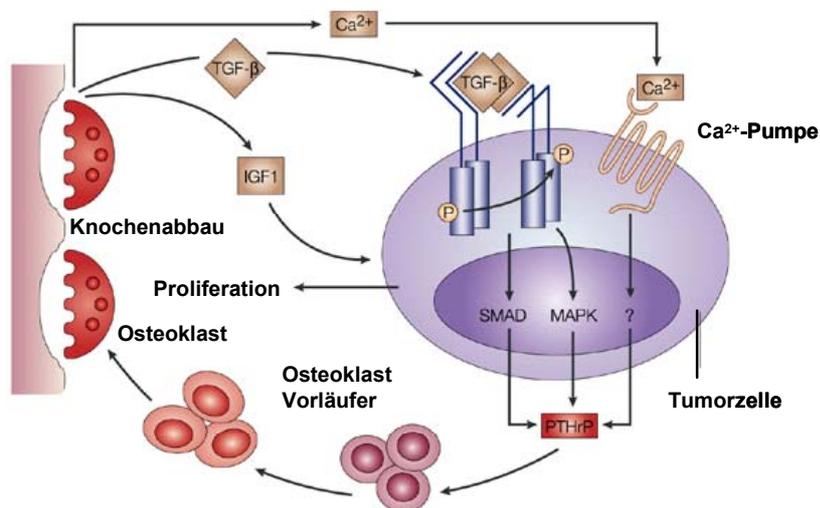


Abb. 1.3 Kaskade der osteolytischen Metastasierung. PTHrP (Parathyroid Hormone related Protein), das von den in das KM metastasierten Tumorzellen exprimiert wird, aktiviert Osteoklasten, die den Knochen abbauen. Durch diesen Knochenabbau werden bestimmte Wachstumsfaktoren (z.B. TGF-β, Transforming Growth Factor beta, und IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1) freigesetzt, die an die entsprechenden Rezeptoren auf den disseminierten Tumorzellen binden können. Dadurch wird Zellproliferation sowie die erneute PTHrP-Expression über verschiedene Reaktionswege induziert, so dass es zu einem weiteren Knochenverlust (Osteolyse) kommt (Mundy, 2002; Yoneda, 2000). Die daran beteiligten Reaktionswege laufen über SMAD (zytoplasmatische Mediatoren der meisten TGF-β-Signale) oder MAPKinasen (mitogenaktivierte Proteinkinasen). Durch den Knochenabbau wird außerdem Kalzium extrazellulär freigesetzt, wodurch die Kalziumpumpe der Tumorzellen aktiviert wird. Auf diese Weise entstehen ebenfalls Proliferationssignale in der Tumorzelle. (modifiziert nach Mundy, 2002)

Mit der „Seed and Soil“-Hypothese allein lässt sich allerdings das Metastasierungsverhalten humaner Tumore nicht vollständig erklären.

Ewing schlug deshalb schon im Jahre 1928 vor, die vaskulären Verbindungen zwischen Primär- und Sekundärtumor stärker zu berücksichtigen (Ewing, 1928). Dieser Vorschlag

beruht auf den Beobachtungen, dass im frühen Stadium der Tumorausbreitung die nahe gelegenen LK zuerst befallen werden. Des Weiteren bleiben die Tumorzellen einzeln oder möglicherweise auch als Emboli zusammen mit Lymphozyten und Blutplättchen häufig im Kapillarsystem von Leber und Lunge haften, den ersten „Filterorganen“, die vom großen bzw. kleinen Blutkreislauf versorgt werden. Metastasen bilden sich somit mit größerer Wahrscheinlichkeit in anatomisch benachbarten Organen mit vaskulärer Verbindung zu dem Primärtumor (Ewing, 1928).

Eine weitere Hypothese zur organspezifischen Metastasierung von Karzinomen basiert auf der Annahme, dass Tumorzellen bei ihrer Zielorganbestimmung („Homing“) zirkulierende Lymphozyten imitieren. Es wird angenommen, dass sie, ähnlich wie die Lymphozyten, mit organspezifischen Adhäsionsmolekülen auf der luminalen Oberfläche mikrovaskulärer Endothelzellen interagieren, wie z.B. dem „Homing“-Rezeptor CD44, den Selektinen oder Integrinen (Hynes, 1992; Pauli and Lee, 1988).

Außerdem wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass Chemokine als chemische Lockstoffe für das „Homing“ von Tumorzellen zu bestimmten Organen verantwortlich sein und somit eine organspezifische Metastasierung ermöglichen könnten. Chemokine stellen eine Familie von kleinen zytokinähnlichen Proteinen dar, die durch die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren Veränderungen im Zytoskelett, eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen und eine gerichtete Migration der Lymphozyten induzieren (Wang et al., 1998). Müller et al. konnten in einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigen, dass Mammakarzinomzellen die Chemokinrezeptoren CXCR-4 und CCR-7 in hoher Konzentration exprimieren. Die spezifischen Liganden CXCL-12 und CCL-21 für diese Rezeptoren werden in den Organen, die bevorzugt von metastasierenden Mammakarzinomen kolonisiert werden (den LK, der Lunge, der Leber und dem KM), in erhöhter Konzentration exprimiert. Dies deutet auf eine bedeutende Rolle der Chemoattraktion bei dem Prozess der organspezifischen Metastasierung von Tumoren hin. In Tiermodellen konnte durch die antikörperinduzierte Neutralisierung der CXCL-12/CXCR-4-Interaktion die Fähigkeit von Mammakarzinomzellen, in regionalen LK und der Lunge Metastasen zu bilden, signifikant beeinflusst werden (Chambers et al., 2002; Muller et al., 2001).

Tumorzellen anderer epithelialer Primärtumore (z.B. Kolonkarzinome), die über das Blut in das KM gelangen, dort aber nur selten Metastasen bilden, werden möglicherweise im KM nicht stimuliert und bleiben daher klinisch nicht nachweisbar. Die disseminierten Tumorzellen können vom KM jedoch in andere Organe wie Leber und Lunge wandern, wo bessere Wachstumsbedingungen für sie vorliegen. Das KM scheint daher ein ideales Indikatororgan für die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im ganzen Körper zu sein.

1.3. Minimale residuelle Krebserkrankung

Disseminierte Tumorzellen sind Einzelzellen oder kleine Aggregate, die in Sekundärorgane (z.B. das KM) eingewandert, aber noch nicht zu Metastasen ausgewachsen sind (Pantel et al., 1993). Da diese Tumorzeldisseminierung vor der operativen Entfernung des Primärtumors schon erfolgt sein kann, jedoch durch klinisch radiologische Untersuchungen nicht zu detektieren ist, spricht man auch von einer minimalen residuellen Erkrankung (minimal residual disease = MRD). Die MRD wurde das erste Mal 1981 beschrieben (Dearnaley et al., 1981). Untersuchungen an Biopsien des Knochenmarks ergaben, dass disseminierte Tumorzellen größtenteils am Interstitium außerhalb sinusoidaler Gefäße liegen und somit auch die Extravasion, einen der letzten Schritte der Metastasierungskaskade, erfolgreich durchlaufen haben (Schlimok et al., 1988). In Abb. 1.4 ist die Disseminierung in das KM schematisch dargestellt.

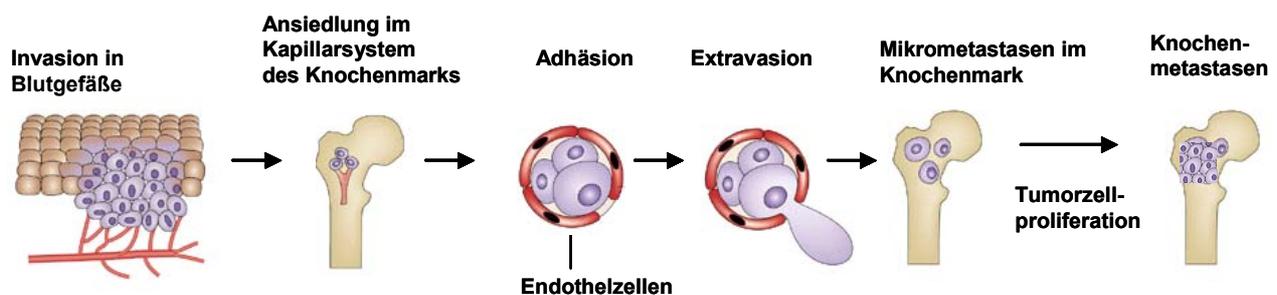


Abb. 1.4 Disseminierung von Tumorzellen in das KM. Über die Blutgefäße gelangen die Karzinomzellen von dem Primärtumor in das Kapillarsystem des Knochens. Einzelne Tumorzellen oder Aggregate von Tumorzellen bilden möglicherweise mit anderen Blutzellen einen Embolus und bleiben deshalb in diesem Kapillarsystem haften. Nach der Adhäsion an vaskuläre Endothelzellen können die Tumorzellen durch Extravasion die Blutgefäße verlassen. Im Knochen werden die Tumorzellen Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren) des Knochenmilieus ausgesetzt, die die Proliferation einzelner Tumorzellen (Mikrometastasen) unterstützen können und die Entstehung klinisch-manifester Metastasen ermöglichen. (modifiziert nach Mundy, 2002)

Für die meisten epithelialen Tumore beginnt die Disseminierung der Tumorzellen bald nach der Vaskularisation des Primärtumors. Für das Mammakarzinom gibt es beispielsweise Schätzungen, dass die Tumorzeldisseminierung bereits bei einer Größe des Primärtumors von weniger als $0,125 \text{ cm}^3$ beginnt (Liotta et al., 1974). Zum Zeitpunkt der Diagnose kann das Karzinom somit schon eine systemische Erkrankung sein (Uhr et al., 1997; Pantel et al., 1999).

1.3.1. Nachweis und Relevanz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Eine Reihe epithelialer Tumore (z.B. Mamma-, Lungen- und Prostatakarzinome) metastasieren bevorzugt in das Skelettsystem. Es bietet sich daher an, dieses relativ leicht zugängliche Kompartiment, in dem ein intensiver Zellaustausch zwischen zirkulierendem Blut und Stroma stattfindet, durch KM-Aspirationen direkt zu untersuchen. Auf diese Weise kann man einen Zugang zu hämatogen disseminierten Tumorzellen bekommen. Da sich im KM von gesunden Personen keine epithelialen Zellen befinden, können Zytokeratine, die integralen Bestandteile des Zytoskelettes epithelialer Zellen, als Marker für den Nachweis von disseminierten Karzinomzellen im mesenchymalen Milieu des Knochenmarks eingesetzt werden (Pantel et al., 1999; Braun et al., 2000b). Obwohl eine atypische Expression von Zytokeratinen in mesenchymalen Zellen nicht auszuschließen ist, deuten immunhistochemische Analysen an fast 200 KM-Aspiraten von Patientinnen ohne nachweisbare maligne Erkrankung darauf hin, dass KM-Zellen Zytokeratine nur äußerst selten (unter einem Prozent) exprimieren (Braun et al., 2000b). Im Durchschnitt befinden sich einzelne epitheliale Zellen im KM bei etwa 30% der Mammakarzinompatientinnen ohne klinisch nachweisbare Metastasen (Abb. 1.5).

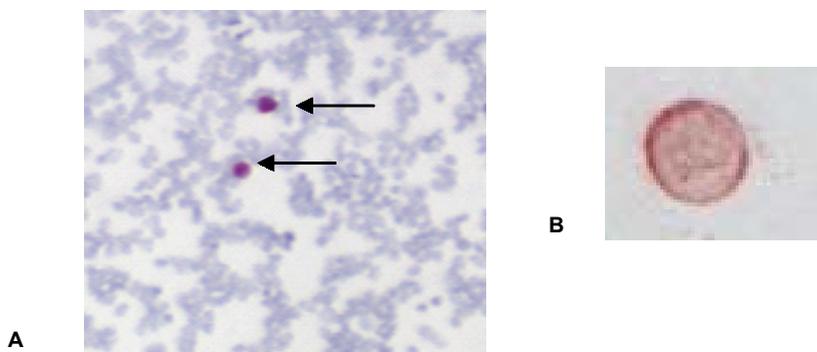


Abb. 1.5 Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen im KM. (A) Zwei mit Pfeil markierte zytokeratinpositive Zellen neben mononukleären KM-Zellen, die eine Hämalaun-Kernfärbung aufweisen (Vergrößerung: 100-fach). (B) Eine im KM detektierte, zytokeratinpositive Zelle, die eine deutliche zytoplasmatische Zytokeratinfärbung zeigt (Vergrößerung:1000-fach).

Zur Detektion von zytokeratinpositiven Zellen wird das KM mit einem Ficoll-Dichtegradienten aufgearbeitet, da sich mononukleäre Zellen und epitheliale Tumorzellen im gleichen Bereich des Dichtegradienten anreichern. Auf diese Weise lassen sich diese Zellen von Erythrozyten und Granulozyten trennen (Pantel et al., 1994).

Disseminierte Tumorzellen im KM können mit einer Frequenz von im Median 3 disseminierten Tumorzellen pro 2×10^6 mononukleären KM-Zellen detektiert werden (Braun

et al., 2000b). Die Gesamtzahl an disseminierten Tumorzellen liegt bei der MRD im Körper eines Patienten bei $2-10 \times 10^6$ Tumorzellen (Braun et al., 2000b).

Studien an rund 2500 Mammakarzinompatientinnen weisen darauf hin, dass disseminierte Tumorzellen im KM Vorläufer für spätere manifeste Metastasen im KM und anderen Organen sein können (Braun et al., 2000b; Diel et al., 1996; Gerber et al., 2001; Mansi et al., 1999). Das Vorhandensein dieser disseminierten Tumorzellen im KM von Mammakarzinompatientinnen mit metastasenfrem LK wird als unabhängiger prognostischer Faktor betrachtet (Braun et al., 2000b; Diel et al., 1996; Gerber et al., 2001), obwohl bei Patientinnen mit ungünstiger Prognose (z.B. mehr als drei LK-Metastasen) häufiger Tumorzellen im KM gefunden werden.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben von Mammakarzinompatientinnen mit metastasenfrem LK und mikrometastasenfreiem KM am längsten ist, wohingegen Patientinnen, bei denen Tumorzellen in LK und im KM detektiert wurden, das kürzeste Gesamtüberleben zeigen. Patientinnen, die entweder im KM oder in den LK Tumorzellen aufweisen, zeigen ein Gesamtüberleben, das zwischen den zwei beschriebenen Extremen liegt (Braun et al., 2000b; Abb. 1.6).

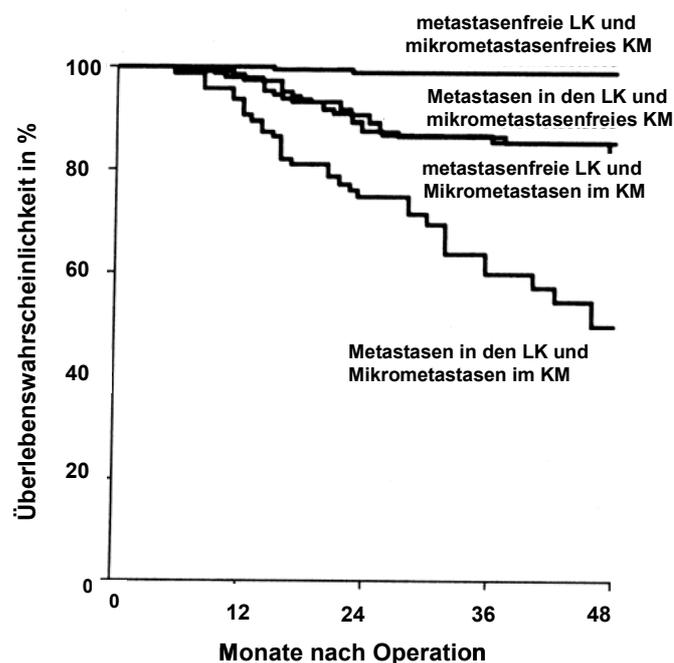


Abb. 1.6 Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenswahrscheinlichkeit von fernmetastasenfreien Mammakarzinompatientinnen mit Tumorzellen im KM und/oder den LK (Braun et al., 2000b).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Disseminierung in regionale LK ein eigenständiger Metastasierungsweg ist und nicht nur eine Übergangsstation auf dem Weg zu einer hämatogenen Metastasierung darstellt. Hierbei ist völlig unklar, welche genetische Ausstattung eine Tumorzelle für den einen oder anderen Disseminierungsweg prädestiniert.

1.3.2. Phänotyp der disseminierten Tumorzellen

Um die im KM detektierten zytokeratinpositiven Zellen als Tumorzellen identifizieren zu können, wurden diese Zellen phänotypisch charakterisiert. Anhand von Doppelfärbungen konnte die Expression von tumorassoziierten Oberflächenproteinen auf zytokeratinpositiven Zellen im KM gezeigt werden (Abb. 1.7).

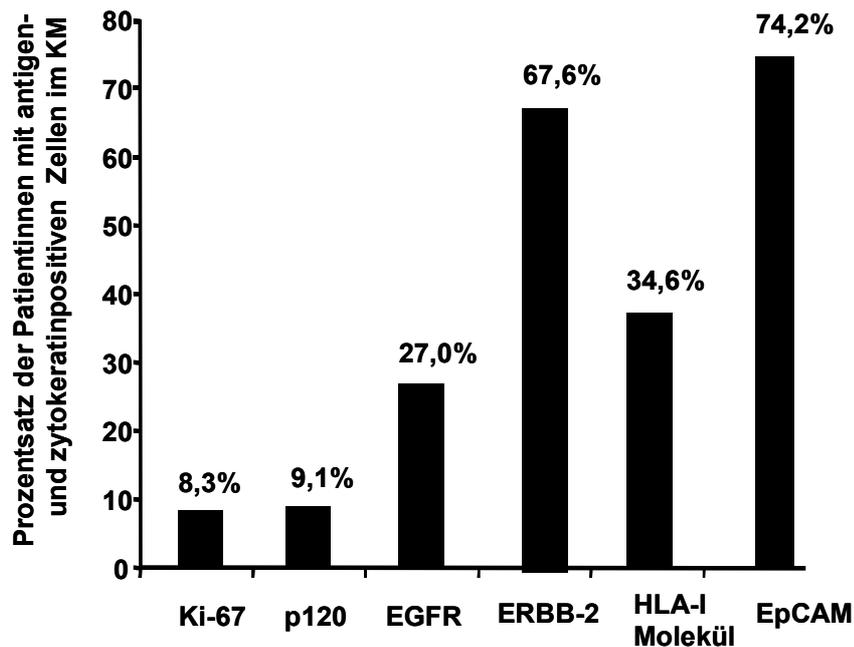


Abb. 1.7 Expression von Oberflächenproteinen auf zytokeratinpositiven disseminierten Tumorzellen im KM (Braun and Pantel, 1999). Es wurde die Expression der Proliferationsmarker Ki-67 und p120, des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR), der Rezeptortyrosinkinase ERBB-2, des MHC-Klasse-I-Moleküls (HLA-I) und des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (EpCAM) untersucht.

- **Proliferationsmarker**

Die in das KM disseminierten Tumorzellen besitzen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose der Tumorerkrankung ein zeitlich limitiertes proliferatives Potential, wie sich in Zellexpansionsversuchen zeigte (Pantel et al., 1995). Es ist daher anzunehmen, dass diese Zellen primär noch nicht autonom proliferieren, sondern sich in einer Art Latenzzustand befinden, der im englischen Sprachraum als „Dormancy“ bezeichnet wird (Uhr, et al. 1997). Diese „Dormancy“ kann entweder durch eine verminderte Proliferationsrate (Pantel et al., 1993) oder eine erhöhte Apoptoserate der Zellen (Holmgren et al., 1995) zustande kommen. Die verminderte Proteinexpression der Proliferationsmarker Ki-67 und p120 auf okkulten Tumorzellen weist allerdings eher auf eine reduzierte Proliferationsrate hin (Pantel et al., 1993). Der Latenzzustand der disseminierten Tumorzellen könnte auch erklären, weshalb

einzelne disseminierte Tumorzellen eine relative Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufweisen, da mit diesem Therapieansatz überwiegend proliferierende Zellen abgetötet werden. Braun et al. konnten mit Untersuchungen am KM vor und nach einer Chemotherapie zeigen, dass es im KM von Hochrisikopatientinnen mit mehr als drei LK-Metastasen zu keiner Elimination der disseminierten Tumorzellen nach der Chemotherapie kommt (Braun et al., 2000a).

Bis jetzt ist allerdings unklar, welche Faktoren diese „Dormancy“ über Jahre hinweg aufrechterhalten und welche Veränderungen die Tumorzellen durchlaufen müssen, damit sie dieses inaktive Stadium verlassen und zu einer progressiv wachsenden Makrometastase werden können.

- Wachstumsfaktorrezeptor-Familie

Eine immunzytochemisch detektierbare Proteinexpression der Rezeptortyrosinkinase ERBB2, einem Mitglied der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-(EGFR) Familie, scheint ein positives Selektionskriterium für die in das KM disseminierten Mammakarzinomzellen zu sein. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die disseminierten Tumorzellen im KM zu 60% ERBB-2-positiv sind, wohingegen die entsprechenden Primärtumore nur in etwa 20-30% eine ERBB-2-Proteinexpression aufweisen (Pantel et al., 1993, Braun et al., 2001). Beim metastasierten Mammakarzinom sind sogar alle disseminierten Tumorzellen im KM ERBB-2-positiv (Braun and Pantel, 1998). Somit scheint der ERBB-2-Phänotyp eine besonders maligne Subpopulation von disseminierten Tumorzellen zu repräsentieren (Khoury et al., 2001), die in der Lage sind, das Stadium ihrer „Dormancy“ zu verlassen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die stabile Transfektion der humanen, nicht metastasierenden Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit dem *ERBB-2*-Gen in Mäusen zu der Bildung von osteoklastischen Knochenmetastasen führt (Yi et al., 2002). Außerdem deuten *in vitro* Versuche darauf hin, dass die Expression von ERBB-2 in humanen Zellen die verminderte Expression des epithelialen Adhäsionsmoleküls E-Cadherin bewirkt (Hulsken et al., 1994). Es ist daher denkbar, dass ERBB-2-positive mikrometastatische Zellen aus einem metastatischen Subklon innerhalb des Primärtumors durch die verminderte Expression des Metastasierungssuppressors E-Cadherin selektioniert wurden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Protein ERBB-2 mit Mitgliedern der Lamininrezeptor-Familie ($\alpha 6\beta 4$ - und $\alpha 6\beta 1$ -Integrinen) interagiert und dass diese Interaktion möglicherweise auch zu einem migratorischen Phänotyp ERBB-2-positiver Zellen beiträgt (Falcioni et al., 1997).

- MHC-Klasse-I-Moleküle

Disseminierte Tumorzellen weisen außerdem häufig eine verminderte, kaum noch detektierbare Proteinexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf (Pantel et al., 1991; Pantel et al., 1993), den Oberflächenmolekülen, die tumorspezifische Peptide den zytotoxischen T-Lymphozyten präsentieren. Dadurch wird die Eliminierung der disseminierten Tumorzellen durch immunkompetente zytotoxische T-Lymphozyten verhindert. Dies könnte erklären, weshalb eine MRD über viele Jahre hinweg nicht von dem Immunsystem erkannt wird. Die herunterregulierte MHC-Klasse-I-Expression könnte auch die Effizienz von immun- und gentherapeutischen Ansätzen mit Tumorzellvakzinen beeinträchtigen, weshalb sich Antikörper als MHC-unabhängige immunologische Wirkstoffe besser für eine Therapieentwicklung eignen (Pantel et al., 1999).

- EpCAM-Molekül

Disseminierte Tumorzellen im KM weisen zu 74% eine Proteinexpression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM auf (Braun and Pantel, 1998), das eine kalziumunabhängige homotypische Zell-Zell-Adhäsion vermittelt.

Eine stark herunterregulierte EpCAM-Proteinexpression erlaubt möglicherweise Tumorzellen die Ablösung vom Primärtumor, wie bei Kolon- und Kopf-Hals-Karzinomen beschrieben wurde (Basak et al., 1998, Takes, 1997). Die erneute Expression von EpCAM in Metastasen und auf mikrometastatischen Zellen könnte das organspezifische „Homing“ und das Anwachsen dieser disseminierten Tumorzellen erleichtern (= Re-Epithelialisierung). EpCAM-positive Tumorzellen, die aus histopathologisch unauffälligen LK beim Ösophaguskarzinom isoliert wurden, konnten für die Etablierung einer permanenten Tumorzelllinie verwendet werden. Diese Zelllinie führte nach subkutaner Injektion in immundefiziente SCID-Mäuse sowohl zu einer lokalen Tumorbildung als auch zu einer Fernmetastasierung in Sekundärorgane, und belegt damit das tumorigene und metastatische Potential disseminierter Tumorzellen im LK (Hosch et al., 2000) .

1.3.3. Genotyp der disseminierten Tumorzellen

Ins KM gewanderte zytokeratinpositive Zellen können auf genomischer Ebene mit Hilfe einer Einzelzell-PCR kombiniert mit der CGH (Comparative Genomic Hybridization) auf ihre Malignität hin untersucht werden (Klein et al., 1999). Die CGH ist eine Methode, mit der unbalancierte chromosomale Abberationen entlang des Genoms nachgewiesen werden können. In CGH-Experimenten zeigte sich, dass aus dem KM oder anderen Sekundärorganen isolierte disseminierte Tumorzellen genetisch sehr heterogen sind (Klein et al., 2002). Es wurden Aberrationen sowie Polyploidien der Chromosomen 7, 8, 11, 17 und 18 beschrieben (Klein et al., 2002; Solakoglu et al., 2002).

Ob die Heterogenität dieser Zellen auf die klonale Variabilität des Primärtumors oder auf die fortschreitende genetische Instabilität der disseminierten Tumorzellen zurückzuführen ist, konnte noch nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass bisher praktisch keine genetisch identischen disseminierten Tumorzellen vor dem Auftreten manifester Metastasen (M0-Stadium) im KM gefunden wurden, favorisiert allerdings das Konzept der genetischen Instabilität (Loeb et al., 2000). Es ist denkbar, dass disseminierte Tumorzellen als Vorläufer von manifesten Metastasen aus einem großen Vorrat genetisch variabler okkulten Tumorzellen selektioniert werden.

1.4. Nutzen der Mikroarraytechnik für die Tumorbiologie

Bislang konnten nur wenige Faktoren auf Protein- oder RNA-Ebene hinsichtlich ihrer prognostischen und prädiktiven Wertigkeit an Karzinomgewebe untersucht werden. Obwohl dieser Ansatz der Beurteilung weniger Faktoren wertvoll ist, stellt er eine zu starke Vereinfachung der Ätiologie und Progression von Karzinomen dar. Es ist erwiesen, dass die Manifestation des Karzinomphänotyps das Ergebnis vieler interagierender Reaktionswege sowohl in Karzinom- als auch in den umgebenden Wirtszellen ist. Um ein vollständigeres Bild der Genexpression von Karzinomen zu erhalten, wird vermehrt die cDNA-Mikroarray-technologie eingesetzt, mit der die Expression von Tausenden von Genen gleichzeitig bestimmt werden kann. Auf diese Weise kann man Gene, die zusammen reguliert werden, identifizieren und ihre funktionale Beziehung bei der Karzinogenese aufdecken. Ein bestimmtes Protein kann unterschiedliche Funktionen ausüben, je nach dem, ob es zusammen mit Suppressoren, Aktivatoren oder allein auftritt; deshalb ist ein Expressionsmuster aussagekräftiger als die Analyse individueller Gene. Die Expressionsdaten können dann mit morphologischen, therapeutischen und klinischen Daten korreliert werden. Genexpressionsanalysen können somit zu einem besseren Verständnis der Biologie maligner Tumore beitragen. Kürzlich wurden mit der Mikroarraytechnologie erste Genexpressionsstudien an humanen Mammakarzinomgeweben durchgeführt, die zur Identifizierung von 70 möglichen Genen mit prognostischer Relevanz geführt haben (van 't Veer et al., 2002). Mit den 70 in dieser Studie identifizierten Genen konnte an einem größeren Kollektiv von fast 300 LK-positiven und -negativen Mammakarzinompatientinnen gezeigt werden, dass die Einteilung der Patientinnen in eine Hoch- und Niedrigrisikogruppe anhand des Genexpressionsprofils des Primärtumors ein hilfreicher Ansatz ist, um diejenigen Patientinnen besser zu identifizieren, die von einer adjuvanten systemischen Therapie profitieren könnten (van de Vijven et al., 2002). Im Vergleich zu den Kriterien der St. Gallen Konsensuskonferenz (siehe 1.1.2.) könnte mit diesem Ansatz die Anzahl der

„übertherapierten“ LK-negativen Patientinnen von fast 70% auf möglicherweise 27% gesenkt werden (van 't Veer et al., 2002).

Die Identifizierung von Genexpressionsmustern in Primärtumoren, die auf ein erhöhtes Metastasierungspotential hinweisen, entspricht auch dem neuen Metastasierungskonzept von Bernards und Weinberg, wonach Tumorzellen schon sehr früh in der Tumorigenese relevante Veränderungen für ihre metastatische Kapazität erwerben (Bernard und Weinberg, 2002). Das metastatische Potential humaner Karzinome könnte somit in einem Großteil der Tumorzellen des Primärtumors bereits vorhanden sein und nicht nur in einem kleinen metastatischen Subklon vorliegen, wie klassische Metastasierungsmodelle postulierten. Ramaswamy et al. konnten in Übereinstimmung zu diesem neuen Metastasierungskonzept metastatische von nicht metastatischen Adenokarzinomen unterschiedlicher Tumorentitäten (z.B. Lunge, Brust, Prostata, Colon, Uterus und Ovarien) anhand von charakteristischen Genexpressionsmustern der Primärtumore eindeutig voneinander unterscheiden (Ramaswamy, 2003).

Genexpressionsdaten sind allerdings sehr komplex und nur im Kontext einer detaillierten Beschreibung der Bedingungen, unter denen sie gewonnen wurden, bedeutungsvoll. Daher wurde das MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment)-Konzept entwickelt (Brazma et al., 2001), mit dessen Hilfe die Ermittlung der Mikroarraydaten (bestehend aus dem experimentellen Aufbau, der Arrayherstellung, der Probenpräparation, der Hybridisierung, der Quantifizierung und der Normalisierung der Ergebnisse) standardisiert werden soll.

Zur Validierung möglicher Tumormarker wurden bisher immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten von einer großen Kohorte humaner Tumore durchgeführt. Diese Arbeit war sehr arbeitsintensiv und wird heutzutage immer mehr durch die Verwendung von Gewebearrays erleichtert. Ein Array besteht aus 100-1000 zylindrischen Gewebebiopsien (0,6 mm Durchmesser) von verschiedenen Patienten, die zu einem neuen Paraffinblock zusammengefasst werden, so dass mit der Färbung eines Gewebearrayschnittes bis zu 1000 Tumorstanzen simultan untersucht werden können (Kononen et al., 1998).

1.5. Aufgabenstellung

Die Erforschung der molekularen Grundlagen des Metastasierungsverhaltens epithelialer Tumore hat in den letzten Jahren zu neuen Erkenntnissen geführt. Trotzdem sind einige elementare Grundlagen, wie z.B. die Frage nach den Eigenschaften des Primärtumors, die mit der frühzeitigen Disseminierung von Tumorzellen in das KM verknüpft sind, weitgehend ungeklärt. Bis heute gibt es nur wenige Publikationen zu diesem Thema, in denen eine Assoziation von erhöhter Angiogenese im Primärtumor mit dem Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im KM bei Mamma- und Magenkarzinompatienten gezeigt werden konnte (Fox et al., 1997; Maehara et al., 1998).

Aufgrund unterschiedlicher experimenteller Tiermodelle gibt es auch kontroverse Ergebnisse darüber, ob die initiale Phase der Tumorzeldisseminierung von bestimmten Genen gesteuert wird oder eher einen ungerichteten Prozess darstellt. Statt den bisher verwendeten Metastasierungsmodellen an Mäusen, stellt die Analyse des humanen Karzinomgewebes mit Fokus auf die Biologie der hämatogenen und/oder lymphogenen Disseminierung von Tumorzellen einen neuen Ansatzpunkt zur Klärung dieser Frage dar.

Basierend auf der prognostischen Relevanz mikrometastatischer Tumorzellen im KM soll in dieser Arbeit das Genexpressionsmuster des Primärtumors identifiziert werden, das für das lymphogene und/oder hämatogene Disseminierungspotential humaner Mammakarzinome verantwortlich ist. Diese Frage lässt sich am besten unter Verwendung von Screening-Methoden mit cDNA-Arrays untersuchen, da für das Verständnis zellulärer Ereignisse das Zusammenspiel der einzelnen exprimierten Gene wichtig ist. Dafür sollen Primärtumore mit bzw. ohne Tumorzeldisseminierung in das KM und/oder die regionalen LK auf der Ebene des Transkriptoms vergleichend analysiert werden. Unterschiede in der Genexpression würden einen Hinweis dafür liefern, dass sich die molekularen Mechanismen der hämatogenen Disseminierung von denen der lymphogenen Disseminierung unterscheiden. Dabei ist von besonderem Interesse, welche zellbiologischen Prozesse von den Veränderungen der Genexpression betroffen sind. Gene aus der Familie der Adhäsionsproteine, der Proteasen, der Onkogene, der Tumorsuppressorgene, der Zytokine, der Zell-Zyklus-Regulatoren und der Wachstumsfaktoren sind mögliche Kandidaten, wie erste Genexpressionsanalysen an primären Mammakarzinomen mit der Mikroarray-technologie zeigten (Finlin et al., 2001; Lonning et al., 2001; Perou et al., 2000). Bis jetzt wurden diese Untersuchungen vornehmlich im Vergleich zu Normalgewebe durchgeführt. In dieser Arbeit soll, im Gegensatz dazu, die Biologie des frühzeitigen Disseminierungsprozesses beim Mammakarzinom im Vordergrund stehen. Der Vergleich des Mammakarzinomgewebes mit nicht malignem (normalem) Brustepithelgewebe wird in

dieser Arbeit für die Klärung benötigt, inwieweit die beobachteten Veränderungen in der Genexpression tumorspezifisch sind.

Mögliche disseminierungsrelevante Gene, die in der Transkriptomanalyse der Primärtumore gefunden werden, sollen an Gewebearrays validiert und auf ihre prognostische Relevanz hin untersucht werden. Des Weiteren soll überprüft werden, ob den differenziell exprimierten Genen genomische Abberationen zugrunde liegen.

Die gewonnenen Ergebnisse könnten zu einer verbesserten Diagnose und Therapie des Mammakarzinoms beitragen. Außerdem könnte diese Arbeit einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Biologie des Disseminierungsprozesses leisten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mammakarzinomzelllinie

Die in dieser Arbeit eingesetzte, kommerziell erhältliche Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (ATCC-Nummer: HTB-20), wurde ursprünglich aus dem Pleuraerguss einer Mammakarzinompatientin etabliert.

2.1.2. Patientenmaterial

2.1.2.1. Tumorgewebe für die Genexpressionsstudie

Das analysierte Mammakarzinomgewebe wurde von der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, zu Verfügung gestellt. Dabei wurde das Gewebe nach der Entnahme bei der Primäroperation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA- Extraktion in flüssigem Stickstoff gelagert. Anhand eines Hämalaun-Eosin gefärbten Kryoschnittes (Kap. 2.2.11.) konnte der Tumoranteil des Gewebes bestimmt werden. Nur Tumorproben, bei denen der Tumorzellanteil bei mindestens 50% lag, wurden für die manuelle Mikrodissektion und die Genexpressionsexperimente eingesetzt. Die Selektionskriterien für die Auswahl dieser Patientinnen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Es wurde ebenfalls das Expressionsprofil von gemischter RNA aus normalem (nicht malignem) Brustgewebe von vier Patientinnen des Kollektivs erstellt. Außerdem wurde RNA aus Lymphozyten isoliert, die das Tumorgewebe infiltrierten, um die von ihnen hervorgerufene Genexpression zu bestimmen

Tabelle 2.1 Charakterisierung der Mammakarzinompatientinnen und des in dieser Arbeit analysierten Tumorgewebes

Patienten Nr.	Alter	Knochenmark-Mikrometastasen ^a	Lymphknoten-Metastasen ^b	Tumor-histologie	Tumor-größe	Tumor-differenzierung (Grading)	Hormonrezeptorstatus ER-Status	PR-Status
1	46	nein	nein	duktal	pT2	G3	+	+
2	60	nein	nein	lobulär	pT2	G2	+	+
3	55	nein	nein	duktal	pT2	G2	+	+
4	40	nein	nein	duktal	pT1	G3	+	+
5	62	nein	nein	lobulär	pT1c	G1	+	+
6	65	nein	nein	duktal	pT2	G2	+	-
7	64	nein	nein	duktal	pT2	G2	+	+
8	63	ja (1)	nein	lobulär	pT2	G2	+	+
9	61	ja (1)	nein	duktal	pT2	G3	+	+
10	69	ja (1)	nein	duktal	pT2	G2	+	+
11	43	ja (2)	nein	duktal	pT2	G3	+	+
12	31	ja (8)	nein	duktal	pT2	G3	-	-
13	61	ja (2)	nein	duktal	pT2	G2	+	+
14	63	ja (72)	nein	lobulär	pT2	G2	+	+
15	46	nein	ja (5)	duktal	pT2	G2	+	+
16	47	nein	ja (12)	lobulär	pT3	G2	+	+
17	50	nein	ja (1)	duktal	pT2	G2	+	+
18	50	nein	ja (2)	lobulär	pT2	G2	+	+
19	48	nein	ja (2)	lobulär	pT1c	G2	+	+

^a Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der detektierten zytokeratinpositiven disseminierten Tumorzellen pro 2×10^6 mononukleären Knochenmarkzellen an.

^b Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der mit Tumorzellen infiltrierten Lymphknoten an.

Der Status des Östrogenrezeptors (ER) und des Progesteronrezeptors (PR) wurde routinemäßig von allen Patientinnen bestimmt.

pT1: Tumorgröße kleiner als 2 cm im Durchmesser; pT2: Tumorgröße zwischen 2 und 5 cm im Durchmesser.

G1: hoher Differenzierungsgrad, G2: mittlerer Differenzierungsgrad, G3: geringer Differenzierungsgrad (Erklärung der Begriffe in Kap.1.1.1)

2.1.2.2. Tumorgewebe des Mikrometastasenarrays

93 in Paraffin eingebettete Mammakarzinomproben mit bekanntem Knochenmarkstatus (KM-Status) wurden für die Herstellung des Mikrometastasenarrays (siehe Kap. 2.2.12) verwendet. Das in Paraffin eingebettete Tumormaterial wurde von der Gynäkopathologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Pathologische Daten, wie zum Beispiel die Tumorgröße und der Lymphknotenstatus (LK-Status), wurden den Pathologieberichten entnommen. Das Kollektiv bestand aus Mammakarzinomgewebe von 66 Patientinnen ohne zytokeratinpositive Zellen und 27 Patientinnen mit zytokeratinpositiven Zellen im KM zum Zeitpunkt der Primäroperation. Der Histologietyp der Tumore war in 62 Fällen duktal, in 15 Fällen lobulär und wurde in 16 Fällen einem anderen Histologietyp zugeordnet. 11 der Tumore besaßen den Differenzierungsgrad 1, 39 den Differenzierungsgrad 2 und 30 den Differenzierungsgrad 3. Die Tumorgröße war in 56 Fällen pT1 und in 29 Fällen pT2. In 13 Fällen war der Differenzierungsgrad und in 8 Fällen die Tumorgröße nicht in den Pathologieberichten vermerkt. 20 Tumore waren östrogenrezeptornegativ und keine der Patientinnen besaß LK-Metastasen (siehe Kap. 1.1.1. für die pathologische Klassifikation bei Mammakarzinomen).

2.1.2.3. Tumorgewebe des Mammakarzinomprognosearrays

Die Paraffinschnitte des Prognosearrays wurden von Herrn Prof. G. Sauter (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Basel) zur Verfügung gestellt. Dieser Prognosearray umfasst insgesamt 2517 Gewebestanden. Davon enthalten 276 Gewebestanden normales Brustgewebe oder prämalignes Mammakarzinomgewebe (DCIS, LCIS), das bei immunhistochemischen Färbungen des Arrays als Färbekontrolle diente. Der Histologietyp der Tumorstanzen war in 1552 Fällen duktal, in 312 lobulär, und wurde in 355 Fällen einem anderen Histologietyp zugeordnet bzw. war in 22 Mammakarzinomgeweben nicht speziell klassifiziert. Die Tumorgröße war in 823 Fällen pT1, in 1025 pT2, in 125 pT3 und in 242 Fällen pT4 von denen 546, 549 und 656 Tumore jeweils mit dem Differenzierungsgrad 1, 2 und 3 klassifiziert waren. Die Tumorgröße war in 26 und der Differenzierungsgrad in 490 Fällen nicht bekannt. Die durchschnittliche mediane Nachbeobachtungszeit der operierten Patientinnen betrug 46 Monate (Bereich: 1-176 Monate). Im Median waren die Patientinnen 63 Jahre alt (Bereich: 26-101 Jahre).

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

2.1.3.1. Reagenzien

AB-Serum	Biotest AG, Dreieich
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
cDNA-Klone für CK-19 und STAT-1	Clontech, Heidelberg
Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Roche, Mannheim
Diethylprocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Merck Eurolab, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
EDTA (Diethylen-diamin-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eosin G-Lösung (0,5 % wäßrig)	Merck Eurolab, Darmstadt
Entellan	Merck Eurolab, Darmstadt
Ethanol, Isopropanol	Merck Eurolab, Darmstadt
ExpressHyb Solution	Clontech, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Life Technologies,
EggensteinFicoll-Plaque	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fixogum	Marabuwerke GmbH&Co., Tamm
Formaldehydlösung mindestens 37%	Merck Eurolab, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
L-Glutamin 200 mM	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Glycergel	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Hämalaun	Merck Eurolab, Darmstadt
Hank's Salt Solution	Biochrom KG, Germany
Human Adult Normal Breast Total RNA	Biocat, Heidelberg
Human GAPDH cDNA Control Probe	Clontech, Heidelberg
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck Eurolab, Darmstadt
Levamisol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methylenblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Molecular Weight Marker VIII	Roche Diagnostics, Mannheim
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat (NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O)	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Eurolab, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche, Mannheim
Neufuchsin	Merck Eurolab, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim
PBS, Dulbecco's	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
PeqGold TriFast™	Peqlab, Erlangen
RPMI 1640	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Salmon Testis DNA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Seakem® LE Agarose	FMC-Bioproducts, Rockland, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Spot-Light Tissue Heat Pretreatment Buffer	Zymed, Berlin

Szintillation-Cocktail-Ready-Protein	Beckman Instrument GmbH, München
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Transferrin, Insulin, Selenium A	Gibco BRL, Life Technologies, EggensteinTri-
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck Eurolab, Darmstadt
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck Eurolab, Darmstadt
Toluidin	Merck Eurolab, Darmstadt
Trypsin-EDTA 10 x konzentriert	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Xylenxyanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.3.2. Antikörper

Die aufgeführten Antikörper wurden für zytologische oder immunhistochemischen Färbungen eingesetzt.

A45-B/B3 (Zytokerantinantikörper) (200 µg/ml)	Micromet, Martinsried
APAAP (Alkalische-Phosphatase- Konjugat) (100 µg/ml)	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Epithelial Membranantigen (EMA) (Konzentration nicht bestimmt) (1 mg/ml)	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg Plakoglobin Novocastra, Newcastle, UK
HER-2/NEU (Klon CB11) (200µg/ml)	Novocastra, Newcastle, UK
HIF-1 α (10,5 mg/ml)	Abcam, Cambrige
MOPC-21 (Isotyp IgG1) (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaninchen-anti-Maus-Antikörper, Z359 (3,5 mg/ml)	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Rho B (200µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Dassel
STAT-1 (200µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Dassel
TGF β -2 (200µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology, Dassel
Zytokeratin-8 (556 µg/ml)	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Zytokeratin-10 (100 µg/ml)	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Zytokeratin-18 (Konzentration nicht bestimmt)	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Zytokeratin-19 (40 µg/ml)	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg

2.1.3.3. Enzyme

AmpliTaq®DNA Polymerase	Perkin Elmer (Vertrieb Roche, Mannheim)
DNase	Promega, Mannheim
Pepsin	Zymed, Berlin
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden
SUPERaseIn™RNase Inhibitor	Ambion, Cambridgeshire
SUPERSCRIPT™II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

2.1.3.4. PCR-Primer

MWG, Ebersberg

Die aufgeführten PCR-Prime wurden für die Herstellung von Northern-Blot-Sonden und die radioaktive Markierung dieser Sonden in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Sequenzen:

Zytokeratin-19 (forward):

5' – CAGGTCAGTGTGGAGGTG – 3'

Zytokeratin-19 (reverse):

5' – AGCTCAATCTCAAGACCCT – 3'
STAT-1 (forward):
 5' – GAGTCCACCAATGGCAGT – 3'
STAT-1 (reverse):
 5' – GGACAGATTCCTGGGTTCC – 3'

2.1.3.5. Kits

Atlas Human Cancer 1.2 Arrays	Clontech, Heidelberg
MYC- DNA-Probe	Vysis GmbH, Bergisch Gladbach
DAKO ChemMate™ Detection Kit	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Gel-Extraktions-Kit QIAEX	Quiagen, Hilden
PathVysion™ HER-2/NEU DNA Probe Kit	Vysis GmbH, Bergisch Gladbach
QIAamp® DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Quiagen, Hilden
Rediprime II-Kit	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
RNeasy Tissue Kit	Quiagen, Hilden
SUPERSCRIPT™ Preamplification Kit for First Strand cDNA Synthesis	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

2.1.3.6. Radioaktives Material

Die aufgeführten radioaktiven Nukleotide wurden in der cDNA-Synthese der Genexpressionsanalysen ($[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$) und bei der radioaktiven Markierung der Northern-Blot-Sonden $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ eingesetzt.

$[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 3.000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 3.000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

2.1.3.7. Puffer und Lösungen (falls nicht im Methodenteil beschrieben)

Methylenblau-Toluidin-Färbelösung:

0,2 % Methylenblau (w/v)
 1 % Toluidin (w/v)
 in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung (w/v)

10x MOPS:

0,2 M MOPS	41,2 g/l
80 mM Natriumacetat	6,56 g/l
10 mM EDTA	20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0/l
pH 7,0	

PBS-Puffer:

1,54 M NaCl	90,00 g/l
0,08 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	14,24 g/l
0,02 M KH_2PO_4	2,72 g/l
pH 7,4	

20x SSC (Standard saline citrate):

3 M NaCl	175,3 g/l
300 mM Tri-Natriumcitrate-dihydrat	88,2 g/l
pH 7,0	

2.1.3.8. Sonstiges Material

27 G Injektionsnadel
Fettstift DAKO-Pen
Frischhaltefolie
Gefrierfolien
Hybridisation Transfer Membrane
Hybond-N

Neubauer-Zählkammer
Phosphoimagerplatte
QIAshredder

SuperFrost Plus Objektträger
UVette

Braun, Melsungen
DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Paclan, Henfenfeld
Krupps, Stuttgart

Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Superior, Vertrieb Merck Eurolab, Darmstadt
Raytest Isotopengeräte GmbH, Straubenhardt
Quiagen, Hilden

Menzel-Gläser, Stuttgart
Eppendorf, Hamburg

2.1.3.9. Geräte

Arrayer
Cross-Linker
Digitale Bildverarbeitungsanlage
Kappa®
Durchlichtmikroskop Leica DMLB
Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenz Kanal und Bilddokumentationsprogramm
Färbeautomat
FISH Heizblock
Gel-Dokumentationssystem Intas®
Gelelektrophorese-Anlagen
Inverses Mikroskop Leica DMIL mit Fluoreszenz Kanal
Kryostat
Mikrowelle
Peltier Thermal Cycler PTC-200
Phosphoimager FugiBas
Schlittenmikrotom
Schüttelwasserbad
Szintillationszähler
UV-Spektrometer Ultrospec 2000
Zellkultur-Brutschrank
Zytozentrifuge

Becher Instruments, Woodland, USA
Stratagene, Amsterdam

KAPPA opto-electronics GmbH, Gleichen
Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wezlar

Applied Imaging, Newcastle
DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Intas® GmbH, Göttingen
Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wezlar
Shandon, München
Promicro, München
Research Inc., Watertown, Massachusetts
Raytest, Isotopengeräte GmbH, Straubenhardt
Leica Mikroskopie und System GmbH
Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Beckman Instrument GmbH, München
Amersham, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Heraeus, Hanau
Hettich, Villingen-Schwenningen

2.1.3.10. Softwareprogramme

Imagene 4.2
Excel (Student's t-Test)
Img2tiff
Cluster and Tree View Software von Eisen
OMIM and SAGE Datenbanken
SPSS for PC (Version 11 for Windows)

Biodiscovery (Vertrieb: MWG, Ebersberg)
Microsoft Office 97
Raytest, Isotopengeräte GmbH, Straubenhardt

<http://www.rana.lbl.gov>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>

SPSS Inc., Chigago, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde in RPMI 1640-Medium, das mit 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 200 U Penicillin und 200 µg Streptomycin versetzt wurde, in einem Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage, bzw. wenn sie 80% konfluent waren, gesplittet. Das Ablösen der Zellen von dem Kulturflaschenboden erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS mit 1 x Trypsin/EDTA. Die Proteolyse des Trypsins wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt.

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden 1 x 10⁶ Zellen mit 1 ml Einfriermedium (1 Volumeneinheit (VE) FCS und 1 VE 20% (v/v) DMSO in RPMI-Medium) versetzt.

2.2.2. Isolierung mikrometastatischer Tumorzellen aus dem Knochenmark

Durch die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation können mononukleäre Zellen und epitheliale Tumorzellen, die sich im gleichen Abschnitt des Dichtegradienten anreichern, von Erythrozyten und Granulozyten getrennt werden (Braun et al., 2000b).

Die KM-Aspirate (Median 5 ml pro Punktion) wurden perioperativ durch einseitige oder beidseitige Beckenkammpunktion von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (Stadium M0) gewonnen. Das aspirierte KM wurde mit Hankspuffer (Biochrom) auf 30 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 500 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit der Fettphase bis auf ein Restvolumen von 10 ml abpipettiert und das Pellet resuspendiert. 20 ml Ficoll-Lösung (Dichte: 1,077 g/mol) wurden vorsichtig mit der KM-Zellsuspension überschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 900 g zentrifugiert. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde abgenommen und mit PBS gewaschen; hierfür wurde die Zellsuspension auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei 150 g zentrifugiert. 7x 10⁵ mononukleäre Zellen wurden mit 150 g für 5 Minuten auf einen Objektträger zentrifugiert (=Zytospin), über Nacht getrocknet und danach immunhistochemisch gefärbt.

2.2.3. APAAP-Färbung zur Detektion von zytokeratinpositiven Zellen

Insgesamt wurden 2×10^6 mononukleäre Zellen pro KM-Probe auf die Anwesenheit von zytokeratinpositiven Zellen durchsucht. Die immunzytochemische Färbung erfolgte mit der APAAP-Methode (Cordell et al., 1984) unter Verwendung des monoklonalen Primärantikörpers A45-B/B3 (IgG1). Dieser Antikörper richtet sich spezifisch gegen ein gemeinsames Epitop verschiedener Zytokeratinkomponenten (u.a. CK-8,-18 und-19 sowie CK-8/19 Heterodimere; Braun et al., 2000b). Da Zytokeratine als intrazelluläre Polypeptide einen essentiellen Bestandteil des Zytoskelettes aller epithelialen Zellen darstellen, jedoch nicht in mesenchymalen Zellen exprimiert werden, sind sie sehr gute Marker für die Detektion von epithelialen Tumorzellen im mesenchymalen KM.

Alle Färbe- und Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt. Zunächst wurden die Zellareale auf dem Zytospin mit einem DAKO-Pen (Fettstift) umrandet, um die Flüssigkeitsmenge bei der Färbung des Zytospins auf das Zellareal zu begrenzen.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Objektträger mit 10% AB-Serum in PBS für 20 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen A45B/B3-Antikörper (2 µg/ml) für 45 Minuten. Als Isotyp-Kontrolle diente in entsprechender Konzentration der MOPC-21 Antikörper, ein polyklonaler Antikörper mit unbekannter Spezifität vom Subtyp IgG1 eines mineralölinduzierten Plasmozytoms der Maus.

Nach drei Waschschritten in PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit einem sekundären anti-Maus Brückenantikörper aus dem Kaninchen (175 µg/ml). Dann wurden die in PBS gewaschenen Zytospins für 30 Minuten mit einem APAAP-Konjugat (1 µg/ml) inkubiert. Das APAAP-Konjugat (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase) baut sich aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Maus-Antikörper auf (Abb. 2.1). Bei dieser Färbemethode hydrolysiert die alkalische Phosphatase Naphtholphosphatester (Substrat) zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole reagieren mit Diazoniumsalzen (z.B. Neufuchsin) und bilden unlösliche Azofarbstoffe. Endogene alkalische Phosphatasen wurden mit Levamisol gehemmt. Für die Herstellung der Färbelösung wurden 200 µl Levamisolhydrochlorid-Stocklösung (0,62 M) in 83 ml 50 mM Tris (pH 9,5) mit 415 µl NaNO₂ Stocklösung (0,56 M) und 166 µl Neufuchsin (5% (v/v) in Wasser) gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 42 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (in 0,5 ml DMF gelöst) zugegeben. Die Zytospins wurden 30 Minuten mit der filtrierten Farblösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die gefärbten Objektträger für 15 Sekunden mit Mayer's Hämalaun Lösung (1:5 in Wasser verdünnt) gegengefärbt und mit Glycergel eingedeckelt.

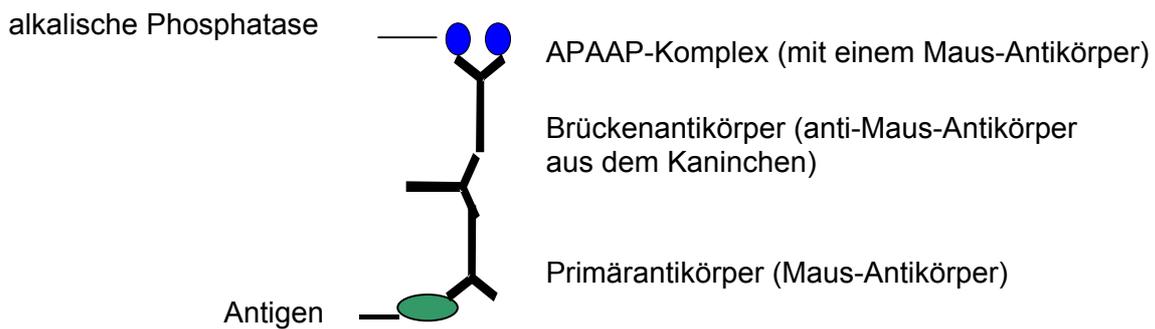


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der verwendeten Antikörper bei der APAAP-Färbung.

2.2.4. Isolierung und Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird sowohl zur Darstellung und Identifizierung von DNA-Fragmenten (analytisch) als auch zur Aufreinigung und Isolierung von DNA (präparativ) eingesetzt. Je nach Fragmentgröße wurden 1-2% (w/v) Agarose mit 1xTBE-Elektrophoreselaufpuffer (89 mM Trisbase, 89 mM Borsäure und 1 mM EDTA, pH 8,0) für analytische Gele oder 1x TAE-Elektrophoreselaufpuffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) für präparative Gele in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlung mit SYBR Gold nach Angaben des Herstellers versetzt. Durch Zugabe von SYBR Gold zur flüssigen Gelmatrix können DNA-Fragmente unter UV-Licht (300 nm) sichtbar gemacht werden (SYBR Gold interkaliert in die DNA- Doppelhelices und fluoresziert bei 537 nm). Die Proben wurden vor dem Auftragen 5:1 mit einem 10x DNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,4% Bromphenol Blau, 0,4% Xylencyanol) versetzt. Es wurden ebenfalls 33 ng DNA-Marker auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese wurde bei 80-100 Volt und 40 mA durchgeführt. Die aus dem Gel zu isolierenden DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell in einem möglichst kleinen Volumen Agarose aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem „Gel-Extraktions-Kit QIAEX“ nach dem Protokoll des Herstellers. Bei analytischen Gelen ist eine deutlich umgrenzte Bande bei etwa 20 kb ein Zeichen für intakte genomische DNA.

2.2.5. Quantitäts-und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren (OD-Messung)

Die Quantität der RNA und DNA wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem UV-Spektrometer bestimmt. Dazu wurden 2 µl der extrahierten DNA-Lösung 1:50 mit nukleasenfreiem Wasser verdünnt. Die Extinktion (E) wurde in einer Quarzküvette gegen destilliertes Wasser gemessen. RNA-Lösungen wurden dagegen meist unverdünnt in einer RNase-freien Plastikkuvette (UVette) gemessen.

Die Nukleinsäurekonzentration kann mit folgender Formel errechnet werden (Maniatis et al., 1989):

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = E_{260} \times 50 (\mu\text{g}/\text{ml}) \times \text{Verdünnung}$$

bzw.

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = E_{260} \times 40 (\mu\text{g}/\text{ml}) \times \text{Verdünnung}$$

Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich über die Ermittlung des Quotienten E_{260}/E_{280} beurteilen. Ein Quotient von 1,8 entspricht reiner DNA und ein Quotient von über 1,9 reiner RNA. Werte unter 1,6 weisen auf Proteinverunreinigungen hin.

2.2.6. cDNA-Expressionsarray

2.2.6.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus Kryogewebe

Das in flüssigem Stickstoff eingefrorene Mammakarzinomgewebe wurde am Kryostaten geschnitten (7 µm) und auf positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) aufgezogen. Die Schnitte wurden sofort in 70% (v/v) Ethanol fixiert und für 30 Sekunden in einer Methylenblau-Toluidin-Färbelösung (für die Herstellung der Färbelösung siehe Kap. 2.1.3.7.) inkubiert, um die Zellkerne zu färben. Anhand der gefärbten Zellkerne konnten die Tumoreareale identifiziert werden. Dann wurden die Schnitte eine Minute in 0,9% Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die manuelle Mikrodissektion erfolgte mit einer sterilen 27 G Injektionsnadel unter einem inversen Mikroskop. Um die mikrodisektierten Zellen im RNA-Lysepuffer des „RNeasy Tissue Kits“ zu homogenisieren, wurde dieser Lysepuffer mit den Zellen über Säulen („QIAshredder“) zentrifugiert. Die Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte mit der säulenbasierten Methode des RNeasy-Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Methode binden alle RNA-Moleküle an eine Silikagelmembran, von der sie mit H₂O eluiert werden können. Da für die Hybridisierung der Arrays hochreine RNA benötigt wird, wurde ein DNA-Verdau für 30 Minuten bei 37°C mit 1 Unit DNase/µg RNA durchgeführt, um Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen. Danach wurde die RNA mit peqGold TriFast™ entsprechend des Herstellerprotokolls extrahiert und präzipitiert, um die RNA von Proteinen zu befreien. Das Pellet wurde in RNase-freiem Wasser mit einer

Unit RNase Inhibitor (SUPERaseIn)/ μ l RNA resuspendiert und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Der konsequente Einsatz des RNase Inhibitors SUPERase-I führte zu einer deutlichen Steigerung der RNA Qualität, da dieser RNase-Inhibitor DTT-unabhängig RNasen in einem breiten Spektrum (pH: 5.5 –8.5; $4-65^{\circ}\text{C}$) irreversibel inaktiviert.

Es wurden jeweils 5 μ g Gesamt-RNA aus dem Tumorgewebe isoliert, so dass keine Amplifizierungsschritte, die das Expressionsmuster verschieben könnten, benötigt wurden.

2.2.6.2. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 5 μ g DNA-freie Gesamt-RNA mit 1 μ l CDS Primern des „1.2-Cancer-Array-Kits“ für zwei Minuten auf 70°C und danach zwei Minuten auf 50°C erhitzt. Ein Mastermix bestehend aus 2 μ l 5x first strand cDNA Puffer, 0,5 μ l 100 mM DTT, 1 μ l dNTP-Mix (je 5 mM dCTP, dGTP, dTTP) und 3,5 μ l [α - ^{33}P]dATP (3000 Ci/mmol in 10 μ l) wurde der Probe hinzugefügt und für zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Dann wurde 1 μ l Superscript-II-reverse-Transkriptase (200 U/ μ l) zu der Probe pipettiert. Da die Superscript-II-reverse-Transkriptase (aus E.coli, die das pol Gen des Moloney-Murine-Leukemia-Virus enthalten) nicht durch ribosomale oder t-RNA gehemmt wird und auch besonders lange Transkripte umschreiben kann, ist dieses Enzym für die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA gut geeignet. Die cDNA-Synthese erfolgte für 50 Minuten bei 42°C . Anschließend wurde das Enzym durch die Zugabe von 0,1 M EDTA und 1 mg/ml Glycogen inaktiviert. Die cDNA-Probe wurde mit dem „Nukleotide Removal Kit“ von überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Der Einbau der [α - ^{33}P]dATPs in die cDNA wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt, wobei die markierte Probe mindestens 2×10^6 cpm aufweisen sollte. Die noch in der cDNA-Probe vorhandene RNA wurde durch eine alkalische Hydrolyse mit 10 μ l 1M NaOH und 10 mM EDTA bei 68°C in 20 Minuten degradiert, danach wurden die Proben mit 112,5 μ l 1M NaH_2PO_4 bei 68°C für 10 Minuten neutralisiert. Repetitive Sequenzen in der markierten cDNA-Probe wurden durch Zugabe von 2,5 μ g Cot-1-DNA zu der cDNA-Probe abgesättigt.

2.2.6.3. Hybridisierung der cDNA-Arrays

Die „Atlas-Human-1.2-Cancer-Arrays“ (= Filter) bestehen aus einer positiv geladenen Nylonmembran, auf der cDNA-Fragmente von 1176 tumorassoziierten menschlichen Genen repräsentiert sind. Auf dem Array sind außerdem 9 konstitutiv exprimierte Gene („House-Keeping-Gene“) als Positivkontrollen (z.B. Tubulin, beta-Aktin, GAPDH, etc) sowie Bakteriophagen-DNA als Negativkontrollen und genomische DNA zur Bestimmung der DNA-Kontamination der Proben, immobilisiert. Je Gen sind auf dem Filter 10 ng +/- 2 ng cDNA (PCR amplifiziert, mit einer Länge von 400-600 bp) aufgetragen.

Nachdem die Arrays luftblasenfrei in eine Rollflasche eingelegt wurden, erfolgte für mindestens 2 Stunden bei 68°C eine Vorhybridisierung mit 5 ml ExpressHyb Solution und 100 µg denaturierter Salmon-Testis-DNA pro ml Hybridisierungslösung. Die Denaturierung der Salmon-Testis-DNA erfolgte für 5 Minuten bei 99°C. Salmon-Testis-DNA dient der Blockierung unspezifischer Bindungen der cDNA-Fragmente auf der Nylonmembran. Danach erfolgte die Hybridisierung der markierten cDNA-Proben bei 68°C über Nacht. Die Membranen wurden vier Mal mit geringer Stringenz in Waschlösung-1 (2x SSC, 1% SDS) und einmal mit hoher Stringenz in Waschlösung-2 (0,1x SSC, 0,5% SDS) bei 68°C für jeweils 20 Minuten gewaschen und danach feucht in eine Folie eingeschweißt.

Die auf die Arrays hybridisierte cDNA- Probe kann durch 10-minütige Inkubation der Arrays in kochender SDS-Lösung (0,1% (v/v) SDS) wieder von den Filtern entfernt werden. Nach dem Erkalten der SDS-Lösung wurde die Membran kurz in Waschlösung-1 (2x SSC, 1% SDS) gewaschen und feucht in eine Folie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.2.6.4. Datenanalyse

Für 72 Stunden wurde eine Phosphoimagerplatte auf die eingeschweißte Membran aufgelegt und mit einem Phosphoimager (Fuji Bas 3000) bei einer Auflösung von 100 µm eingescannt. Die exprimierten Gene erscheinen dabei als punktförmige Signale. Da der Fuji Bas Phosphoimager nur transformierte „TIFF-Files“ generiert, wurden die Bilder mit der „Im2tiff Software“ von Raytest zu linearen „TIFF-Files“ konvertiert, damit die Stärke der Genexpression proportional zum Schwärzungsgrad war und mit der Imagene 4.2 Software digitalisiert werden konnte.

Zur Datenanalyse wurden die entsprechenden lokalen Hintergrundwerte vom Signalwert subtrahiert. Negative Werte wurden auf null gesetzt, da in diesem Fall der Wert des Hintergrundes höher war als der Signalwert, so dass das entsprechende Gen auf jeden Fall nicht exprimiert vorlag. Für den Vergleich der Daten wurde eine gemeinsame Referenz berechnet, die auf der mittleren Expression aller Gene der zu vergleichenden Proben basierte. Die Expression der Gene auf den Arrays wurde dann auf der Basis des Mittelwertes der Referenz normalisiert. Um die normale Variabilität zwischen replizierten Experimenten zu zeigen, wurden Parallelhybridisierungen mit MCF-7 Zellen durchgeführt. Im Scatterplot konnte die Variabilität sowohl von Parallelhybridisierungen sowie differenziell exprimierten Genen von MCF-7 Zellen zu normalem Brustgewebe gezeigt werden. Ein Genexpressionsverhältnis zwischen zwei zu vergleichenden Proben von kleiner 0,5 oder größer 2 wurde als differenziell exprimiert eingestuft, wenn mindestens einer der beiden Genexpressionenswerte einen Absolutwert größer als 1 zeigte, d.h. eine Genexpression aufwies. Diese Methode wurde durchgeführt, damit nicht infolge der Division durch sehr

kleine Zahlen vermeintlich differenziell exprimierte Gene angezeigt werden, die sich in Wirklichkeit als nicht exprimiert herausstellen.

Die Unterschiede zwischen KM-positiven und KM-negativen bzw. LK-positiven und LK-negativen Genexpressionsprofilen wurden für jedes Gen mittels des Student's *t-Test* an log₂-transformierten Daten vorgenommen und nur die Gene, die signifikante Unterschiede zeigten ($p < 0,05$), wurden als differenziell exprimiert angesehen. Die stark differenziell exprimierten Gene wurden mit der SAM-(Significance Analysis of Microarrays)-Software verifiziert (Tusher et al., 2001). Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Ansatz nach spezifischen Genprofilen mit der Software zur Clusteranalyse von Eisen analysiert (Eisen et al., 1998). Hierfür wurden die Daten log-transformiert, median zentriert und auf mindestens 80% der Daten für jedes Gen gefiltert. Außerdem wurde ein hierarchisches „Clustering“ vorgenommen, wodurch differenziell exprimierte Gene in rot-zu-grün-Unterschieden in „TreeView“ identifiziert werden konnten.

2.2.7. Northern-Blot zur Verifizierung der cDNA-Array-Daten

2.2.7.1. Präparation spezifischer Northern-Blot-Sonden mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als „Sonden“ bezeichnet man spezifische, einzelsträngige DNA-Moleküle, die nach radioaktiver Markierung zum Nachweis bestimmter Populationen von RNA- oder DNA-Molekülen im Northern- bzw. Southern-Blot dienen.

Um diese DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurde eine Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction: PCR) durchgeführt. Bei dieser Methode sind zwei Oligonukleotidprimer, die ein zu amplifizierendes DNA-Fragment einrahmen, so angeordnet, dass die DNA-Synthese zwischen ihnen verläuft und der betreffende DNA-Abschnitt verdoppelt wird. Durch mehrfache Wiederholung von Zyklen aus Denaturierung, Primerbindung (Annealing) und Kettenverlängerung (Extension) können spezifische DNA-Fragmente schnell exponentiell angereichert werden.

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Pro Ansatz wurden in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

- 5 µl 10 x Reaktionspuffer
- 1 µl 3'-Primer (100 pmol/µl)
- 1 µl 5'-Primer (100 pmol/µl)
- 1 µl dNTP-Mix (je 5 mM dATP, dCTP, dTTP und dGTP)
- 1 µl AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 40 µl H₂O
- 1 µl Template

Als Template wurde der CK-19 und STAT-1 cDNA-Klon (Clontech) eingesetzt. Die eingesetzte Menge an Template betrug 500 ng cDNA. Die PCR-Reaktion wurde in einem Heizblock von Biozym durchgeführt, Anlagerungstemperaturen für die Primerbindung wurden entsprechend der eingesetzten Primer nach einer Faustregel berechnet: für jedes A/T-Nukleotid wurden 2°C und für jedes G/C-Nukleotid 4°C angesetzt und vom Ergebnis 5°C abgezogen. Die Extensionszeit wurde entsprechend der Länge des zu erwartenden Fragmentes gewählt (mindestens 1 Minute, bei Fragmentlängen über 1 kb 1,5 Minuten). Die Isolierung der erhaltenen Fragmente erfolgte über präparative TAE-Agarosegele (Kap. 2.2.4.).

2.2.7.2. Radioaktive Markierung von Sonden durch PCR und Nicktranslation

Um eine höhere Sensitivität zu erreichen, wurden die Sonden für den Northern-Blot mittels PCR mit [α -³²P]dCTP markiert, da so im idealen Fall jedes in der Sonde vorkommende Cytosin radioaktiv markiert vorliegt. Dabei darf die Konzentration des Templates nicht zu hoch sein, da sonst bei der Hybridisierung zu viele unmarkierte DNA-Sonden mit den markierten Sonden konkurrieren, so dass die Sensitivität sinkt. Die Reaktion erfolgte wie die in Kap. 2.2.7.1. beschriebene PCR-Reaktion.

Pro Ansatz wurden in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 1 µl 3'-Primer (100 pmol/µl)
- 1 µl 5'-Primer (100 pmol/µl)
- 1 µl dNTP-Mix (je 5mM dATP, dCTP und dGTP)
- 5 µl [α -³²P]dCTP (50 µCi)
- 1 µl AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 31 µl H₂O
- 5 µl Template (5 pg cDNA-Sonde)

Die PCR-Probe wurde vor der Hybridisierung mit dem „Nukleotide Removal Kit“ von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt.

Die GAPDH-Kontrollsonde wurde mit dem „ReadyPrime-Kit“ mittels Nicktranslation entsprechend der Angabe des Herstellers markiert. Da in allen Zellen GAPDH stark exprimiert vorliegt, musste die sensitive Methode der radioaktiven Markierung mittels PCR in diesem Fall nicht angewendet werden.

2.2.7.3. Auftrennung der RNA in einem denaturierenden Agarosegel

Die Auftrennung der RNA-Moleküle erfolgte elektrophoretisch in einprozentigen Agarose/Formaldehydgelen. Dazu wurden 0,5 g Agarose mit 36,6 ml H₂O aufgeköcht und auf etwa 70°C abgekühlt. Die Agaroselösung wurden mit 5 ml 10x MOPS-Puffer, 9 ml 37% Formaldehyd und 2,5 µl SYBR Gold versetzt und in eine Gelvorrichtung gegossen (durch eine Inkubation über Nacht mit einprozentiger H₂O₂-Lösung wurde die benötigte Gelvorrichtung RNase-frei). Die präzipitierte RNA wurde in 5,5 µl H₂O gelöst und mit 1 µl 10x MOPS-Puffer, 3,5 µl 37% Formaldehyd und 10 µl Formamid (deionisiert) gemischt. Danach wurden diese Ansätze 15 Minuten bei 55°C denaturiert und nach kurzer Inkubation auf Eis mit 2,2 µl Ladepuffer (50% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,4% (w/v) Bromphenolblau und 0,4% (w/v) Xylencyanol) versetzt. Die Elektrophorese wurde in 1x MOPS mit 50 V in einer kleinen BIORAD-Gelkammer für 3 Stunden durchgeführt. Um die Position und die Intensität der 18 S- und 28 S-rRNA zu dokumentieren, wurde das Gel unter UV-Licht photographiert. Intakte RNA zeigt zwei deutliche Banden der 18S und 28S Ribosomen bei etwa 1,9 kb bzw. 4,7 kb ohne Anzeichen von Degradationen unter 1,9 kb.

Für die Durchführung des Kapillarblots wurde eine Wanne mit RNase-freiem 10x SSC-Puffer gefüllt und eine Glasplatte teilweise darüber gelegt. Jeweils zwei mit 10x SSC angefeuchtete Streifen Whatman-Papier wurden über Kreuz auf die Glasplatte gelegt und hingen von beiden Seiten der Platte in den Puffertank. Das Formaldehydgel wurde auf das Whatman-Papier aufgelegt und luftblasenfrei mit der zurechtgeschnittenen, in 10x SSC angefeuchteten Nylonmembran, bedeckt. Der Geltank und das Whatman-Papier um das Gel wurden mit Frischhaltefolie abgedeckt, um die Kapillarwirkung zu erhöhen und um eine Verdunstung und eine sich somit ändernde 10x SSC-Ionenkonzentration zu verhindern. Auf die Membran wurden vier trockene Lagen Whatman-Papier (3 mm) in der Größe des Gels und ein circa 10 cm hoher Stapel Zellstoff gelegt. Das Ganze wurde wieder mit einer Glasplatte bedeckt und mit einem Gewicht von 2 kg beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht für 24 - 36 Stunden. Anschließend wurde die Membran unter UV-Licht kontrolliert; da das SYBR Gold auch transferiert wurde, konnte die Effizienz der RNA-Übertragung überprüft werden. Die RNA wurde in einem Cross-Linker an die Membran fixiert. Zur Vermeidung von Hintergrundsignalen bei der Hybridisierung aufgrund von Salzkristallen, wurde die Membran zuerst in 2x SSC und dann in destilliertem RNase-freiem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Membran bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.7.4. Hybridisierung des Northern-Blots

Die Bedingungen für die Prähybridisierung, die Hybridisierung und das Waschen von Northern-Blot-Membranen sind denen der cDNA-Array-Hybridisierungen sehr ähnlich. Die mit 2 x SSC angefeuchtete Blotmembran wurde luftblasenfrei in die Rollflaschen eingelegt. Pro Rollflasche wurden 5 - 8 ml Hybridisierungslösung (ExpressHyp-Solution von Clontech) eingefüllt. Die Prähybridisierung erfolgte für mindestens 2 Stunden bei 68°C. Danach wurde die Hybridisierungslösung gewechselt, die radioaktiv markierte Sonde für 5 Minuten bei 99°C denaturiert und zu der Hybridisierungslösung pipettiert, wobei 1- 2x 10⁶ cpm eingesetzt wurden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Am nächsten Tag wurde der Blot zweimal 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Waschpuffer-1 (2x SSC mit 0,05 % (v/v) SDS) und zweimal 20 Minuten bei 50°C mit Waschpuffer-2 (0,1x SSC, 0,1 % (v/v) SDS) gewaschen. Die Membran wurde feucht in eine Folie eingeschweißt und eine Phosphoimagerplatte wurde für 6-24 Stunden aufgelegt.

Einmal auf Nylonmembranen hybridisierte Sonden können wieder von der gebundenen RNA entfernt (= gestrippt) und die Membran erneut mit einer anderen Sonde hybridisiert werden. Die radioaktiv markierte Probe wurde durch 10-minütige Inkubation der Membran mit kochender SDS-Lösung (0,1 % (v/v) SDS) von der Membran entfernt. Nach dem Erkalten der SDS-Lösung wurde die Membran feucht in eine Folie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.2.8. FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)

Die FISH- Analyse erlaubt den direkten und präzisen Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes in den zu untersuchenden Zellen. Dazu werden Gewebeschnitte oder fixierte Zellen nach entsprechender Vorbehandlung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden hybridisiert. Die Vorbehandlung des Gewebes für die in-situ-Hybridisierung ist ein kritischer Punkt, der das Ergebnis des gesamten Versuches stark beeinflusst. Besonders drei Anforderungen müssen dabei erfüllt werden: 1. der Verlust von Nukleinsäuren aus den Gewebezellen muss reduziert werden; 2. die Gewebemorphologie soll erhalten bleiben und 3. die Sonde muss in das Gewebe eindringen können. Die *ERBB-2 (HER-2/NEU)*-FISH-Analyse wurde mit dem „PathVysion™ *HER-2/NEU*-DNA-Probe-Kit“ bestimmt, das eine Mischung aus Spektrum-Orange-Fluorophor-markierter DNA-Sonde für das *ERBB-2*-Gen, Spektrum-Grün-Fluorophor-markierter α -Satelliten-DNA-Sonde für das Chromosom 17 und DNA zur Blockierung unspezifischer Sequenzen in vordenaturiertem Hybridisierungspuffer enthält.

Mit diesem Test können *ERBB-2*-Genamplifikationen von Polyploidien des Chromosoms 17 unterschieden werden. Die *MYC*-FISH-Analyse wurde mit einer Spektrum-Orange-Fluorophor-markierten DNA-Sonde für das *MYC*-Gen durchgeführt.

Für die FISH-Analyse von in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe wurden 7 µm dicke Paraffinschnitte auf positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) aufgezogen und über Nacht bei 56°C erhitzt. Danach wurden die Schnitte zur Entparaffinisierung zweimal 10 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend dreimal 2 Minuten in 100% Ethanol gespült. Die Fixierung erfolgte für 10 Minuten bei –20°C in einer zwei-prozentigen Formaldehydlösung (in Methanol). Dann wurden die in destilliertem Wasser gewaschenen Schnitte 15 Minuten bei 96°C in einem Puffer (Spot-Light Tissue-Heat-Pretreatment-Buffer) inkubiert und bei 37°C einem Pepsinverdau entsprechend des Herstellerprotokolls unterzogen, um der Sonde das Eindringen in den Zellkern zu ermöglichen. Nach Dehydrierung mit 80%, 96% und 100% Ethanol wurden 10-20 µl Spektrum-Orange-Fluorophor-markierter DNA-Sonden für das *ERBB-2*-Gen auf die Gewebeschnitte aufgebracht und mit Fixogum umschlossen. Die Menge der verwendeten Sonde hing von der Größe des zu bedeckenden Gewebeareals ab. Für die *MYC*-FISH-Analyse wurden 1 µl Spektrum-Orange-Fluorophor-markierte DNA-Sonde für das *MYC*-Gen, 2 µl Wasser und 7 µl Hybridisierungspuffer (Vysis) bestehend aus Dextransulfat, Formamid und SSC gemischt und auf die Schnitte pipettiert. Die gemeinsame Denaturierung der Schnitte mit der Sonde wurde für 5 Minuten bei 94°C durchgeführt. Die Hybridisierung der Schnitte erfolgte über Nacht bei 37°C in einem FISH-Heizblock für die PCR-Maschine. Danach wurde das Fixogum vorsichtig entfernt, das Deckgläschen in 2x SSC/0,3% NP-40 Puffer abgewaschen und die Schnitte für 5 Minuten mit 2x SSC/0,3% NP-40 Puffer (73°C) gewaschen. Nach der Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (80%, 96% und 100% Ethanol) wurden die Objektträger luftgetrocknet, mit einem Tropfen Mountingmedium mit DAPI (Vectashild) eingedeckelt und mit Nagellack umschlossen.

Die Objektträger wurden mit einem Mikroskop, ausgestattet mit DAPI-, Cy3- und FITC-Filtern und einem Bilddokumentationsprogramm der Firma Applied Imaging, ausgewertet. Zur Detektion der Spektrum-Orange-markierten-Sonde wurde der Cy3- und zur Detektion der Spektrum-Grün-markierten-Sonde der FITC-Kanal verwendet. Im DAPI-Kanal konnte mit dem in die DNA interkalierten DAPI der Zustand der Zellkerne überprüft werden. Nur invasive Tumorteile wurden für die Bewertung der FISH-Analyse verwendet. Die Signalauswertung erfolgte bei einer 400 oder 1000-fachen Vergrößerung. In Fällen einer offensichtlichen Genamplifikation (mehr als 10 Signale pro Kern oder Cluster) wurden nur 20-40 Kerne untersucht, sonst wurden 40 Kerne ausgewertet. Tumore mit bis zu 4 Signalen pro Kern wurden als nicht-amplifiziert eingestuft.

2.2.9. Array-CGH

Die CGH (Comparative Genomic Hybridization) ist eine molekularzytogenetische Methode, die chromosomale Abberationen entlang des Genoms nachweist, wobei Tumor- und Referenz-DNA gleichzeitig auf normalen Metaphasechromosomen hybridisiert werden. Bei der Array-CGH werden anstelle von Metaphasechromosomen Glasobjektträger mit 2469 in Triplikaten aufgespotteten BAC¹ Klonen (=Arrays) verwendet. Jeder Klon enthält mindestens ein STS (Sequence Tagged Site), so dass eine Zuordnung zur Genomsequenz ermöglicht wird (siehe Abb. 2.2).

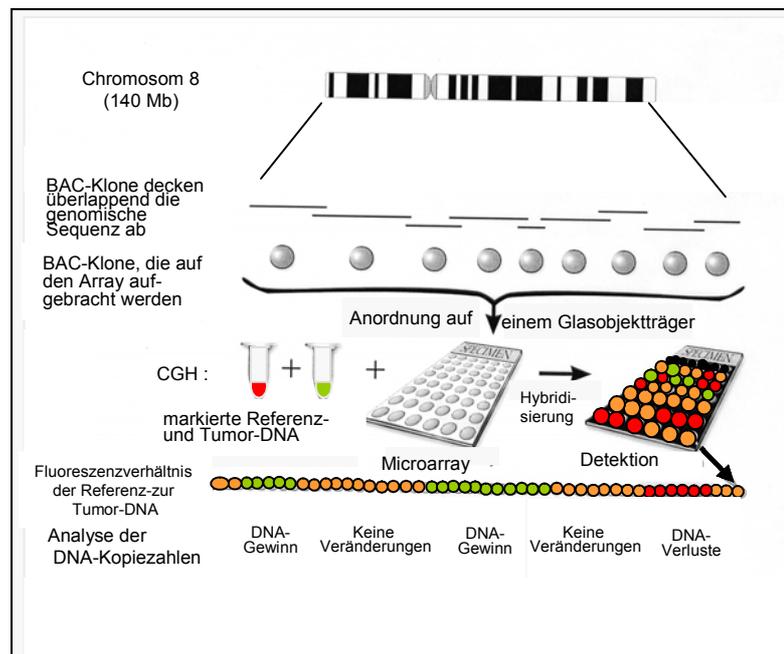


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Array-CGH-Reaktion von der Arrayherstellung bis zur Analyse am Beispiel von Chromosom 8. Auf dem in dieser Arbeit beschriebenen Array befinden sich in Triplikaten aufgespottete BAC-Klone, die das Gesamtgenom abdecken. Die Hybridisierung ist in Kap. 2.2.9.2. beschrieben.

2.2.9.1. Isolierung von DNA aus Paraffingewebe

Zur Isolierung der DNA aus Paraffingewebe für die Array-CGH wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte auf positivgeladene Glasobjektträger (Superfrost Plus) aufgezogen und über Nacht bei 56°C inkubiert. Auf die Entparaffinisierung von zweimal 10 Minuten in Xylen folgte eine Hydrierung mit 100%, 96%, 80% Ethanol zu destilliertem Wasser. Die Zellkernfärbung zur Identifizierung von Tumorzellen wurde für 30 Sekunden in einer Methylgrünlösung (0,1 %

¹ Bacterial Artificial Chromosom

(w/v) in Wasser) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Unter einem inversen Lichtmikroskop wurden die Tumorzellen mit einer sterilen 27 G Injektionsnadel manuell mikrodissiziert und in 180 µl ATL Puffer des „QIAamp DNA-Mini-Kits“ und 20 µl Protease K (20 mg/ml) für 60 Stunden bei 56°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Durch die verlängerte Proteinase-K-Inkubation (im Vergleich zu den vom Hersteller empfohlenen 3 Stunden) wurde die Ausbeute an hochmolekularer DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe erheblich erhöht, was mit der teilweisen Aufhebung der durch Formalin induzierten Komplexe zwischen nukleären Proteinen und DNA zusammenhängen könnte. Die weitere DNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.9.2. Hybridisierung der Array-CGH

Die Array-CGH erfolgte wie von Snijders et al. beschrieben (Snijders et al., 2001). Die Methode, die von Dr. Richard Seagraves im Labor von Donna Albertson am UCSF (Comprehensive Cancer Center) in San Francisco durchgeführt wurde, sieht folgendermaßen aus:

In einer PCR-Reaktion mit randomisierten Primern, die unspezifisch statistisch alle 3000-4000 Basenpaare an die DNA binden, wurden 0,5 µg genomische DNA (Tumor- bzw. Referenz-DNA) amplifiziert. Gleichzeitig erfolgte eine Markierung der Tumor-DNA mit Cy3-dCTP bzw. der Referenz-DNA mit Cy5-dCTP. Die gemeinsame Hybridisierung der Tumor-DNA mit der Referenz-DNA auf CGH Arrays erfolgte über Nacht. Die Hybridisierungsergebnisse wurden mit einem Laser Scanner in 16 Bit 1024 x 1024 Pixel DAPI-, Cy3- und Cy5-Bildern aufgenommen und mit der UCSF-SPOT Software ausgewertet, die die graphische Darstellung der Tumor- zur Referenz-DNA-Korrelationen durchführt. Für jedes Chromosom wurde das rot/grün Fluoreszenz-Verhältnis der Tumor- zur Normal-DNA entlang des Genoms aufgetragen. 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 $>0,5$ wurden in dieser Arbeit als DNA-Gewinne und Verhältnisse $< -0,5$ als DNA-Verluste bewertet. Für die Cluster-Analyse der Daten erhielten DNA-Gewinne den Wert 1, DNA-Verluste den Wert -1 und genomisch unauffällige Regionen den Wert 0. In einer hierarchischen Clusteranalyse wurden die Tumore mit der Clusteranalyse-Software von Eisen analysiert (Eisen et al., 1998). Mit dem „TreeView“- Programm konnte das Ergebnis der Clusteranalyse graphisch dargestellt werden.

2.2.10. Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte (8 µm) des Tumorgewebes, der Lymphknoten und der Gewebearrays wurden auf positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) aufgezogen und über Nacht bei 56°C erhitzt. Danach wurden die Schnitte zur Entparaffinisierung bei Raumtemperatur zweimal 10 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend mit 100%, 95% und 80% Ethanol hydriert. Die Färbung wurde nach 20-minütiger Mikrowellenvorbehandlung in Citratpuffer (10 mM, pH 7,8) auf dem DAKO-Färbeautomaten mit dem Maus-anti-human-CK-8-Antikörper (Konzentration 1:25), dem Maus-anti-human-CK-10-Antikörper (Konzentration 1:10), dem Maus-anti-human-CK-18-Antikörper (Konzentration 1:100), dem Maus-anti-human-CK-19 - Antikörper (Konzentration 1:10), dem Maus-anti-human-Plakoglobin-Antikörper (Konzentration 1:20), dem Maus-anti-human-RHOB-Antikörper (Konzentration 1:500), dem Maus-anti-human-TGF-β-2-Antikörper (Konzentration 1:50), dem Maus-anti-human-STAT-1-Antikörper (Konzentration 1:2000), dem Maus-anti-human-HER-2/NEU- Antikörper (Konzentration 1:100) und dem Maus-anti-human-HIF-1α-Antikörper (Konzentration 1:1000), und dem „DAKO ChemMate™ Detection Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei auf die Inkubation des Primärantikörpers die Inkubation mit biotinyliertem Ziege-anti-Maus-Immunglobulin (10 Minuten) und Streptavidin gekoppelt an Meerrettich Peroxidase (10 Minuten) folgte. Die Stockkonzentrationen der Antikörper sind in Kap. 1.2.3.2. aufgelistet. Bezüglich der Lymphknotenfärbung wurde der Maus-anti-human-EMA Antikörper (Konzentration 1:100) eingesetzt. Die Substratentwicklung erfolgte mit 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen in gepufferter Lösung mit Hydrogenperoxid. Dann wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt.

Die Färbung wurde nach dem Remmele Score beurteilt. Dieser Score ist ein Produkt aus der Farbintensität (0: keine Färbung; 1: schwache Färbung; 2: mittelstarke Färbung; 3: starke Färbung) und dem Prozentsatz gefärbter Tumorzellen (0: keine gefärbten Tumorzellen; 1: <10%; 2: 11-50%; 3: 51-80%; 4: >80% gefärbte Tumorzellen).

2.2.11. Hämalaun/Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Bei der Hämalaun/Eosin-Färbung handelt es sich um eine kombinierte Kern- und Plasmafärbung. Während das positivgeladene Hämalaun in stark saurem Milieu mit den Nukleinsäuren des Chromatins Bindungen eingeht, und nach der Erhöhung des pH-Wertes über 3,0 zu einer blauen Kernfärbung führt, entsteht mit Eosin eine rote Plasmafärbung.

Die über Nacht bei 56°C gebackenen Paraffinschnitte wurden zuerst zweimal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und dann in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96% und 80%

Ethanol) hydriert. Nach einer kurzen Inkubation in Wasser wurden die Schnitte für 7 Minuten in Mayer's Hämalaun Lösung gestellt. Danach wurden die Schnitte in Leitungswasser gespülen, kurz in Salzsäure/Ethanol eingetaucht und dann 10 Minuten mit Leitungswasser gewässert. Dann folgte die Eosinfärbung für 30 Sekunden. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser und einer aufsteigenden Ethanolreihe (80%, 96% und 100% Ethanol) wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in Xylol inkubiert und mit Entellan eingedeckelt.

2.2.12. Herstellung des Mikrometastasenarrays

Anhand von Paraffinschnitten, die wie in Kap. 2.2.11. beschrieben Hämalaun/Eosin gefärbt wurden, konnten repräsentative Tumorregionen definiert werden. Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm wurde mit einem Arrayer aus einer ausgewählten Region des „Spender“-Blocks gestanzt und in einen „Empfänger“-Paraffinblock eingesetzt, der dann wie normale Paraffinblöcke an einem Schlittenmikrotom geschnitten werden konnte (Abb. 2.3). Zuvor wurde der Empfängerblock 30 Minuten bei 37°C erwärmt, damit sich das Paraffin des Empfängerblocks mit dem Paraffin der Stanzen verbindet, so dass die Stanzen beim Schneiden und der nachfolgenden Färbung nicht abschwimmen.

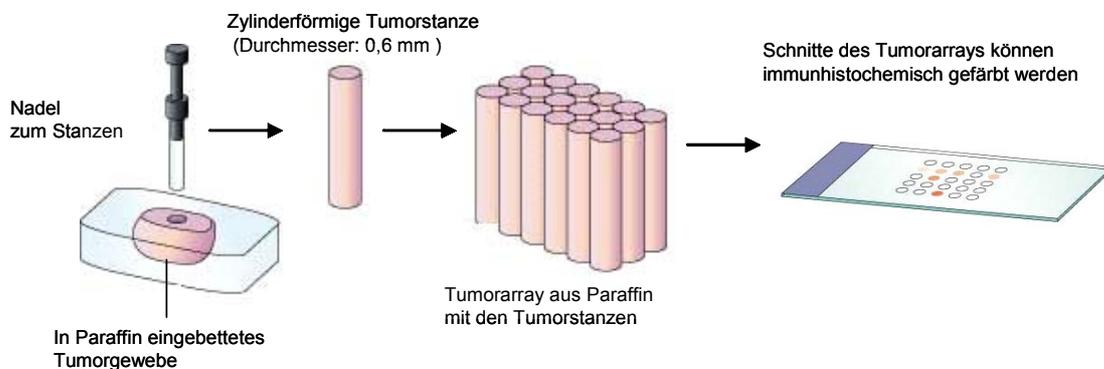


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Herstellung von Gewebearrays.

2.2.13. Statistische Auswertungen

2.2.13.1. Chi-square -Test

Der Chi-square Test wurde benutzt, um die Beziehung zwischen der Zytokeratinexpression und traditionellen Risikofaktoren zu bestimmen. Die Tumorproben wurden gruppiert in normale Proteinexpression (100% gefärbte Tumorzellen) und reduzierte Proteinexpression (weniger als 100% gefärbte Tumorzellen). Die normale Zytokeratinexpression entsprach der Proteinexpression in normalen (nicht malignen) Epithelzellen der Brustdrüse.

2.2.13.2 Univariate Analyse

Kaplan-Meier Kurven (Kaplan et al., 1958) wurden für jeden getesteten Marker auf dem Prognosearray für das Gesamtüberleben und das tumorassoziierte Überleben bestimmt. Wenn der beobachtete Effekt des Markers in Bezug auf das Gesamtüberleben bzw. das tumorassoziierte Überleben größer war als die übliche Streuung der Messwerte, wurde das gefundene Ergebnis als statistisch „signifikant“ ($p > 0,05$) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ bewertet. Die Analysen wurden mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für PC (Version 11 für Windows) durchgeführt.

2.2.13.3. Multivariate Analyse

Die Unabhängigkeit der aus der univariaten Analyse als signifikant hervorgegangenen Marker wurde anschließend in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell zusammen mit pathologischen Tumordaten (z.B. Differenzierungsgrad, Tumorgröße) als Indikatorvariablen überprüft. Als statistisch signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ angesehen. Diese Analyse wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. J. Berger (Institut für Mathematik und Datenverarbeitung in der Medizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) mittels des Programms SPSS für PC (Version 11 für Windows) durchgeführt.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollen Genexpressionsmuster des primären Mammakarzinoms identifiziert werden, die entweder für die hämatogene Disseminierung ins Knochenmark (KM) oder die lymphogene Disseminierung in die regionalen Lymphknoten (LK) verantwortlich sind.

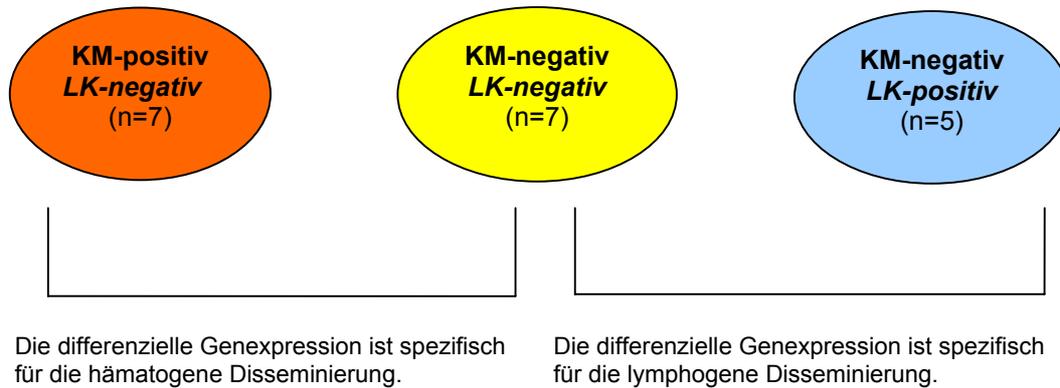
3.1. Methodische Aspekte

3.1.1. Nachweis von hämatogen bzw. lymphogen disseminierten Tumorzellen

Die Detektion von hämatogen ins Knochenmark disseminierten Tumorzellen erfolgte wie in Kap. 2.2.2. und 2.2.3. beschrieben an KM-Aspiraten mit einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender immunhistochemischer Färbung auf Einzelzellebene. Die disseminierten Tumorzellen können mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen ein gemeinsames Epitop verschiedener Zytokeratine gerichtet ist, gefärbt werden. Die prognostische Relevanz dieser im KM detektierten zytokeratinpositiven Zellen wurde in Kap. 1.3.1. dargestellt. Primärtumore von Patientinnen mit bzw. ohne disseminierte Tumorzellen im KM werden in dieser Arbeit jeweils als KM-positiv oder KM-negativ bezeichnet.

Um lymphogen metastasierte Tumorzellen zu detektieren, wurden von allen Mammakarzinompatientinnen zwischen 10 und 20 regionale LK bei der Primäroperation entnommen. Paraffinschnitte des LK-Gewebes wurden mit Hämalaun-Eosin gefärbt und in der Abteilung für Gynäkopathologie auf das Vorhandensein von Tumorzellen untersucht. Um sicher zu stellen, dass die metastasenfreien LK auch keine einzelnen disseminierten Tumorzellen enthielten, wurde das in Paraffin eingebettete LK-Gewebe neben der Hämalaun-Eosin-Färbung auch mit einem monoklonalen Antikörper gegen das epitheliale Membranantigen (EMA) gefärbt. Da EMA nur auf normalen und neoplastischen Epithelzellen exprimiert wird, werden mesenchymale Lymphozyten mit diesem Antikörper nicht angefärbt (Kubuschok et al., 1999). Auf diese Weise können einzelne epitheliale Tumorzellen spezifisch in LK nachgewiesen werden. Alle LK, die in dieser Arbeit als metastasenfrem beschrieben wurden, zeigten auch in der EMA-Färbung ein negatives Färbeergebnis. Primärtumore von Patientinnen mit bzw. ohne LK-Metastasen werden in dieser Arbeit jeweils als LK-positiv bzw. LK-negativ bezeichnet.

Einteilung der Mammakarzinompatientinnen in dieser Studie:



Die Patientinnen wurden in drei verschiedene Gruppen unterteilt: 7 Patientinnen waren KM-negativ und LK-negativ (Referenzgruppe ohne nachweisbare Tumorzell-disseminierung), 7 Patientinnen waren KM-positiv und LK-negativ (Gruppe mit ausschließlich hämatogener Disseminierung) und 5 Patientinnen waren KM-negativ und LK-positiv (Gruppe mit ausschließlich lymphogener Disseminierung). Durch die differenzielle Genexpression zwischen Tumorgewebe von KM-positiven und KM-negativen Patientinnen, die LK-negativ waren, konnte spezifisch die hämatogene Disseminierung untersucht werden. Im Gegensatz dazu konnte mit der differenziellen Genexpression zwischen Tumorgewebe von LK-positiven und LK-negativen Patientinnen, die KM-negativ waren, spezifisch die lymphogene Disseminierung untersucht werden.

Da das Mammakarzinom sehr heterogen ist, wurde darauf geachtet, dass das untersuchte Mammakarzinomgewebe hinsichtlich klinisch-pathologischer Risikofaktoren (z.B. Tumorhistologie, Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorstatus) keine großen Unterschiede aufwies (siehe Tabelle 2.1). Die untersuchten Tumore waren alle pT1-2 (Tumorgröße < 5 cm) und die Patientinnen besaßen keine klinisch manifesten Metastasen. Auch bezüglich des Alters gab es zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

3.1.2. RNA-Isolation aus Gewebeschnitten

Die Mammakarzinomzellen wurden aus Gewebeschnitten von in flüssigem Stickstoff asserviertem Frischgewebe (= Kryoschnitte) durch manuelle Mikrodissektion isoliert, um eine Kontamination mit umgebenden stromalen Fibroblasten und Leukozyten zu vermeiden. Die histopathologische Auswertung der Tumorschnitte zeigte, dass Tumorproben des KM-

positiven Kollektivs generell eine signifikant höhere Lymphozyteninfiltration aufwiesen als Tumorproben des KM-negativen Kollektivs (siehe Tabelle 6.1 im Anhang).

Für die manuelle Mikrodisektion haben sich Schnittdicken von 7 µm bewährt, da in diesem Fall der Anteil intakter Zellen deutlich höher war als bei geringeren Schnittdicken und gleichzeitig einzelne Zellen unter dem Lichtmikroskop identifiziert werden konnten, ohne Zellüberlagerungen aufzuweisen. Zur genauen Identifikation des Tumorzellanteils auf den Kryoschnitten wurde ein Gewebeschnitt wie in Kap. 2.2.11. beschrieben mit Hämalaun-Eosin¹ gefärbt und von einem Pathologen begutachtet. Die für die manuelle Mikrodisektion eingesetzten Kryoschnitte wurden kurz in einer Methylenblau-Toluidin-Lösung (= Thiazin-farbstoffe) inkubiert, die die Zellkerne blau und das Zytoplasma violett anfärbte (Abb. 3.1). Diese in Kap. 2.2.6.1. beschriebene Färbung verursachte weder eine RNA-Degradation noch Einbußen in anschließenden RNA-basierten Analysen. Hämalaun-gefärbte Kryoschnitte konnten nicht für die Mikrodisektion verwendet werden, da bereits Spuren von Hämalaun in der aus den Tumorzellen isolierten Gesamt-RNA (aufgrund der Komplexbildung mit Mg²⁺-Ionen) nachfolgende enzymatische Reaktionen stören (Burck, 1982). Durch die manuelle Mikrodisektion wurde ein Tumorzellanteil der Tumorproben von mindestens 75% angestrebt (Abb. 3.1).

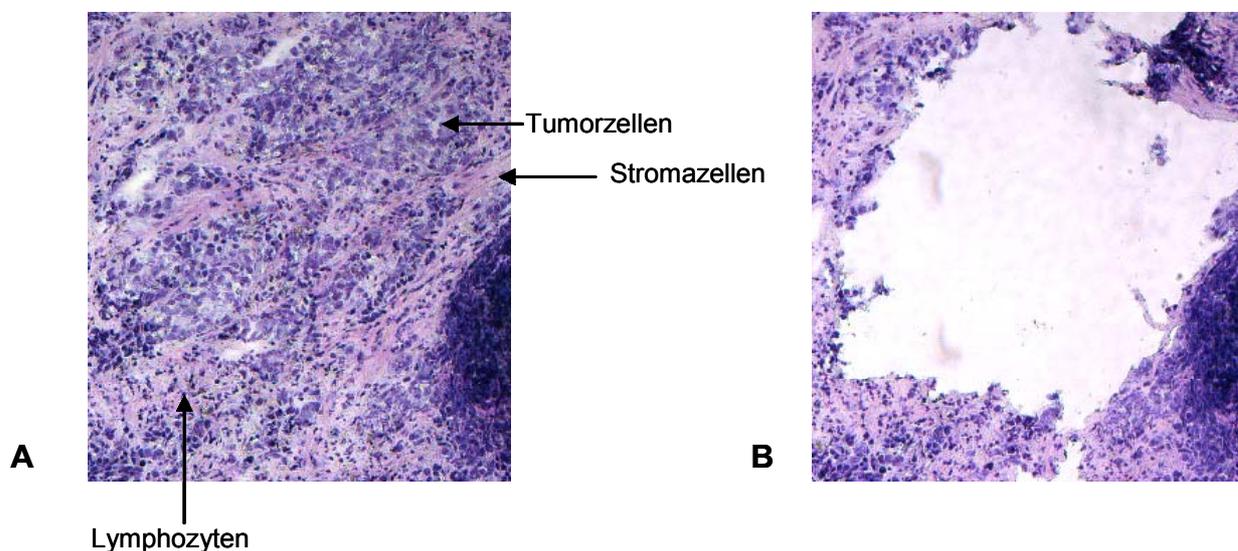


Abb. 3.1 Ein mit Methylenblau-Toluidin gefärbter Kryoschnitt (7 µm) des Mammarkarzinomgewebes Nr.10 (in Tabelle 2.1 dargestellt) (A) Gewebeschnitt vor der Mikrodisektion. Mit einem Pfeil sind Stromazellen und Lymphozyten markiert. (B) Gewebeschnitt nach der manuellen Mikrodisektion.

¹ Hämalaun ist eine stark positiv geladene Komplexverbindung aus Hämatein (= Oxidationsprodukt des Hämatoxylin) und Alaun (Metallsulfat), das die negativ geladenen Zellkerne deutlich blau anfärbt. Mit Eosin wird das Zytoplasma rot gefärbt.

3.1.3. Reproduzierbarkeit und Plausibilitätskontrollen

Die Genexpressionsanalyse wurde mit dem 1.2-Cancer-Array durchgeführt, der insgesamt 1176 tumorassoziierte Gene enthält, die in verschiedene biologische funktionelle Kategorien eingeteilt werden können (Abb. 3.2).

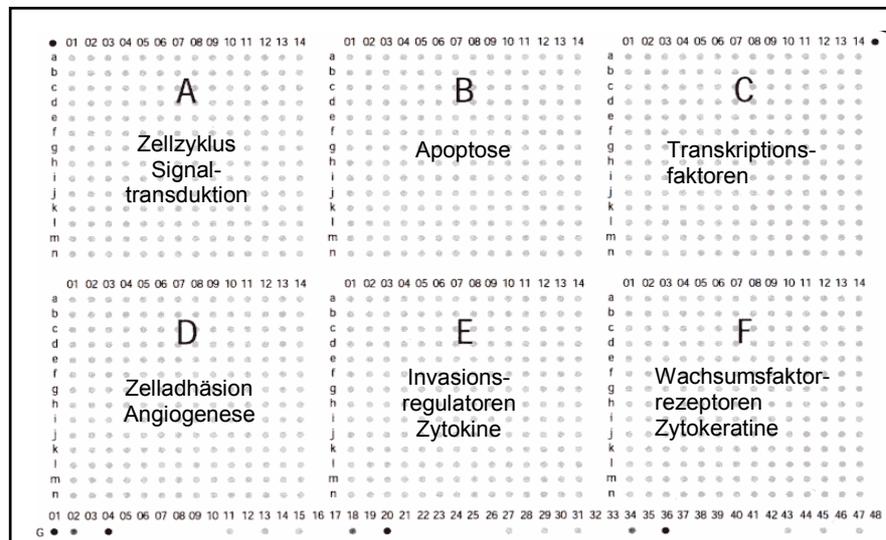


Abb. 3.2 Darstellung der Anordnung der funktionellen Gengruppen auf dem 1.2-Cancer-Array. Jeder Filter enthält immobilisierte cDNA von 1176 humanen Genen aus funktionell verwandten Gengruppen, die u.a. dem Zellzyklus, der Apoptose, der DNA-Reparatur, der Adhäsion, der Invasion oder den Wachstumsfaktoren zugeordnet werden können. Diese Gene sind in jeweils rechteckigen Gruppierungen auf dem Filter angeordnet und anhand ihrer Koordinaten identifizierbar. Unter G sind Bakteriophagen-DNA und cDNA von "House-Keeping-Genen" immobilisiert.

Um die Reproduzierbarkeit der Arrayergebnisse zu belegen, wurde in zwei parallelen Ansätzen Gesamt-RNA aus MCF-7 Zellen isoliert, während der cDNA-Synthese radioaktiv markiert und anschließend auf 1.2-Cancer-Arrays hybridisiert. Die Differenz zwischen diesen Duplikatexperimenten betrug maximal 10% und die Mehrzahl der Expressionssignale (92%) wurde reproduzierbar detektiert (Abb. 3.3 A). Diese Werte entsprechen den Daten von Huang et al., der zwischen Duplikathybridisierungen mit dem 1.2-Cancer-Array eine Differenz von 15% beschrieb (Huang et al., 2000).

Das Expressionsprofil von MCF-7 Zellen wurde zusätzlich mit dem Expressionsprofil von normalem Brustgewebe aus Reduktionsplastiken verglichen (Abb. 3.3 B), um die gewonnenen Ergebnisse mit veröffentlichten Daten zu vergleichen. Hierbei konnte die von Perou et al. beschriebene Hochregulierung von proliferationsassoziierten Genen (*Zyklin B1*, *Zyklin A*, *Proliferating-Cyclic-Nuclear-Antigen*) sowie von Transkriptionsfaktoren (*FOS-related-antigen*, *BMYB*) bestätigt werden (Perou et al, 1999).

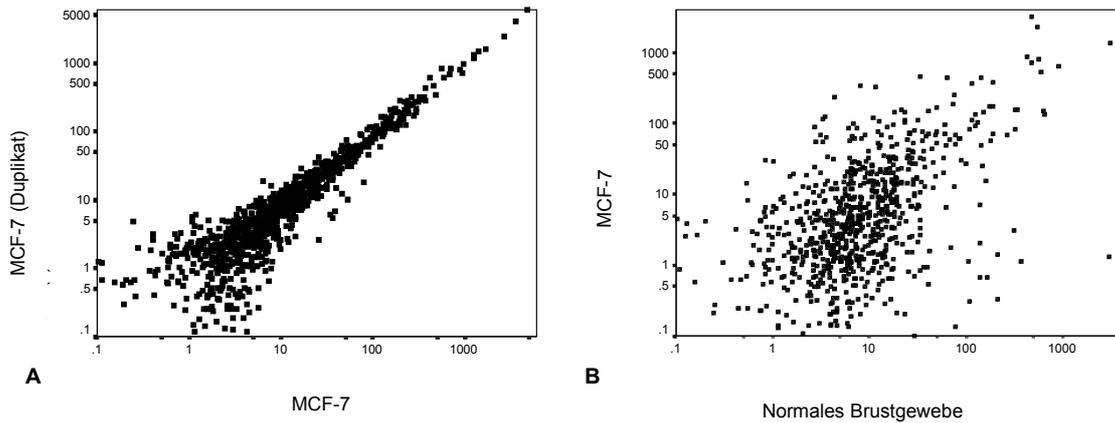


Abb. 3.3 Scatterplot, in dem die differenzielle Genexpression von zwei MCF-7 Gesamt-RNA-Proben (A) und MCF-7 Gesamt-RNA mit Gesamt-RNA aus histopathologisch normalem Brustgewebe (B) verglichen wurde. 5 µg Gesamt-RNA wurden bei der cDNA-Synthese radioaktiv markiert, auf 1.2-Cancer-Arrays hybridisiert und mit der Imogene 4.2 Software analysiert. Die Achsenskalierung ist logarithmisch.

Zur Verifizierung der differenziell exprimierten Gene zwischen normalem Brustgewebe und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde ein Northern-Blot wie in Kap. 2.2.7. beschrieben mit 7 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Für diese Validierung wurde jeweils ein Gen ausgesucht, das in MCF-7-Zellen im Vergleich zu normalem Brustgewebe eine erhöhte (*STAT-1*) bzw. eine erniedrigte (*CK-19*) Genexpression aufwies. Abb. 3.4 zeigt die Verifizierung der Array-Ergebnisse anhand der differentiellen Genexpression von *STAT-1* und *CK-19*.

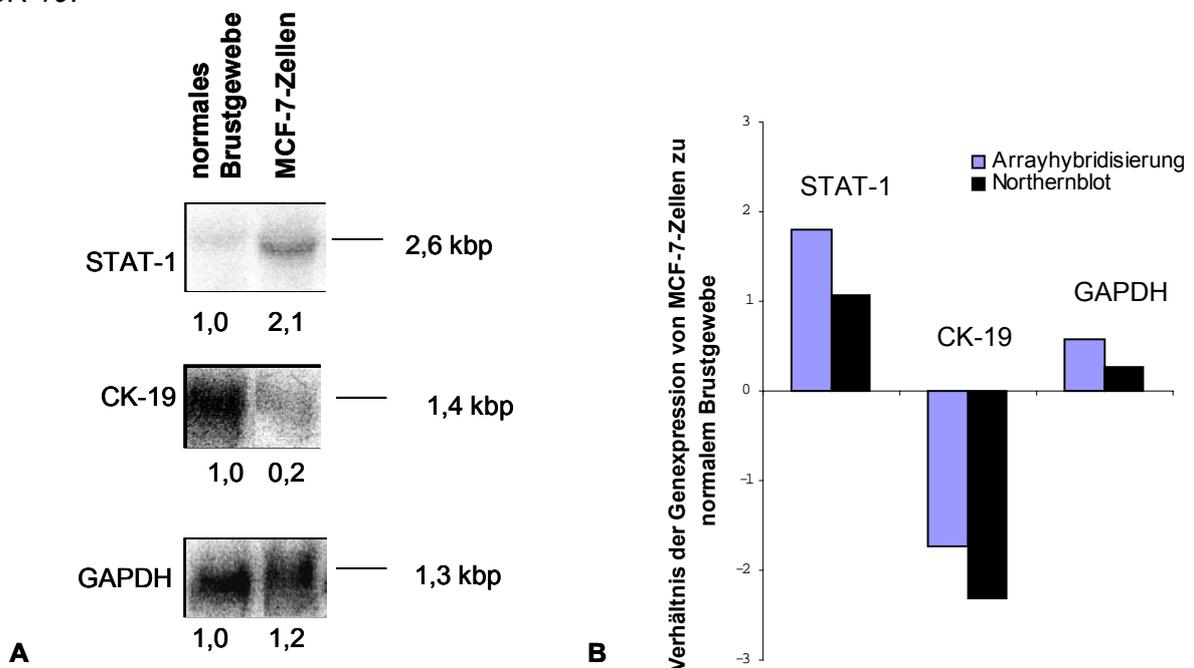


Abb. 3.4 Verifizierung der Genexpressionsdaten mit einem Northern-Blot. (A) Northern-Blot zum Nachweis der differenziell exprimierten Gene *STAT-1* und *CK-19* zwischen MCF-7-Zellen und normalem Brustgewebe. Der Expressionswert der mRNA relativ zum normalen Brustgewebe ist unterhalb der Banden vermerkt. Die Größe des entsprechenden Transkriptes ist rechts neben den Banden erwähnt. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) wurde als Hybridisierungskontrolle eingesetzt. (B) Das Verhältnis der differentiellen Genexpression von *CK-19*, *STAT-1* und *GAPDH* zwischen MCF-7 Zellen und normalem Brustgewebe aus dem Mikroarray-experiment wurde mit dem Ergebnis des Northern-Blots verglichen. Die Achsenskalierung ist logarithmisch.

3.1.4. Normalisierung und Ermittlung differenziell exprimierter Gene zwischen den Mammakarzinomproben

In dem Autoradiogramm der Array-Hybridisierung ist ein exprimiertes Gen als punktförmiges Signal zu erkennen. Abb. 3.5 zeigt das Autoradiogramm einer KM-positiven im Vergleich zu einer KM-negativen Mammakarzinomprobe.

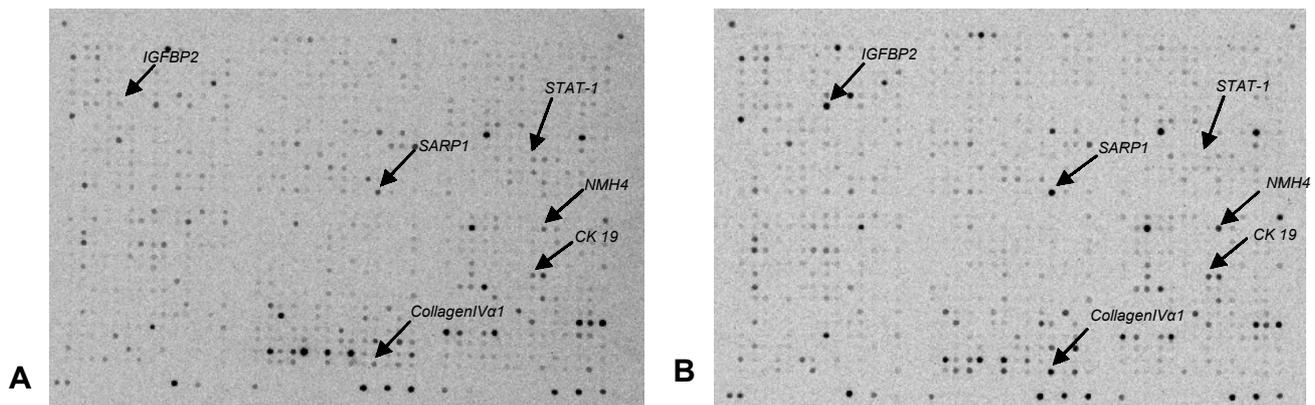


Abb. 3.5 Autoradiogramm der Arrayhybridisierung mit cDNA einer KM-positiven (A) und einer KM-negativen (B) Mammakarzinomprobe. Ein exprimiertes Gen ist als punktförmiges Signal zu erkennen. Mit den Pfeilen wird auf einige differenziell exprimierte Gene hingewiesen.

Um die Genexpressionsergebnisse zwischen den Mammakarzinomgeweben richtig vergleichen zu können, muss eine Normalisierung durchgeführt werden. Durch diese Normalisierung werden Unterschiede innerhalb einzelner Hybridisierungen aufgrund technischer Variationen (Markierungs- und Detektionseffizienz der Proben) ausgeglichen. Die Normalisierung wurde basierend auf allen exprimierten Genen durchgeführt. Dieser Normalisierungsansatz kann angewendet werden, wenn sich zwischen den zu vergleichenden Gruppen die Genexpression nicht stark unterscheidet. Da das untersuchte Mammakarzinomgewebe hinsichtlich klinisch-pathologischer Risikofaktoren einheitlich war, wurden zwischen den Genexpressionsergebnissen der Mammakarzinomgewebe nur relativ wenige differenziell exprimierte Gene erwartet. In einem zweiten Ansatz wurde überprüft, ob die Normalisierung mit den neuen auf dem 1.2-Cancer-Array vorhandenen „House-Keeping-Genen“ zu dem gleichen Ergebnis führt. In der Mehrzahl der Proben wiesen die Normalisierungsfaktoren (entweder aus allen exprimierten Genen oder aus den „House-Keeping-Genen“ errechnet) nur eine 1-5%ige Abweichung auf. Die Expression der „House-Keeping-Gene“ GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und HLAC (HLA-Klasse-I-Histokompatibilitätsantigen C-4 α) lag in zwei Proben allerdings erhöht vor (relativ zu den anderen „House-keeping-Genen“ in diesen Proben), so dass sich in diesen Fällen die Normalisierungsfaktoren um 69% unterschieden.

Gene, die nach der Normalisierung im zweiseitigen Student's *t-Test* zwischen den untersuchten Gruppen (KM-positiv zu KM-negativ bzw. LK-positiv zu LK-negativ) statistisch signifikant ($p < 0.05$) waren, wurden als differenziell exprimiert eingestuft. Der Student's *t-Test* wurde an log-2 transformierten Daten durchgeführt, um extreme Abweichungen einer Probe innerhalb einer Gruppe hinsichtlich der Expression eines Genes zu relativieren. Das mittlere Genexpressionsverhältnis zwischen der KM-positiven und KM-negativen Gruppe war in diesen Fällen entweder größer als 1,9 oder kleiner als 0,6. Die differenziell exprimierten Gene wurden mit der SAM-(Significance Analysis of Microarrays)-Software verifiziert, die mit einem Satz aus mehreren *t-Tests* die Normalverteilung und Verlässlichkeit der Daten errechnet (Tusher et al., 2001). Obwohl die RNA-Proben aus manuell mikrodissektiertem Gewebe gewonnen wurden, haben relativ wenige kontaminierende Lymphozyten möglicherweise einen großen Einfluss auf die Mittelwerte der Daten. Es zeigte sich, dass die Gene mit einer sehr hohen Variabilität innerhalb einer Gruppe überwiegend lymphozytenassoziierte Gene waren. Um den möglichen Einfluss von Lymphozyten-RNA in den Brusttumorproben zu bestimmen, wurde eine separate Arrayhybridisierung mit RNA aus mikrodissektierten Lymphozyten durchgeführt, die ein Mammakarzinomgewebe infiltrierten. Es zeigte sich, dass vier Gene in den Lymphozytenproben im Vergleich zu malignem Brusttumorgewebe sehr stark exprimiert vorlagen, die auch innerhalb der untersuchten Mammakarzinomgruppen eine variable Genexpression aufwiesen. Bei diesen Genen handelte es sich um das membrangebundene und sekretierte Immunglobulin- γ , die Immunglobulin-rearrangierte γ -Kette, die konstante Region der Immunglobulin-C- μ schweren Kette und das Immunglobulin-assoziierte 14.1-Protein. Die Genexpressionsdaten der Mammakarzinome wurden erneut analysiert unter Ausschluss dieser vier in Lymphozyten stark exprimierten Gene. Die erneute Analyse ergab nur geringfügige Veränderungen der Genexpressionsverhältnisse; insbesondere wurden keine weiteren differenziell exprimierten Gene gefunden.

3.2. Genexpressionsanalysen an primären Mammakarzinomen

3.2.1. Differenziell exprimierte Gene in der KM-positiven im Vergleich zur KM-negativen Gruppe

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein bestimmtes Genexpressionsmuster in primären Mammakarzinomen die frühe hämatogene Tumorzell dissemination begünstigt. Hierfür wurde wie in Kap. 3.1.1. beschrieben die Genexpression von jeweils 7 KM-positiven bzw. KM-negativen Mammakarzinomen vergleichend analysiert. Die klinisch-pathologische Daten der Patientinnen sind in Kap. 2.1.2.1. aufgeführt.

Die Analyse der Genexpressionsdaten mit dem Student's *t-Test* ergab 86 differenziell exprimierte Gene. Die differenziell exprimierten Gene werden in dieser Arbeit immer von der KM-positiven im Vergleich zur KM-negativen Gruppe angegeben. 77 Gene wiesen in der KM-positiven Gruppe eine verminderte und 9 Gene eine erhöhte Genexpression auf, d.h. es wurden mehr Gene mit einer verminderten als mit einer erhöhten Genexpression gefunden (siehe Tabelle 6.2 im Anhang). Auch die in der Literatur beschriebenen Metastasierungssuppressorgene zeigten in Tumoren von KM-positiven Patientinnen eine verminderte Genexpression (z.B. KISS-1 und Mitglieder der NM23-Metastasierungssuppressorfamilie: NME-3, NME-4).

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die Genexpressionsprofile der 14 Mammakarzinomgewebe mittels des Klassifikationsprogramms CLUSTER in der so genannten „unsupervised“² Methode des „hierarchischen Clusterings“³ mit Hilfe der Pearson-Korrelation analysiert. Der Algorithmus des Programms sortiert die Gewebeproben entsprechend ihres Genexpressionsprofils. Der Expressionswert eines Gens in einer Probe wird dabei als Verhältnis der transkriptionellen Expression dieses Gens zu der medianen transkriptionellen Expression des Gens bezogen auf alle Gewebeproben bestimmt. Das Ergebnis der Analyse wurde graphisch mit Hilfe des Programms TREE-VIEW dargestellt (Grüne Quadrate entsprechen einer reduzierten, rote Quadrate einer erhöhten, schwarze Quadrate einer unveränderten und graue Quadrate einer fehlenden Expression des betreffenden Gens). Das Dendrogramm oberhalb der Abb. 3.6 zeigt die Ähnlichkeiten der Gewebeproben in Bezug auf ihre Genexpressionsmuster. Eine geringe Distanz der Arme des Dendrogramms innerhalb der zwei Gruppen stellt eine starke transkriptionelle Übereinstimmung dar. Gene oder Gruppen von Genen mit einem ähnlichen Genexpressionsmuster erscheinen benachbart in „Clustern“ (z.B. CK-8,-10,-18 und-19).

Die Clusteranalyse zeigte, dass sich die Primärtumore von KM-positiven und KM-negativen Patientinnen in zwei unterschiedliche Genexpressionsprofile unterteilen lassen, die dem KM-Status entsprechen (Abb.3.6), d.h. die Neigung zur hämatogenen Disseminierung scheint im Transkriptom des Primärtumors festgelegt zu sein.

² Beim „unsupervised Clustering“ werden keine vordefinierten Referenzvektoren verwendet.

³ Hierarchisches Clustering ist eine Anwendung, die zuerst in phylogenetischen Analysen durchgeführt wurden. Beziehungen zwischen Objekten werden dabei durch einen Stammbaum repräsentiert, wobei die Länge der Äste den Grad der Verwandtschaft bzw. der Gemeinsamkeiten zwischen den Objekten reflektiert.

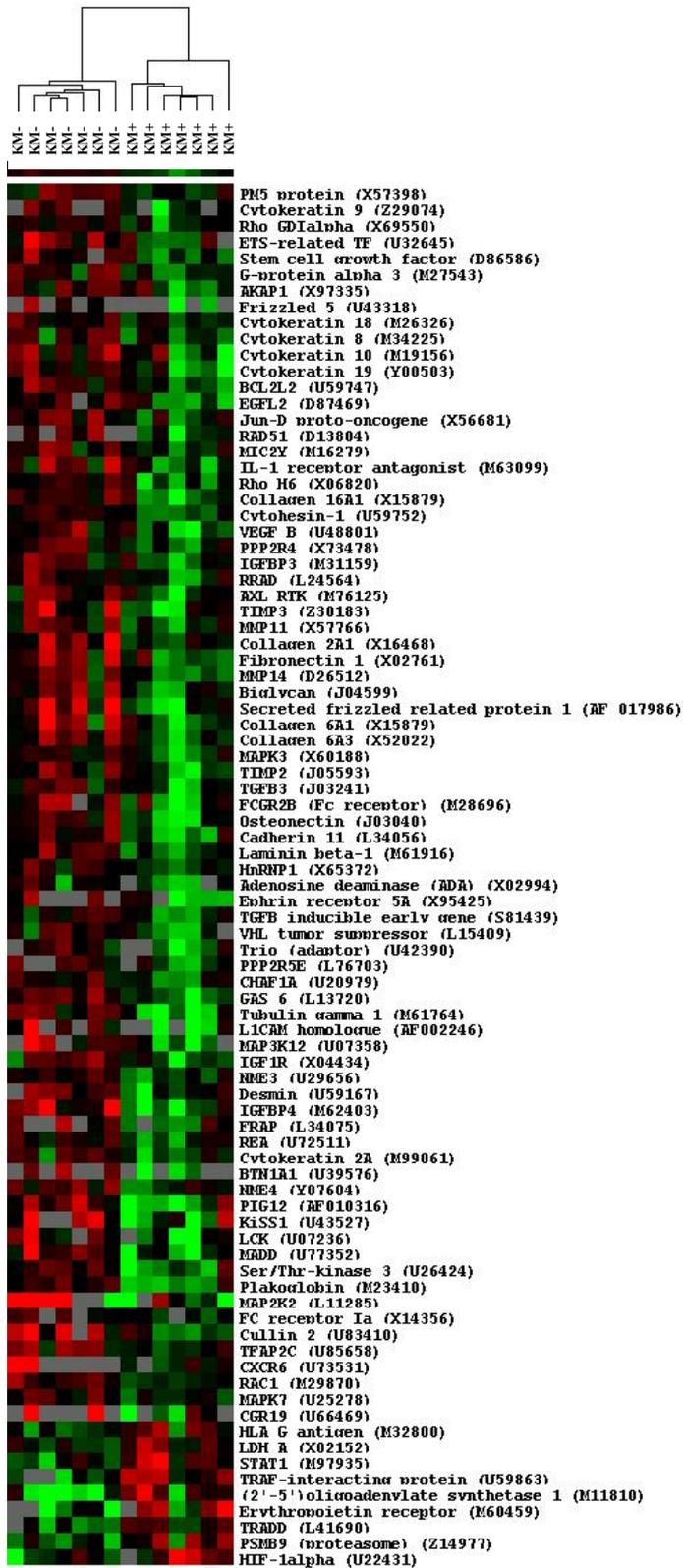


Abb. 3.6 Darstellung der Variation der Genexpression von 86 differenziell exprimierten Genen in 14 Mammakarzinomproben. 7 Tumore von KM-positiven (KM+) Patientinnen wurden mit 7 Tumoren von KM-negativen (KM-) Patientinnen verglichen. Alle Tumorproben waren von LK-negativen Patientinnen. Die Daten der signifikant differenziell exprimierten Gene (log-2 transformiert) wurden in einem Matrixformat mit dem Clusterprogramm von Eisen dargestellt. Jede Spalte repräsentiert eine Gewebeprobe und jede Zeile ein Gen (Die „Genbank-Accession“-Nummer ist in Klammern aufgeführt). Der Expressionswert eines Gens in einer Probe wird dargestellt als Verhältnis der transkriptionellen Expression dieses Gens zu der medianen transkriptionellen Expression des Gens bezogen auf alle Gewebepuben und wird durch das entsprechende Farbfeld in der Matrix repräsentiert. Grüne Quadrate entsprechen einem transkriptionellen Level unterhalb des Medians, schwarze Quadrate entsprechen einem transkriptionellen Level gleich dem Median, rote Quadrate zeigen einen transkriptionellen Level oberhalb des Medians und graue Quadrate entsprechen nicht exprimierten Genen. Die Farbintensität reflektiert die Größe des Unterschiedes der Ratio relativ zum Median für jedes Gen. Das Dendrogramm oberhalb der Abbildung zeigt die Ähnlichkeit der Gewebepuben in Bezug auf ihre Genexpressionsmuster.

Die ermittelten differenziell exprimierten Gene wurden außerdem daraufhin untersucht, ob sie an Signalwegen, die die Tumorzell dissemination regulieren könnten, beteiligt sind. Dazu wurden die Gene, die aufgrund bisher publizierter Informationen höchst wahrscheinlich nicht von Mammakarzinomzellen exprimiert wurden, von der weiteren Analyse ausgesondert. Es zeigte sich, dass insgesamt 73 der 86 differenziell exprimierten Gene (84,9%) mit hoher Wahrscheinlichkeit aus den mikrodisezierten Brusttumorzellen stammten. Dieser Ausleseprozess wurde mit Hilfe der UniGene/SAGE Datenbank durchgeführt. Die aussortierten 13 Gene (z.B. *MMP-14*, *Biglycan*, *Fc-Rezeptor* und *Desmin*) werden entsprechend der Angaben dieser Datenbank von Fibroblasten, Endothelzellen, Lymphozyten oder Muskelzellen exprimiert (siehe markierte Gene in Tabelle 6.2 im Anhang). Die wichtigsten Kategorien der differenziell exprimierten Gene sind an der Modellierung der extrazellulären Matrix (n=9) und des Zytoskelettes (n=10) beteiligt oder spielen in der Signaltransduktion eine Rolle (n=34) (Abb. 3.7 bzw. Tabelle 6.2 im Anhang).

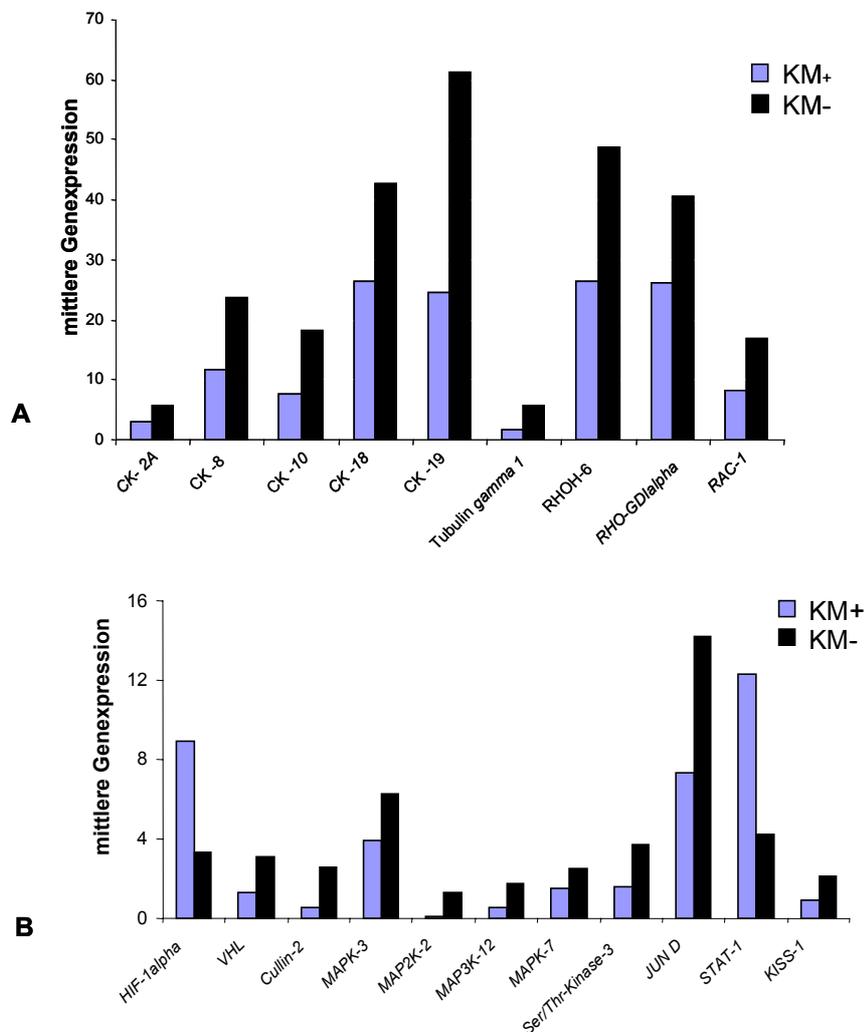


Abb. 3.7 Balkendiagramm einiger differenziell exprimierter Gene in Mammakarzinomgeweben von KM-positiven (KM+) und KM-negativen (KM-) Patientinnen. Die dargestellten Gene sind am Aufbau des Zytoskelettes (A) und an Signaltransduktionswegen (B) beteiligt.

Mehrere Gene, die am Aufbau der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt sind (z.B. *Collagen-2, -6 und -16, Laminin β -1 und Fibronectin*), zeigten in der KM-positiven Gruppe eine verringerte Genexpression. Die ECM besteht aus den zwei Kompartimenten Basalmembran⁴ und Stroma⁵. Im Verlauf der malignen Progression von Karzinomzellen wird die ECM durchwandert und abgebaut. Eine verminderte Expression dieser Gene, die die ECM aufbauen, erleichtert Tumorzellen daher das Verlassen des Tumorzellverbandes und die Invasion ins Stroma. In der KM-positiven Gruppe zeigten ferner die Gene *TIMP-2* und *-3* (*TIMP = Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteases*) eine verringerte Genexpression. Diese Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen regulieren den Abbau der ECM, der durch Matrix-Metalloproteinasen hervorgerufen wird. Eine veränderte Genexpression der *TIMP*-Gene kann ebenfalls die Invasion von Tumorzellen ins Stroma begünstigen.

Eine weitere große Genfamilie mit differenzieller Genexpression zwischen der KM-positiven und KM-negativen Gruppe stellten Zytokeratine (*CK-2,-8,-9,-10,-18 und -19*) dar, die typischen strukturellen Bestandteile des Zytoskelettes normaler und maligner Epithelzellen. *CK-8,-18 und -19* sind die charakteristischen Zytokeratine einfacher luminaler Epithelien, einschließlich duktaler Mammakarzinome, die aus luminalen Brustzellen entstanden sind (zur Anatomie der Brustdrüse siehe Kap. 1.1.1.).

Die Expression mehrerer Gene des RAS/MAPK- Signaltransduktionsweges (z.B. mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die *Serin/Threonin-Kinase-3* und der Transkriptionsfaktor *JUN D*) zeigten in den Tumoren der KM-positiven Patientinnen ebenfalls eine erniedrigte Genexpression (Abb. 3.7 bzw. Tabelle 6.2 im Anhang). In diesem Reaktionsweg führt die ligandenvermittelte Aktivierung von z.B. Rezeptortyrosinkinasen zu einer Aktivierung von RAS, wodurch eine anschließende Aktivierung verschiedener Serin-Threoninkinasen (MAP-Kinasen) hervorgerufen wird. Diese Kinasen können dann die Expression von Transkriptionsfaktoren wie *JUN* und *FOS* induzieren. Dieser Reaktionsweg scheint in KM-positiven im Vergleich zu KM-negativen Patientinnen eine verminderte Aktivität aufzuweisen. Obwohl das Onkogen *RAS* eine zentrale Rolle in der beschriebenen Signalübertragung spielt, zeigte es im Gegensatz zu den in der Signalkaskade auftretenden Kinasen und Transkriptionsfaktoren in den verglichenen Tumorproben keine differenzielle Genexpression. Die Disregulation dieses Signalweges scheint somit auf der Ebene der Kinasen zu beginnen. Die Gene der monomeren GTP-bindenden Proteine der RAS-Familie (*RHO-6 und RAC-1*), die bei der Interaktion von Integrinen⁶ mit dem Aktinzytoskelett eine wichtige regulatorische Rolle spielen (Keely et al., 1998), zeigten allerdings in den Tumoren der KM-positiven Patientinnen eine erniedrigte Genexpression.

⁴ Bindegewebige Membran ohne Zellen aus u.a. Kollagen und Laminin, das Epithelzellen vom Stroma trennt.

⁵ Fibroblasten, Lymphozyten, die in einer Matrix aus Kollagenfasern, Glykoproteinen (Fibronectin, Laminin) und Glykosaminoglycan (Biglycan) eingebettet sind.

⁶ integrale Bestandteile der Zellmembran, die den Kontakt zwischen ECM und Zytoskelett vermitteln.

Zu den wenigen Genen, die in der KM-positiven Gruppe eine erhöhte Genexpression aufwiesen, gehörten die Gene *STAT-1* und *(2'-5')Oligoadenylatsynthase-1*, deren Signaltransduktionsweg über den JAK/STAT Reaktionsweg läuft. Dieser Signalweg führt nach der ligandenvermittelten Aktivierung z.B. des Interferon- γ -Rezeptors zu der Aktivierung von Januskinasen (JAKs) und zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)-Molekülen. Diese dimerisierten STAT-Proteine wandern in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren. Die Gene *STAT-1* und *(2'-5')Oligoadenylatsynthase-1* wurden bei der Untersuchung der Interferon-Signaltransduktion entdeckt und bewirken u. a., dass Zellen gegen einen Virusbefall resistent werden. Perou et al. zeigten in einer Genexpressionsanalyse, dass diese Gene allerdings nicht nur von Leukozyten sondern auch von Mammakarzinomzellen exprimiert werden (Perou et al., 1999).

Gene eines zweiten Signaltransduktionsweges, die in KM-positiven Patientinnen eine erhöhte Genexpression zeigten, gehören zu dem HIF-1 α -Reaktionsweg. HIF-1 α (Hypoxia-Inducible-Factor-1alpha) ist der bedeutendste Faktor, der bei einer Reihe von Hypoxie⁷-regulierten Prozessen eine wichtige Rolle spielt (z.B. der Proliferation, der Angiogenese und dem programmierten Zelltod). Kürzlich wurde eine erhöhte HIF-1 α -Proteinexpression auch bei der Metastasierung des Mammakarzinoms beschrieben (Bos et al., in press). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigten außerdem, dass die in der KM-positiven Gruppe detektierte erhöhte Expression des *HIF-1 α* -Gens mit einer verminderten Expression von einigen Genen, deren Genprodukte für die HIF-1 α -Degradation verantwortlich sind (*VHL* oder *Cullin-2*), korrelierte. Neben der erhöhten *HIF-1 α* -Genexpression könnte zusätzlich eine verminderte Degradation von HIF-1 α -Proteinen zu einer Akkumulation des HIF-1 α -Transkriptionsfaktors in den Tumorzellen führen. Die durch Hypoxie induzierbaren Transkriptionsfaktoren *CREB* und *NF κ B*, die nicht mit dem HIF-1 α -Reaktionsweg assoziiert sind, zeigten zwischen der KM-positiven und der KM-negativen Gruppe keine differenzielle Genexpression.

Es ist bemerkenswert, dass die mit dem 1.2-Cancer-Array untersuchten Gene, die direkt in die Zellzyklusregulation involviert sind, z.B. *Zykline* (n=10) und *zyklinabhängige Kinasen* (n=8), nicht differenziell exprimiert wurden. Diese Beobachtung liefert einen Hinweis dafür, dass eine gesteigerte Proliferation der Tumorzellen nicht zwangsläufig mit deren Neigung zur Metastasierung verknüpft sein muss.

Ferner zeigten Gene, die für Proteinasen kodieren in beiden Mammakarzinomgruppen eine vergleichbare Genexpression. Mit dem 1.2-Cancer-Array wurde die Genexpression der Matrix-Metalloproteinasen *MMP-1,-2,-3,-7, -8, -12, -13, -15* und *Cathepsin D* analysiert.

⁷ verminderte Sauerstoffversorgung

Diese Proteinasen können die ECM abbauen und eine erhöhte Genexpression dieser Matrix-Metalloproteinasen und Cathepsine korreliert mit einer erhöhten Tumorinvasion und Metastasierung. Für die hämatogene Disseminierung scheinen diese Enzyme allerdings nicht relevant zu sein. Möglicherweise sind diese Enzyme vornehmlich für die Invasion der Tumorzellen ins Stroma wichtig. Da sowohl in der KM-positiven als auch der KM-negativen Gruppe nur invasive Mammakarzinome analysiert wurden, konnte vielleicht deshalb kein Unterschied in der Genexpression nachgewiesen werden.

3.2.2. Differenziell exprimierte Gene zwischen histopathologisch normalem Brustgewebe und Mammakarzinomgewebe

Die Genexpression von normalem Brustgewebe (zu gleichen Teilen gemischte RNA aus histopathologisch normalem Brustgewebe von vier Patientinnen des Kollektivs) wurde mit der Genexpression der 14 Mammakarzinomproben verglichen. Bezüglich des Vergleichs der Genexpression von histopathologisch normalem Brustgewebe zu dem Tumorgewebe müssen allerdings die folgenden zwei Punkte berücksichtigt werden: 1. Es wurde nicht das zu den Tumorgeweben autologe normale Brustgewebe separat analysiert, sondern es wurde eine Mischung aus mehreren Normalgeweben verwendet. Nur auf diese Weise konnte eine ausreichende RNA-Menge für die Hybridisierung isoliert werden. 2. Das normale Brustgewebe besteht neben Epithelzellen zu einem großen Teil auch aus Fettzellen, Fibroblasten und Endothelzellen des Stromas (Abb. 1.1). Die RNA aus normalem Brustgewebe stellt somit ein Gemisch der RNA aus all diesen Zelltypen dar. Mit einem Hämalaun-Eosin gefärbten Gewebeschnitt des normalen Brustgewebes wurde die Anwesenheit von Epithelzellen sichergestellt, doch eine manuelle Mikrodissektion konnte nicht durchgeführt werden, da sich aufgrund des hohem Fettgehaltes des Gewebes die Epithelzellen schlecht von den Objekträgern der Kryoschnitte ablösen.

Im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Brustgewebe konnte eine erhöhte Genexpression der Zykline (z.B. *Zyklin A, B, D1* und *D2*) und der Matrix-Metalloproteinasen (z.B. *MMP-2,-3,-8,-15*) gezeigt werden. Mit dieser Analyse konnten die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen bezüglich des Vergleichs von normalem Brustgewebe aus Reduktionsplastiken mit Mammakarzinomgewebe (Perou et al., 1999) bestätigt werden. Dieses Ergebnis weist somit auf die Verlässlichkeit der in dieser cDNA-Analyse generierten Daten hin. Darüberhinaus zeigt diese Beobachtung, dass die Proliferation bekanntermaßen eine relevante Rolle in der Tumorentwicklung spielt.

3.2.3. Differenziell exprimierte Gene in der LK-positiven im Vergleich zur LK-negativen Gruppe

Um zu überprüfen, ob die Gene, die an der hämatogene Disseminierung beteiligt sind, auch einen Einfluss auf die lymphogene Metastasierung haben, wurden Primärtumore von LK-positiven (n=5) und LK-negativen Patientinnen (n=7) verglichen. Diese Tumore stammten alle von Patientinnen, die KM-negativ waren. Der Student's *t*-Test ergab 44 differenziell exprimierte Gene. Die Anzahl der Gene, die in der LK-positiven Gruppe eine erhöhte Genexpression (n=9) zeigte, war geringer als die Anzahl der Gene mit erniedrigter Genexpression (n=35) (Tabelle 6.3 im Anhang). In der Clusteranalyse zeigte die LK-positive im Vergleich zur LK-negativen Gruppe ein unterschiedliches Genexpressionsprofil und die Tumore unterteilten sich entsprechend ihres LK-Status in zwei separate Gruppen ohne Überlappung (Abb. 3.8).

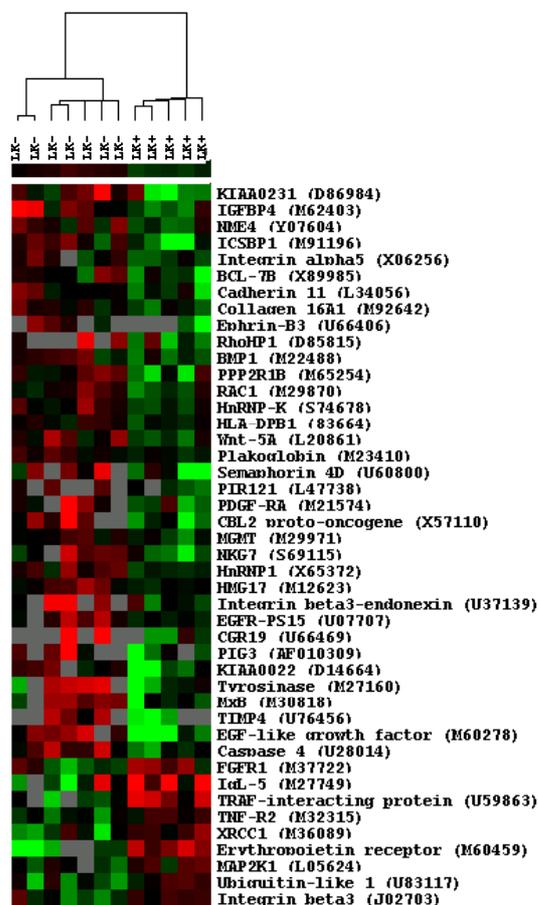


Abb. 3.8 Darstellung der Variation der Genexpression von 44 differenziell exprimierten Genen in 12 Mammakarzinomproben. 5 Tumore von LK-positiven (LK+) Patientinnen wurden mit 7 Tumoren von LK-negativen (LK-) Patientinnen verglichen. Bei keiner der Patientinnen konnten disseminierte Tumorzellen im KM nachgewiesen werden. Die Daten der 44 signifikant differenziell exprimierten Gene (log-2 transformiert) sind in einem Matrixformat mit dem Clusterprogramm von Eisen dargestellt. Jede Spalte repräsentiert eine Gewebeprobe und jede Zeile ein Gen (Die „Genbank-Accession“-Nummer ist in Klammern aufgeführt). Grüne Quadrate entsprechen einer reduzierten, rote Quadrate einer erhöhten, schwarze Quadrate einer unveränderten und graue Quadrate einer fehlenden Expression des betreffenden Gens. Das Dendrogramm oberhalb der Abbildung zeigt die Ähnlichkeiten der Gewebeproben in Bezug auf ihre Genexpressionsmuster.

Mit Hilfe der UniGene/SAGE Datenbank wurden die differenziell exprimierten Gene der LK-positiven im Vergleich zur LK-negativen Gruppe aus der Analyse ausgesondert, die wahrscheinlich nicht von den Mammakarzinomzellen exprimiert wurden. Es zeigte sich, dass insgesamt 40 der 44 differenziell exprimierten Gene (91%) mit hoher Wahrscheinlichkeit aus den mikrodisezierten Tumorzellen stammten.

Die größte funktionelle Kategorie der differenziell exprimierten Gene spielt in der Signaltransduktion eine Rolle (n=17; Tabelle 6.3 im Anhang). Es konnten allerdings im Gegensatz zur hämatogenen Disseminierung keine Gene zusammengefasst werden, die einem bestimmten Reaktionsweg zugeordnet werden können.

Bei der lymphogenen im Vergleich zur hämatogenen Disseminierung wurden weniger differenziell exprimierte Gene gefunden. Dies weist darauf hin, dass Tumorzellen für die lymphogene Disseminierung möglicherweise eine geringere Adaptation benötigen als für die hämatogene Disseminierung (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Anzahl der differenziell exprimierten Gene bei der hämatogenen Disseminierung im Vergleich zur lymphogenen Metastasierung

Funktionelle Gengruppen	Anzahl differenziell exprimierter Gene*	
	KM-Disseminierung	LK-Metastasierung
Gesamtzahl	73	40
hochreguliert	9	8
herunterreguliert	64	32
Extrazelluläre Matrix	9	3
Adhäsion	2	3
Zytoskelettaufbau	10	1
Signaltransduktion	34	17
Apoptose	4	2
Stoffwechsel	7	4
Angiogenese	1	0
Immunantwort	2	2
Replikation/Reparatur/ Transkription	4	5
Unklassifizierte Gene	0	3

*In dieser Tabelle wurden nur differenziell exprimierte Gene mit Merkmalen von Epithel- bzw. Mammakarzinomzellen aufgeführt.

Neun Gene stellten sich sowohl bei der hämatogenen als auch bei der lymphogenen Disseminierung als differenziell exprimiert heraus (unterstrichene Gene in Tabelle 6.3 im Anhang). Unter diesen Genen war z.B. Plakoglobin (= γ -Catenin), das eine zentrale Rolle bei der epithelialen Zelladhäsion spielt und an der Ablösung der Tumorzellen vom Primärtumor

beteiligt ist. Der Verlust der Zell-Zell Adhäsion ist ein früher Schritt der Progression von Mammakarzinomen (Berx and Van Roy, 2001).

3.3. Verifizierung der differenziell exprimierten Gene

Zur Überprüfung der Ergebnisse der arraybasierten Genexpressionsanalysen können die Daten der cDNA-Hybridisierung auf RNA-Ebene durch Northern-Blot-Analysen und anschließende densitometrische Messungen quantitativ verglichen werden. Die Verifizierungen beschränken sich auf differenziell exprimierte Gene zwischen KM-positiven und KM-negativen Patientinnen, da hier die Genexpressionsmuster stärker ausgeprägt waren.

Die noch zur Verfügung stehende Gesamt-RNA der Tumorproben war sehr begrenzt (maximal 1 µg), deshalb wurde mit Gesamt-RNA aus MCF-7 Zellen ausgetestet, welche Mindestmenge an RNA für einen Northern-Blot mit der CK-19-Sonde für eine verlässliche Reaktion erforderlich ist. Die CK-19 Genexpression wurde für die Verifizierung ausgesucht, da es sich dabei um ein konstitutiv exprimiertes Gen, das als Strukturprotein in normalen und malignen Epithelzellen exprimiert wird, handelt. Um eine sehr hohe Sensitivität zu erreichen wurde die Sonde nicht mit einer „Nicktranslation“ sondern wie in Kap. 2.2.7.2. beschrieben in einer PCR-Reaktion mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ radioaktiv markiert, so dass im Idealfall jedes Cytosin der Sonde radioaktiv markiert vorliegt. Abb. 3.9 zeigt, dass für eine verlässliche Northern-Blot-Analyse mit der CK-19-Sonde mindestens 5 µg Gesamt-RNA erforderlich sind.

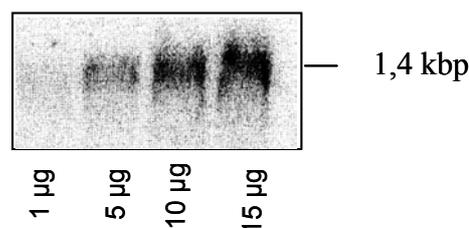


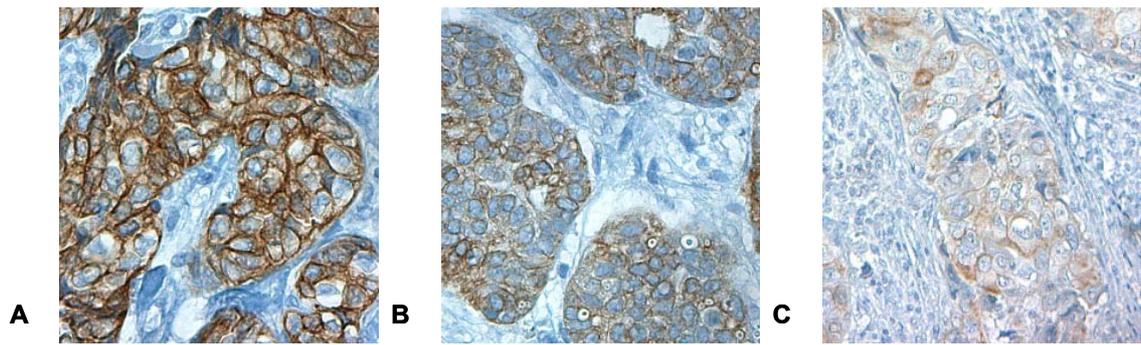
Abb.3.9 Northern-Blot zur Austestung der minimal erforderlichen Menge an Gesamt-RNA (aus MCF-7-Zellen isoliert). Die CK-19-Sonden wurden in einer PCR mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ radioaktiv-markierten, um einen besonders sensitiven Nachweis der CK-19-Transkripte zu gewährleisten.

Da trotz des sensitiven Nachweises der CK-19-Transkripte 1 µg MCF-7-Gesamt-RNA für einen verlässlichen Nachweis der Transkripte nicht ausreichte, wurde die Verifizierung mit einer Echtzeit-PCR (Taq-man)⁸ von Dr. J. Cloos am Medical Center der Freien Universität

Beim TaqMan-Prinzip, auch 5'-Nuklease-Assay genannt, binden die fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden am komplementären Zielstrang zwischen den Primerbindungsstellen. Bei der Neustrangsynthese wird die Hybridisierungssonde durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten und aus dem Zielstrang freigesetzt. Reporter- und Quencher-moleküle der Hybridisierungssonden liegen jetzt getrennt im Reaktionsmix vor, und die gemessene Zunahme der Reporterfluoreszenz mit jedem PCR- Zyklus korreliert direkt mit der PCR-Produktzunahme.

von Amsterdam durchgeführt. Mit dieser Methode konnten die CK-19-Genexpressionsergebnisse verifiziert werden. Das Verhältnis der CK-19-Expression in der KM-positiven im Vergleich zur KM-negativen Gruppe lag bei der Arrayhybridisierung bei 2,5 und bei der Taqman-Analyse bei 2,0.

Da die RNA-Menge sehr begrenzt war, wurde die weitere Verifizierung der cDNA-Array-Daten auf Proteinebene durchgeführt. Insbesondere sind die Proteine auch die relevanten Moleküle, die Veränderungen in Zellen hervorrufen. Mit immunhistochemischen Färbungen wurde die RNA-Expression mit der Proteinexpression an autologen fixierten Tumorproben der KM-positiven und KM-negativen-Gruppe verglichen. Die Färbebedingungen sind in Kap. 2.2.10 beschrieben. Die Proteinexpression von CK-8, -10, -18, -19, STAT-1, TGF β -2, RHOB, HER-2/NEU und Plakoglobin wurde mit der Genexpression verglichen. Mit dieser Auswahl an Proteinen wurden aus den wichtigsten funktionellen Kategorien mit differenzieller Genexpression (Zytoskelettaufbau, Signaltransduktion und Adhäsion, siehe Tabelle 6.2 im Anhang) jeweils einige Vertreter untersucht, von denen paraffingängige Antikörper kommerziell erhältlich waren. Die Proteinexpression wurde mit dem Remmele-Score bestimmt. Dieser Score ist das Produkt aus Färbeintensität und dem Prozentsatz gefärbter Tumorzellen wie in Kap. 2.2.10 beschrieben. In der Pathologie wird dieser Score routinemäßig, z.B. für die Bestimmung der Proteinexpression des Östrogen- und des Progesteronrezeptors verwendet. Ein Zahlenwert von 0 entspricht dabei einer fehlenden, von 1-4 einer schwachen, von 6-8 einer mittelstarken und von 9-12 einer starken Proteinexpression. Der Spearman-Rank-Korrelations-Koeffizient zwischen Gen- und Proteinexpression wurde jeweils im SPSS-Programm errechnet (Tabelle 3.4) und war für CK-8, -18, -19, STAT-1 und HER-2/NEU statistisch signifikant. Die CK-10-Proteinexpression lag unterhalb der zuverlässigen Detektionsgrenze in den Mammakarzinomgeweben. In Abb. 3.10 sind drei Tumore aus dem Kollektiv der Genexpressionsanalysen dargestellt, die eine schwache, mittelstarke oder starke CK-19-Proteinexpression besaßen. Die Übereinstimmung der Proteinexpression mit der RNA-Expression ist in der Tabelle unter den Photos gezeigt.



Färbeintensität	stark	mittelstark	schwach
Mittlere RNA-Expression \pm SD	58,79 \pm 23,39	34,74 \pm 22,15	6,95 \pm 2,47

Abb. 3.10 CK-19 gefärbte Paraffinschnitte von drei Mammakarzinomproben (Nr. 1, 13, 12 aus Tabelle 2.1.) aus der Genexpressionsanalyse. Das Tumorgewebe wurde mit einem Antikörper gegen CK-19 mit der Peroxidasemethode (Kap. 2.2.10.) gefärbt; danach wurden die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt. Unter den Photos ist die mittlere RNA-Expression mit Standardabweichung (SD) im Vergleich zur Proteinexpression angegeben.

Die Färbeergebnisse mit den Antikörpern gegen TGF β -2, RHOB und Plakoglobin zeigten keine statistisch signifikante Übereinstimmung zu den arraybasierten Genexpressionsdaten, d.h. in diesen Fällen stimmte die Genexpression nicht mit der Proteinexpression überein. Möglicherweise werden diese Gene posttranslational reguliert. Bezüglich TGF β -2 war allerdings die Proteinexpression in der KM-negativen Gruppe signifikant höher als in der KM-positiven Gruppe; dieser Unterschied entspricht dem Ergebnis der Genexpressionsanalyse.

Tabelle 3.4 Korrelation der Genexpression mit der Proteinexpression

Gen	Proteinexpression	Mittlere RNA-Expression \pm SD	Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient R	p-Wert
CK-8	Schwach (n=7)	14,7 \pm 9,50	0,606	0,048
	Mittelstark (n=3)	24,8 \pm 7,52		
	Stark (n=1)	25,5		
CK-18	Schwach (n=2)	16,85 \pm 0,65	0,0636	0,035
	Mittelstark (n= 4)	30,45 \pm 14,46		
	Stark (n=5)	37,04 \pm 4,14		
CK-19	Schwach (n=2)	6,95 \pm 2,47	0,680	0,007
	Mittelstark (n=5)	34,74 \pm 22,15		
	Stark (n=7)	58,74 \pm 25,39		
TGF β -2	Schwach (n=7)	9,23 \pm 4,22	-0,117	0,69
	Mittelstark (n=7)	8,90 \pm 6,34		
Plakoglobin	Schwach (n=3)	8,76 \pm 8,30	-0,028	0,930
	Mittelstark (n=4)	12,70 \pm 1,84		
	Stark (n=5)	7,05 \pm 4,48		
STAT-1	Schwach (n=2)	2,16 \pm 0,84	0,596	0,032
	Mittelstark (n=7)	8,14 \pm 5,49		
	Stark (n=4)	12,76 \pm 10,28		
RHOB	Schwach (n=6)	22,19 \pm 12,02	0,545	0,103
	Mittelstark (n=5)	47,52 \pm 8,28		
	Stark (n=1)	36,56		
ERBB-2	Ungefärbt (n=3)	0,43 \pm 0,40	0,837	0,0001
	Schwach (n=3)	1,80 \pm 1,44		
	Mittelstark (n=2)	3,45 \pm 0,35		
	Stark (n=6)	10,08 \pm 10,91		

Durch immunhistochemische Färbungen mit den aufgeführten monoklonalen Antikörpern (siehe Kap. 2.2.10) wurden Einzelergebnisse der Genexpressionsanalyse direkt auf der Ebene der Proteinexpression überprüft. Die Proteinexpression wurde entsprechend des Remmele-Scores, wie in Kap. 2.2.10 beschrieben, bestimmt. Ein Zahlenwert von 0 entspricht dabei einer fehlenden, von 1-4 einer schwachen, von 6-8 einer mittelstarken und von 9-12 einer starken Proteinexpression. Der Spearman-Rank-Korrelations-Koeffizient R wurde im SPSS-Programm berechnet. Je mehr sich dieser Koeffizient 1 annähert, desto signifikanter sind die Übereinstimmungen der untersuchten Gruppen.

3.4. Validierung der differenziell exprimierten Gene

Durch die Verwendung eines Gewebearrays (Kononen et al., 1998), auf dem sich Primärtumormikrostanzen verschiedener Mammakarzinome befinden, können mit einem Objektträger 120 – 150 Gewebeproben gleichzeitig untersucht werden. Bei dieser Technik werden 0,6 mm große Tumorstanzen aus einem „Spender“-Paraffinblock präzise in einem neuen „Empfänger“- Paraffinblock angeordnet (Abb. 2.3 in Kap. 2.2.12).

Die verifizierten differenziell exprimierten Gene wurden mit Gewebearrays bestehend aus 93 Mammakarzinomproben von LK-negativen Patientinnen mit bekanntem KM-Status validiert. 10 der ursprünglich 93 in den Array integrierten Tumorstanzen (10,7%) enthielten kein Tumorgewebe bzw. das Gewebe löste sich beim Schneiden des Arrays ab, so dass nur 83 Mammakarzinomproben ausgewertet werden konnten, von denen 23 KM-positiv und 60 KM-negativ waren. Die Beschreibung der klinisch pathologischen Daten dieses Kollektivs ist in Kap. 2.1.2.2 aufgeführt. Der Tumorzellanteil der Tumorstanzen auf dem Mikrometastasenarray wurde mit einem Paraffinschnitt, der wie in Kap. 2.2.11. beschrieben mit Hämalaun-Eosin gefärbt wurde, überprüft. Für CK-8,-18 und-19 konnte eine signifikant herunterregulierte Proteinexpression (weniger als 100% stark gefärbte Brusttumorzellen) in dem Mammakarzinomgewebe von KM-positiven Patientinnen im Vergleich zu Karzinomgewebe von KM-negativen Patientinnen gezeigt werden (Abb. 3.11). Histomorphologisch normale Brustzellen wurden mit diesen monoklonalen Zytokeratinantikörpern konstant zu 100% intensiv gefärbt und dienten deshalb als Positivkontrolle. Mit diesen Färbeergebnissen konnten die Ergebnisse des Genexpressionsarrays bestätigt werden. Zytokeratine könnten somit als Suppressoren eine Rolle in der hämatogenen Disseminierung spielen.

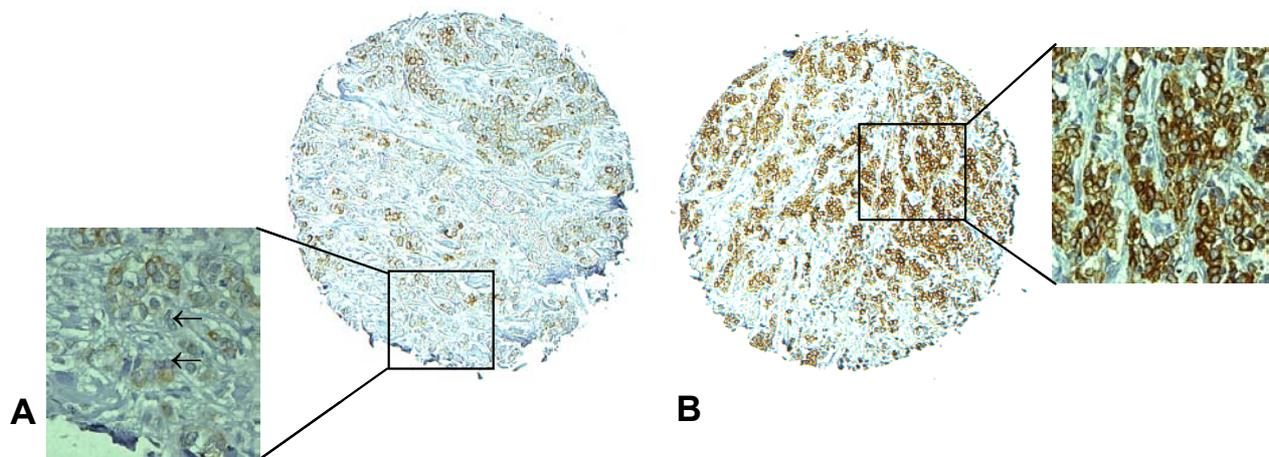


Abb. 3.11 Zwei unterschiedlich stark CK-18 exprimierende Mammakarzinom-Stanzen (0,6 mm) des Mikrometastasenarrays. In A wird mit den Pfeilen auf ungefärbte Tumorzellen hingewiesen. Der Mikrometastasenarray wurde immunhistochemisch wie in Kap. 2.2.10 beschrieben mit einem CK-18-Antikörper gefärbt (Vergrößerung: 200-fach bzw. der herausvergrößerte Ausschnitt 400-fach).

Außerdem wurden Mikrometastasenarrays mit Antikörpern gegen STAT-1, HIF-1 α , Plakoglobin, TGF β -2 und RHOB gefärbt. Die STAT-1 und HIF-1 α Proteinexpression war in Übereinstimmung zu den Genexpressionsergebnissen in den Tumoren von KM-positiven Patientinnen erhöht. Die Gruppierung der STAT-1-Proteinexpression der Tumore erfolgte in fehlende bis schwache (Score 0-4) und starke Proteinexpression (Score 6-12), da in diesem Fall eine erhöhte Proteinexpression in KM-positiven Tumoren validiert werden sollte. Als Score wurde der Remmele-Score wie in Kap. 2.2.10. beschrieben angewendet. Für die

Einteilung der HIF-1 α -Proteinexpression wurde die Gruppierung von Bos et al. benutzt (Bos et al., 2001). Entsprechend dieser Gruppierung zeigen $\geq 5\%$ gefärbte Tumorzellen eine reale Proteinexpression an. Da HIF-1 α in der Mehrzahl der Tumorgewebeproben nicht exprimiert vorlag, ist diese Einteilung sinnvoll. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst und zeigen anhand der Proteinexpression eine Validierung der Genexpressionsdaten.

Tabelle 3.5 Korrelation zwischen dem KM-Status und der immunhistochemischen Färbung primärer Mammakarzinome mit den aufgeführten Antikörpern

Proteine/ KM-Status	Proteinexpression ¹		p-Wert ²
	normal (100% gefärbt)	herunterreguliert (<100% gefärbt)	
CK-8			
KM-positiv	15% (n=3)	85% (n=17)	0,026
KM-negativ	41,5% (n=22)	58,5% (n=31)	
CK-18			
KM-positiv	5,9% (n=1)	94,1% (n=16)	0,048
KM-negativ	26,5% (n=13)	73,5% (n=36)	
CK-19			
KM-positiv	0	100% (n=17)	0,015
KM-negativ	18,2% (n=10)	81,8% (n=45)	
Plakoglobin			
KM-positiv	91,1% (n=2)	90,9% (n=20)	0,426
KM-negativ	4,2% (n=2)	95,8% (n=46)	
TGF-β2			
KM-positiv	38,9% (n=7)	61,1% (n=11)	0,659
KM-negativ	44,9% (n=22)	55,1% (n=27)	
RHOB			
KM-positiv	5,6 (n= 1)	94,4% (n= 17)	0,080
KM-negativ	22,4% (n=11)	77,6% (n=38)	
	schwach exprimiert	stark exprimiert	
STAT-1			
KM-positiv	41,2% (n=7)	58,8% (n=10)	0,067
KM-negativ	66,7% (n=32)	33,3% (n=16)	
	nicht exprimiert	exprimiert	
HIF-1α			
KM-positiv	68,4% (n=13)	31,6% (n=6)	0,006
KM-negativ	96,1% (n=49)	3,9% (n=2)	

Die Färbebedingungen sind in Kap. 2.2.10. beschrieben.

¹Die immunhistochemischen Färbeergebnisse mit den monoklonalen Antikörpern gegen CK-8, -18, -19, Plakoglobin, RHOB and TGF β -2 wurden in eine normale (100% gefärbte Tumorzellen) im Vergleich zu einer herunterregulierten (weniger als 100% gefärbte Tumorzellen) Proteinexpression eingeteilt. Die Gruppierung der STAT-1 Proteinexpression der Tumore erfolgte in fehlende bis schwache (Score 0-4) und starke Proteinexpression (Score 6-12). Als Score wurde, wie in Kap. 2.2.10. beschriebene, der Remmele-Score angewendet. Für die HIF-1 α -Proteinexpression wurde die publizierte Gruppierung von Bos et al. benutzt, nach der $\geq 5\%$ gefärbte Tumorzellen eine Proteinexpression anzeigen (Bos et al., 2001).

²Die p-Werte wurden mit dem Chi-square-Test im SPSS-Programm errechnet. Die Analyse war auf die Tumorproben mit erfolgreicher immunhistochemischer Färbung beschränkt.

Die in der Genexpressionsanalyse bestimmte erhöhte Expression von *STAT-1*, *HIF-1 α* und die verminderte Expression von *CK-8*, *-18* und *-19* korrelierte mit den Proteinexpressionsergebnissen an einem Kollektiv von 83 Mammakarzinomen mit bekanntem KM-Status (siehe Tabelle 3.5).

Die signifikante Herunterregulierung von *CK-8* und die Hochregulierung von *STAT-1* und *HIF-1 α* korrelierte in den KM-positiven Proben mit der Expression des proliferationsassoziierten Antigens Ki-67. (Die p-Werte waren jeweils $p=0,03$; $p=0,003$ bzw. $p=0,016$). Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Antigene eine mögliche Rolle in der Zellproliferation spielen, obwohl, wie in Kap. 3.2.1. gezeigt, Zykline in Mammakarzinomgeweben von KM-positiven im Vergleich zu KM-negativen Patientinnen nicht differenziell exprimiert wurden.

Die Färbeergebnisse des Mikrometastasenarrays mit Antikörpern gegen Plakoglobin, *TGF β -2* und *RHOB* zeigten keine statistisch signifikante Übereinstimmung zum KM-Status. Bei diesen drei Antigenen korrelierte die RNA-Expression auch nicht mit der an autologen Tumortroben analysierten Proteinexpression (Tabelle 3.4 in Kap. 3.3).

Um zu überprüfen, ob die reduzierte *CK-8*, *-18* und *-19*-Proteinexpression außer für die Disseminierung auch für das Anwachsen dieser disseminierten Mammakarzinomzellen zu distanten Metastasen eine Rolle spielt, wurde die prognostische Relevanz dieser Zytokeratine untersucht. Dieser Ansatz bietet sich an, da die Prognose der Mammakarzinompatientinnen hauptsächlich durch das Auftreten von distanten Metastasen bestimmt wird. Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der Zytokeratine wurde ein Mammakarzinomprognosearray immunhistochemisch mit Antikörpern gegen *CK-8*, *-18* und *-19* gefärbt (Abb. 3.12).

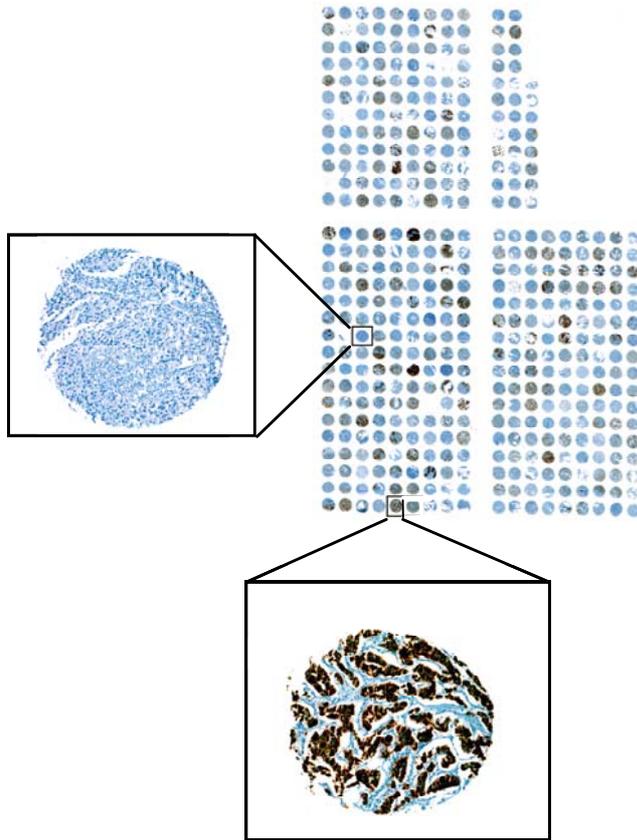


Abb. 3.12 Überblick über einen CK-8 gefärbten Mammakarzinomprognosearray (Vergrößerung: 20-fach). Zwei CK-8 gefärbte Tumorstanzen des Arrays, die eine starke (unteres Quadrat) bzw. eine fehlende (linkes Quadrat) CK-8-Proteinexpression aufwiesen, wurden vergrößert dargestellt (Originalvergrößerung 400-fach).

Der Mammakarzinomprognosearray enthält 2241 Mammakarzinomstanzen von unterschiedlichen Patientinnen. Keine der Patientinnen wies zum Zeitpunkt der Primärdiagnose Metastasen auf. Ferner wurden alle diese operierten Patientinnen über 10 Jahre nachbeobachtet. Da beim Mammakarzinom die Metastasenbildung viele Jahre nach der primären Diagnosestellung und der Resektion des Primärtumors neu auftreten kann, ist es wichtig, Patientinnen mit einer so langen Nachbeobachtungszeit zu untersuchen. Die histopathologischen Daten der Tumorgewebe auf dem Array sind in Kap. 2.1.2.3. beschrieben. Die publizierte prognostische Bedeutung der Tumorgroße, des Differenzierungsgrades und des LK-Status bei Mammakarzinomen konnte mit den Tumoren des Prognosearrays bestätigt werden. Dies zeigt, dass von einer repräsentativen Verteilung der Tumorproben auf dem Array ausgegangen werden kann. Die Berechnung der prognostischen Relevanz erfolgte im SPSS-Programm mit der Kaplan-Meier-Analyse, mit der der Einfluss eines Faktors (z.B. Tumorgroße) auf das Gesamtüberleben eines Patientinnenkollektivs untersucht werden kann. Dabei werden in einem Logranktest die Überlebenswahrscheinlichkeiten errechnet. Bei dieser Berechnung werden auch die Informationen berücksichtigt, die in den zensierten Daten vorhanden sind, d.h. Daten mit

zunächst vorläufigem Charakter, weil die betreffenden Patientinnen noch nicht verstorben sind oder weil sie sich der weiteren Beobachtungszeit entzogen haben.

Mit der Kaplan-Meier-Analyse wurde die Proteinexpression von CK-8,-18 und-19 (normale im Vergleich zu reduzierter Proteinexpression) mit dem Gesamtüberleben der Patientinnen korreliert (Abb. 3.13). Die immunhistochemische Färbung mit monoklonalen Antikörpern lieferte in 1456 Fällen (65%) für alle drei Zytokeratine ein interpretierbares Ergebnis. Aufgrund von fehlenden Tumorzellen in den Gewebestanden, während der Färbung abgelöstem Gewebe und dem Vorhandensein von nekrotischem oder beschädigtem Gewebe konnte nicht von allen ursprünglich in den Array integrierten 2241 Gewebeproben ein interpretierbares Ergebnis erhalten werden.

Die untersuchten Zytokeratine wurden in histomorphologisch normalem Brustgewebe zu 100% exprimiert, was mit einer normalen Proteinexpression gleichgesetzt wurde. Eine demgegenüber reduzierte Proteinexpression von CK-8 und -18 (Abb. 3.13 A, C) korrelierte signifikant mit einem verminderten Gesamtüberleben der entsprechenden Patientinnen ($p=0,040$ bzw. $p=0,015$), wohingegen eine verminderte CK 19- Proteinexpression prognostisch nicht oder nur grenzwertig signifikant war ($p=0,092$; Abb. 3.13 E). Die prognostische Bedeutung der erniedrigten Zytokeratinexpression wurde auch in Korrelation zum tumorassoziierten Überleben anhand von 611 Patientinnen dieses Kollektivs, von denen die entsprechenden Informationen bekannt waren, analysiert. Bei der Analyse des tumorassoziierten Überlebens werden nur die Todesfälle in die Analyse mit einbezogen, die eindeutig auf die Tumorerkrankung zurückzuführen sind. Eine herunterregulierte CK-18- Proteinexpression war signifikant mit einem verminderten tumorassoziierten Überleben korreliert ($p=0,005$; Abb. 3.13 D). Der herunterregulierten CK-8 bzw. -19-Proteinexpression konnte keine statistisch signifikante Bedeutung als Prognosefaktor für das tumorassoziierte Überleben zugeordnet werden ($p=0,109$ bzw. $p=0,132$; Abb. 3.13 B und F).

Die Ergebnisse der CK-8, -18 und -19 gefärbten Gewebearrays wurden ferner mit histopathologischen Faktoren verglichen. Eine verminderte (d.h. weniger als 100% gefärbte Tumorzellen) CK-8,-18 oder-19-Proteinexpression wurde häufiger in duktalem und weniger differenzierten (Differenzierungsgrad 3) Mammakarzinomen gefunden (Tabelle 6.4 im Anhang). Ferner zeigte sich eine positive Korrelation der verminderten Proteinexpression der Zytokeratine zur Tumorgröße ($p=0,001$), wohingegen keine Korrelation zum Vorhandensein von LK-Metastasen und zum Alter der Patientinnen gefunden werden konnte (Tabelle 6.4. im Anhang). Dies bestätigt das Ergebnis der Genexpressionsanalyse, mit der auch kein Einfluss der Zytokeratinexpression auf die lymphogene Metastasierung gezeigt werden konnte.

Die Unabhängigkeit des möglichen Disseminierungssuppressors CK-18, der aus der univariaten Kaplan-Meier-Analyse in Bezug auf das tumorassoziierte Überleben und das Gesamtüberleben signifikant hervorgegangen war, wurde anschließend in einem

multivariaten Cox-Regressionsmodell zusammen mit pathologischen Tumordaten (Differenzierungsgrad, der Tumorgöße, dem LK-Status und dem Alter) untersucht. Wie die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ist auch die Cox-Regression eine Methode, um bei zensierten Fällen die Zeit bis zum Eintreten eines Ereignisses (hier des Todesfalls) abzuschätzen. Allerdings können bei der Cox-Regression mehrere Variablen gleichzeitig in die Analyse einbezogen und bewertet werden. Diese multivariate Analyse zeigte, dass CK-18 kein unabhängiger prognostischer Faktor ist.

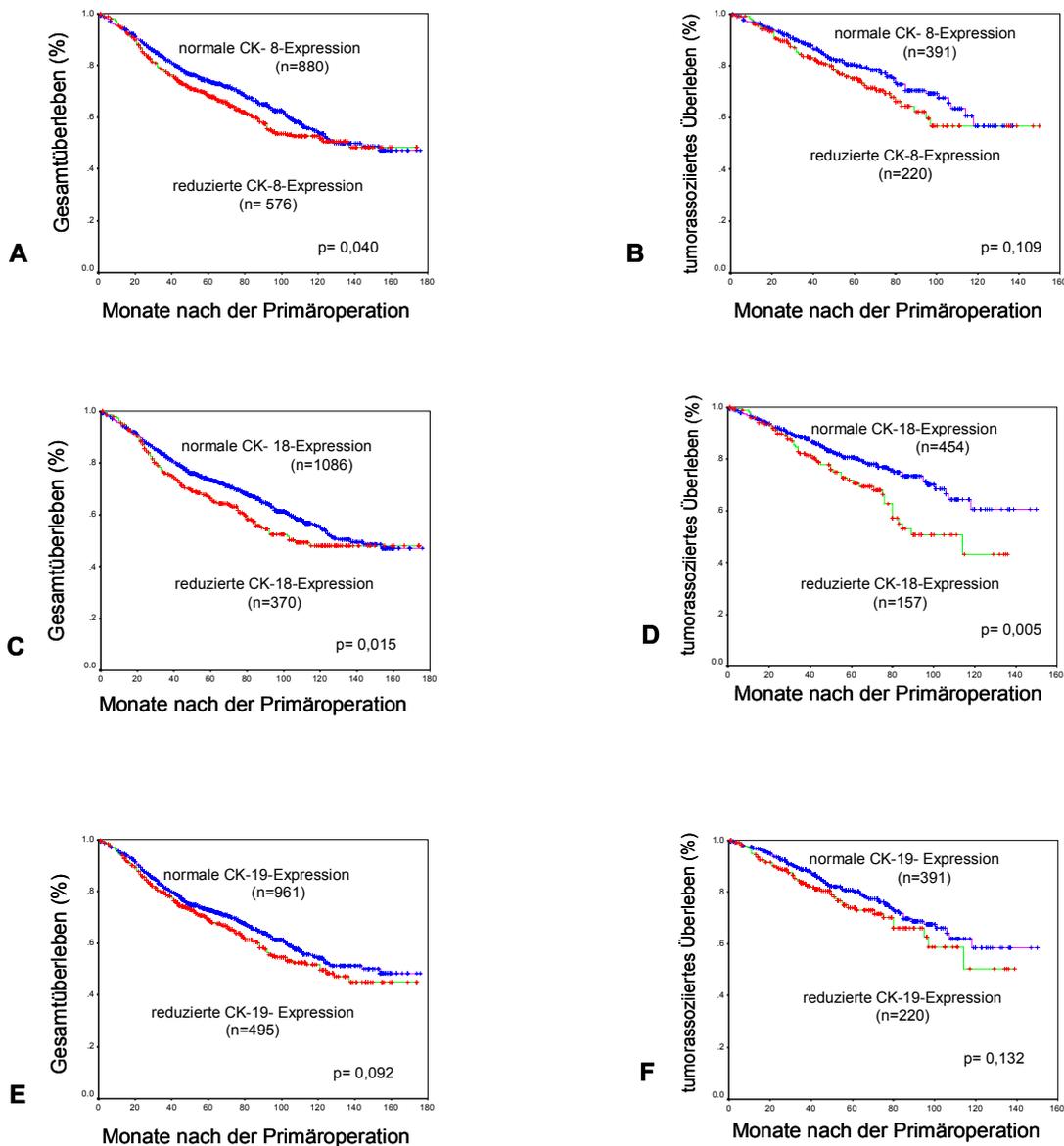


Abb. 3.13 Kaplan-Meier-Kurven der Überlebenswahrscheinlichkeit des Gesamtüberlebens bzw. des tumorassoziierten Überlebens von Mammakarzinompatientinnen bezüglich der immunhistochemisch bestimmten CK-8 (A, B), -18 (C, D) und -19 (E, F) -Proteinexpression im Primärtumor. Für das Gesamtüberleben wurden 1456 Tumore und für das tumorassoziierte Überleben 611 Tumore des Prognosearrays für die Analyse verwendet. Bei der Analyse des tumorassoziierten Überlebens wurden nur die Todesfälle in die Analyse mit einbezogen, die eindeutig auf die Tumorerkrankung zurückzuführen waren. Die Einteilung der immunhistochemisch bestimmten Proteinexpression für CK-8, -18 und -19 in den Brusttumorgewebe erfolgte in normale Proteinexpression (100% gefärbte Tumorzellen) im Gegensatz zu einer reduzierten Proteinexpression des entsprechenden Antigens (weniger als 100% gefärbter Tumorzellen)

3.5. Analysen von Mammakarzinomzellen auf genomischer Ebene

Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit beschriebene differenzielle Genexpression zumindest teilweise auf genomische Veränderungen zurückzuführen ist, wurde von insgesamt 12 Mammakarzinomproben (von 6 KM-positiven und 6 KM-negativen Patientinnen mit bekannten Genexpressionsdaten) eine Array-CGH durchgeführt.

3.5.1. Versuchsaufbau und Plausibilitätskontrollen

Die CGH (Comparative Genomic Hybridization) ist eine molekularzytogenetische Methode, die chromosomale Abberationen entlang des Genoms nachweist, wobei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Tumor- und Referenz-DNA gleichzeitig auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert werden, wo sie um homologe Bindungsstellen konkurrieren. Ob im Tumor ein DNA-Gewinn oder DNA-Verlust vorliegt, wird daher durch das Fluoreszenzverhältnis der markierten Tumor- im Vergleich zur Referenz-DNA bestimmt. Aufgrund der Hybridisierung der DNA auf normale Metaphasen-Chromosomen, die hochkondensierte und „supercoilte“ DNA enthalten, können mit der CGH nur genomische Abberationen mit einer Größe von mehr als 20 Mb detektiert werden. Bei der hier beschriebenen Array-CGH wurde die Tumor- und Referenz-DNA auf Glasobjektträgern, die fast 2500 in Triplikaten aufgebrachte BAC⁸ Klone enthielten, hybridisiert. Dadurch konnte eine Auflösung von bis zu 40 kb erreicht werden (Pinkel, 1998; Snijders, 2001). Diese BAC-Klone enthielten mindestens 1 STS (sequence tagged site), so dass die Zuordnung zu einer Gensequenz ermöglicht wurde.

Um gute Ergebnisse bei der Array-CGH erzielen zu können, wird hochmolekulare DNA benötigt. Die Fixierung von Tumorgewebe in Formalin bewirkt die Vernetzung nukleärer Proteine, die Bildung von starken Komplexen zwischen DNA und Proteinen und die Fragmentierung von DNA. Deshalb ist es schwierig aus diesem fixierten Gewebe hochmolekulare DNA zu isolieren. Auf der anderen Seite ist der Zugriff auf Frischgewebe limitiert, so dass die Verwendung von Paraffingewebe unumgänglich ist. Mit dem DNA-Extraktionsprotokoll von Quiagen konnte aus Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe nur niedermolekulare DNA (< 2kb) isoliert werden. Durch die verlängerte Proteinase-K-Inkubation von 3 Stunden auf 60 Stunden und die Verwendung von 5 µm dicken Paraffinschnitten im Vergleich zu dickeren Schnitten konnte in dieser Arbeit die Ausbeute an hochmolekularer DNA erheblich erhöht werden. Dies hängt möglicherweise mit der teilweisen Aufhebung der durch Formalin induzierten Komplexe zwischen nukleären

⁸ Bacterial Artificial Chromosom

Proteinen und DNA zusammen, wobei eine erhöhte Proteinase-K-Konzentration von 2 auf bis zu 6 mg/ml den Anteil an hochmolekularer DNA nicht erhöhte.

Des Weiteren zeigte sich, dass die aus methylgrüngefärbten Paraffinschnitten (in Kap. 2.2.9.1. beschrieben) isolierte DNA eine bessere Qualität aufwies als die DNA aus hämalaungefärbten Schnitten (in Kap. 2.2.11 beschrieben). Dies spiegelte sich auch in den Hybridisierungsergebnissen wider, die keine starken Hintergrundsignale zeigten. Um die Kontamination der Tumor-DNA-Proben mit normaler DNA (z.B. aus Lymphozyten) unter 30% zu halten, wurden die methylgrüngefärbten Tumorzellen durch eine manuelle Mikrodissektion aus dem Tumorbereich der Paraffinschnitte isoliert. Von zwei Mammakarzinomproben wurde DNA sowohl aus in flüssigem Stickstoff asserviertem Frischgewebe als auch aus fixiertem Gewebe isoliert und für die Array-CGH eingesetzt, die dann von Dr. Richard Segraves im Labor von Donna Albertson am UCSF (Comprehensive Cancer Center) in San Francisco durchgeführt wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in Hamburg. Mit diesem Versuch sollte überprüft werden, inwieweit die DNA aus fixierten Geweben zu unspezifischen Hybridisierungssignalen führt. Es wurde eine sehr hohe Übereinstimmung der Hybridisierungsergebnisse mit der aus Frischgewebe isolierten DNA im Vergleich zu isolierter DNA aus fixiertem Gewebe festgestellt (Abb. 3.14 A und B), so dass für die nachfolgenden Analysen DNA aus fixiertem Gewebe verwendet werden konnte. Für jedes Chromosom wurde das rot/grün Fluoreszenzverhältnis der Tumor- zur Normal-DNA entlang des Genoms aufgetragen. Alle Werte des Fluoreszenzprofils wurden zur Basis 2 logarithmiert, so dass gleich starke Amplifikationen oder Deletionen sich lediglich durch ein entgegengesetztes Vorzeichen unterschieden.

Insgesamt wurden jeweils 6 Mammakarzinomproben mit bzw. ohne hämatogene Disseminierung aus dem Kollektiv der Genexpressionsanalyse auf ihr genomisches Abberationsmuster hin untersucht. (Von zwei Proben, die schon vorher für die Genexpressionsanalyse verwendet worden waren, reichte die Gewebemenge nicht mehr für die genomische Untersuchung aus). Die Standardabweichung der Hybridisierungsergebnisse, der in Triplikaten auf den Array aufgebrachten BAC-Klone, lag zwischen 0,05 und 0,10. Da männliche Referenz-DNA mit weiblicher Tumor-DNA ko-hybridisiert wurde, zeigt das gesamte X-Chromosom einen DNA-Gewinn (Abb. 3.14 A) und diente als Hybridisierungskontrolle. Das Ergebnisse für den Gewinn einer DNA-Kopie eines Genabschnittes lag statt bei dem erwarteten Wert der Fluoreszenzverhältnisse von 0,58 (Genverhältnis 3:2) in den Tumorproben bei $0,47 \pm 0,08$. Der DNA-Gewinn konnte allerdings durch die klare Trennung einzelner Genabschnitte von der basalen Linie des Fluoreszenzprofils eindeutig identifiziert werden. Die Unterbewertung der DNA-Kopiezahlen ist möglicherweise trotz der manuellen Mikrodissektion der Mammakarzinomproben auf eine Kontamination mit DNA aus nicht malignen Zellen und/oder auf die Tumorerheterogenität

zurückzuführen. Fluoreszenzverhältnisse $>0,5$ wurden in dieser Arbeit als DNA-Gewinne und Verhältnisse $< -0,5$ als DNA-Verluste bewertet. Da das Fluoreszenzverhältnis linear zur DNA-Kopiezahl zunimmt, wie Pinkel et al. zeigen konnten (Pinkel et al., 1998), entsprechen die in Abb. 3.14 A gezeigten Aberrationen für Chromosom 1 und 8 starken Amplifikationen, denn das Fluoreszenzverhältnis lag hier zwischen 1 und 1,5.

Um die Verlässlichkeit der Array-CGH-Daten zu belegen, wurde die DNA-Kopiezahl der gut charakterisierten Onkogene *HER-2/NEU* (17q12) bzw. *MYC* (8q24) in den untersuchten Tumorproben mit einer *HER-2/NEU* bzw. *MYC*-FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung)-Analyse, wie in Kap. 2.2.8. beschrieben, überprüft. Mit einer FISH-Analyse kann ein bestimmter DNA-Abschnitt in den zu untersuchenden Gewebezellen mit spezifischen DNA-Sonden präzise nachgewiesen werden. In Abb. 3.14 C und D wurde mit einem Pfeil das mit der Array-CGH ermittelte Verhältnis der DNA-Kopiezahlen für die Gene *HER-2/NEU* und *MYC* markiert und mit dem jeweiligen FISH-Ergebnis verglichen. Für das *MYC* Gen konnte sowohl in der Array-CGH als auch in der FISH-Analyse eine hohe Amplifikation des Gens detektiert werden (Abb. 3.14 C). Die *MYC* Genabschnitte lagen z.T. so nahe beieinander, dass sie als sehr große Signale (Cluster) in der FISH-Analyse zu erkennen waren. Das *HER-2/NEU* Gen der dargestellten Mammakarzinomprobe zeigte sowohl in der Array-CGH als auch in der FISH-Analyse die normale Anzahl von 2-4 Genkopien für eine ruhende bzw. sich teilende Zelle (Abb. 3.14 D- die roten Signale entsprechen den *HER-2/NEU* Genkopiezahlen, die grünen Signale zeigen mit Chromosom 17-Zentromersonden den Polyploidiegrad bezüglich des Chromosoms 17 an). Die Array-CGH-Ergebnisse stimmten in allen 12 untersuchten Mammakarzinomproben mit der *HER-2/NEU*-FISH-Analyse überein, wobei ein Fluoreszenzverhältnis in der Array-CGH von über 1,0 zur Identifikation von Genclustern mit der FISH-Analyse korrelierte. In 25% der Proben (3/12) lag in Übereinstimmung zu publizierten Daten eine mäßige bis starke Amplifikation des *HER-2/NEU*-Gens vor.

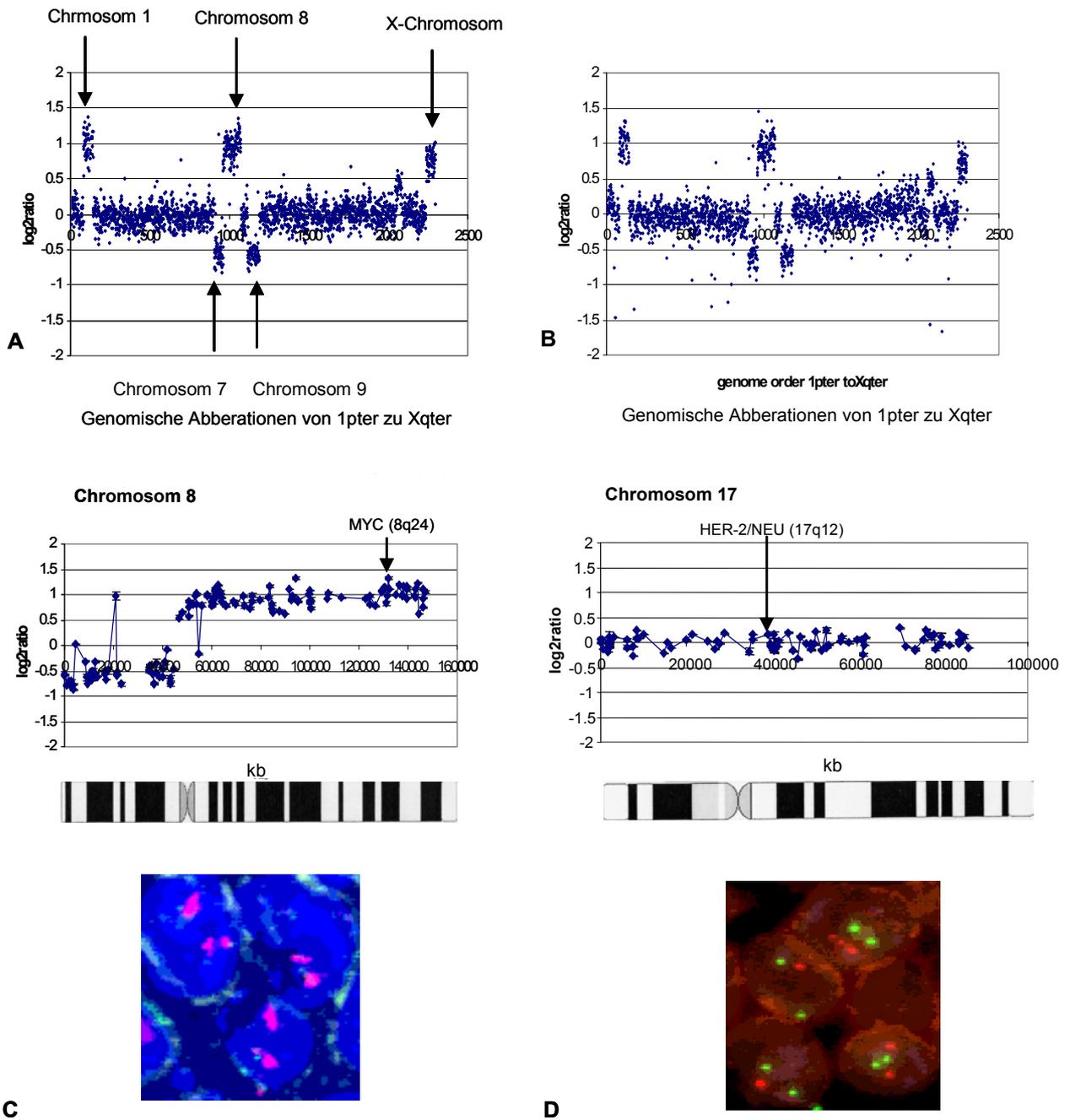


Abb. 3.14 Mit der Array-CGH ermittelte, genomische Aberrationen. Für jedes Chromosom wurde das rot/grün Fluoreszenz-Verhältnis der Tumor-zur Normal-DNA (\log_2 transformiert) entlang des Genoms aufgetragen. Die Werte entsprechen den mittleren Hybridisierungsergebnissen der in Triplikaten auf den Array aufgetragenen Genproben (BAC-Klone). Fluoreszenzverhältnisse $>0,5$ weisen auf DNA-Gewinne hin und Verhältnisse $< -0,5$ zeigen DNA-Verluste an. Die dargestellte Array-CGH wurde mit DNA aus dem Brusttumorgewebe der Probe 12 (Tabelle 2.1 in Kap. 2.1.2.1.) durchgeführt. (A) zeigt das Hybridisierungsergebnis mit DNA aus dem in flüssigem Stickstoff gelagerten Tumorgewebe und (B) mit DNA aus in Paraffin eingebettetem Brusttumorgewebe. Die Diagramme A und B zeigen ein genomisches Aberrationsmuster entlang aller Chromosomen von 1p beginnend bis Xq. Von dem Gesamtdiagramm in B wurde das Array-CGH-Ergebnis für Chromosom 8 und Chromosom 17 herausvergrößert und unter C bzw. D dargestellt. In C und D ist mit einem Pfeil jeweils der genomische Zustand für das *MYC*-Gen (8q24) bzw. für das *HER-2/NEU*-Gen (17q12) markiert. Zur besseren Identifikation des Genomabschnittes ist unter den Diagrammen ein Schema des jeweiligen gebänderten⁹ Chromosoms dargestellt. Das Array-CGH-Ergebnis für *MYC* und *HER-2/NEU* wurde in Abbildung C bzw. D mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wie in Kap. 2.2.8. beschrieben überprüft. Die roten Signale entsprechen dabei jeweils der *MYC* bzw. *HER-2/NEU*-Genkopiezahl, die mit der jeweiligen Cy3-markierten Gensonde dargestellt wurde. Die *MYC*-Genabschnitte lagen z.T. so nahe beieinander, dass sie als sehr große Signale (Cluster) zu erkennen waren und auf eine starke Amplifikation hinwiesen, die auch in der Array-CGH detektiert wurde. Das *HER-2/NEU*-FISH-Bild unter D zeigt neben den roten Signalen der *HER-2/NEU*-Gensonde auch grüne Signale einer Chromosom 17-Zentromersonde (FITC-CEP 17-Sonde), die eine Kontrolle für den Polyploidiegrad bezüglich des Chromosoms 17 darstellt.

⁹ Die Chromosomenbänderung entsteht durch Einbau von Bromdesoxyuridin in replizierende DNA und Färbung mit Giemsa, wobei frühreplizierende Bereiche dunkel und spätreplizierende Bereiche hell erscheinen (=RBG-Bänderung).

Die Array-CGH-Ergebnisse der 12 Mammakarzinome wurden außerdem mit dem in der Literatur beschriebenen Abberationsmuster primärer nicht metastatischer Mammakarzinome verglichen. Amplifikationen innerhalb der Chromosomenarme 1q, 8q, 11q, 17q und 20q wurden in einem großen Anteil der Tumorproben (in jeweils 58%, 33%, 42%, 42% und 25%) detektiert sowie Verluste innerhalb der Chromosomenarme 1p, 8p, 13q und 17p (in jeweils 33%, 58%, 50% und 17 %; Tabelle 6.5 im Anhang). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von mehreren veröffentlichten zytogenetischen Studien überein. Während einige dieser in der Literatur beschriebenen Regionen bekannte Onkogene enthalten, wie z.B. *MYC* (8q24), *CCND1* (11q13), *HER-2/NEU* (17q12) und *ZNF217* (20q139) und Tumorsuppressorgene *RB-1* (13q14) und *TP53* (17p13) sind die relevanten Gene innerhalb anderer, betroffener Regionen (z.B. der Gewinn von 1q, 8q22 und 17q22-24 sowie der Verlust von 8p) noch unbekannt.

3.5.2. Ergebnisse der Array-CGH

Um zu ermitteln in wieweit DNA-Abberationen zu der unter 3.2.1 beschriebenen differentiellen Genexpression zwischen Tumoren von KM-positiven und KM-negativen Patientinnen beigetragen haben, wurde von den in dieser Arbeit beschriebenen differentiell exprimierten Genen die DNA-Kopiezahl ermittelt (Tabelle 6.6 im Anhang). Nicht alle dieser Genloci konnten auf dem Array genau einem Gen zugeordnet werden, da die Auflösungsgrenze des Arrays bei 40 kb liegt und somit oft auch mehrere Gene abdeckte. Der Vergleich der Genexpressionsanalyse mit der Genomanalyse konnte daher nur mit 50 der 73 von Mammakarzinomzellen differentiell exprimierten Genen (68%) durchgeführt werden. 12 dieser Gene zeigten in mindestens einer der untersuchten 12 Mammakarzinomproben eine genomische Abberation (Tabelle 3.6).

Aus Tabelle 3.6 ist ersichtlich, dass sich das genomische Muster in Bezug auf die in dieser Arbeit differentiell exprimierten Gene in der KM-positiven und der KM-negativen Gruppe nur geringfügig unterschieden. Die in dieser Arbeit beschriebene differentielle Genexpression scheint somit überwiegend auf regulatorische und nicht auf genomische Veränderungen zurückzuführen zu sein. Für *CK-19* (Genlokus 17q21.1), *RHO-GDI α* (Genlokus 17q25.3) und *KISS-1* (Genlokus 1q32) zeigte sich eine leichte Tendenz für einen möglicherweise häufigeren DNA-Gewinn an den entsprechenden Genloci in Tumorproben von KM-negativen Patientinnen. Im Genlokus von *TIMP-3* (22q12.3) konnte in Tumoren von KM-positiven Patientinnen möglicherweise ein häufigerer DNA-Verlust detektiert werden. Diese Ergebnisse der Genomanalyse korrelieren mit der Genexpressionsanalyse, die für *CK-19*, *RHO-GDI α* , *KISS-1* und *TIMP-3* in der KM-positiven Gruppe eine verringerte Genexpression

zeigte. Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Tumorproben können diese Ergebnisse jedoch nur vorsichtig interpretiert werden.

Tabelle 3.6 Darstellung der in der Genexpressionsanalyse identifizierten differenziell exprimierten Gene, die in mindestens einer Tumorprobe eine genomische Aberration zeigten

Gen	Genlokus	Genomische Aberrationen (KM ⁺ Gruppe)	Genomische Aberrationen (KM ⁻ Gruppe)	Genexpressionsverhältnis (KM ⁺ / KM ⁻)
<i>EGFL2</i>	1p21	⇔ (0/6)	↓ (1/6)	0,6
<i>FRAP</i>	1p36.2	↓ (1/6)	⇔ (0/6)	0,6
<i>KISS-1</i>	1q32	↑ (1/6)	↑ (3/6)	0,4
<i>RHOH-6</i>	2pter-p12	⇔ (0/6)	↓ (1/6)	0,5
<i>Frizzled-5</i>	2q33-q34	↓ (1/6)	⇔ (0/6)	0,6
<i>CK 19</i>	17q21.1	⇔ (0/6)	↑ (2/6)	0,4
<i>TIMP-2</i>	17q25	⇔ (0/6)	↑ (1/6)	0,4
<i>RHO-GDI alpha</i>	17q25.3	↑ (1/6)	↑ (3/6)	0,6
<i>TIMP-3</i>	22q12.3	↓ (2/6)	⇔ (0/6)	0,3
<i>MAPK-2</i>	19p13.2	⇔ (0/6)	↑ (1/6)	0,1
<i>Jun-D</i>	19p13.2	⇔ (0/6)	↑ (1/6)	0,5
<i>TFAP-2C</i>	20q13.2	↑ (1/6)	↑ (1/6)	0,5

Es wurden 6 Tumore von KM-positiven(KM⁺)- bzw. KM-negativen(KM⁻)-Patientinnen des Kollektivs der Genexpressionsanalyse untersucht. Die mit der Array-CGH ermittelten genomischen Veränderungen in den jeweiligen Genloci wurden als amplifiziert (↑), deletiert (↓) oder unverändert (⇔) eingestuft, wenn das Fluoreszenzverhältnis der zur Basis 2 logarithmierten Daten > 0,5 oder <- 0,5 war bzw. dazwischen lag. In Klammern ist die Anzahl der entsprechenden Tumorproben mit genomischen Aberrationen angegeben. Die Werte der Genexpression entsprechen dem mittleren Genexpressionswert der normalisierten Daten von Tabelle 6.2.

Eine weitere Frage war, ob der Genotyp der Tumore von KM-positiven und KM-negativen Patientinnen unabhängig von den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse unterschiedliche Muster aufweist. In der Genexpressionsanalyse wurden nur 1176 Gene untersucht, so dass es möglich ist, dass die Gene oder Genabschnitte, die auf genomischer Ebene einen mit der Disseminierung assoziierten Phänotyp festlegen, nicht erfasst wurden. Die Gesamtzahl der genomischen Aberrationen (Amplifikationen/Deletionen) war zwischen der KM-positiven und KM-negativen Tumorgruppe vergleichbar (433 im Vergleich zu 503; p=0,67). Durchschnittlich konnten in der KM-positiven Probe 46 ± 20 DNA-Gewinne und 26 ± 18 DNA-Verluste detektiert werden, im Vergleich zu 54 ± 56 DNA-Gewinne und 30 ± 18 DNA-Verluste in der KM-negativen Gruppe. In Abb. 3.15 ist das genomische Aberrationsmuster der 12 Primärtumore nach einer Clusteranalyse dargestellt. Die genomischen Veränderungen in den jeweiligen Genloci wurden als amplifiziert oder deletiert eingestuft, wenn das Fluoreszenzverhältnis > 0,5 oder <- 0,5 war. DNA-Gewinnen wurde der Wert 1, DNA-Verlusten der Wert -1 und genomisch unauffälligen Regionen der Wert 0 zugeordnet. In der Clusteranalyse der Eisen-Software wurden die Tumore analysiert (Eisen et al., 1998). Grüne

Felder zeigen DNA-Verluste an, rote Felder DNA-Gewinne und schwarze Felder entsprechen genomisch unauffälligen Bereichen. Es zeigte sich, dass das genomische Muster sehr heterogen war und keine eindeutige genomische Prädisposition für einen disseminierungsassoziierten Phänotyp des Primärtumors aufwies. Die Tumore der KM-positiven und KM-negativen Patientinnen konnten auch nicht entsprechend ihres KM-Status bei der Clusteranalyse in zwei Gruppen unterteilt werden. Wie in Kap. 3.2.1. dargestellt, war diese Unterteilung auf der Genexpressionsebene möglich.

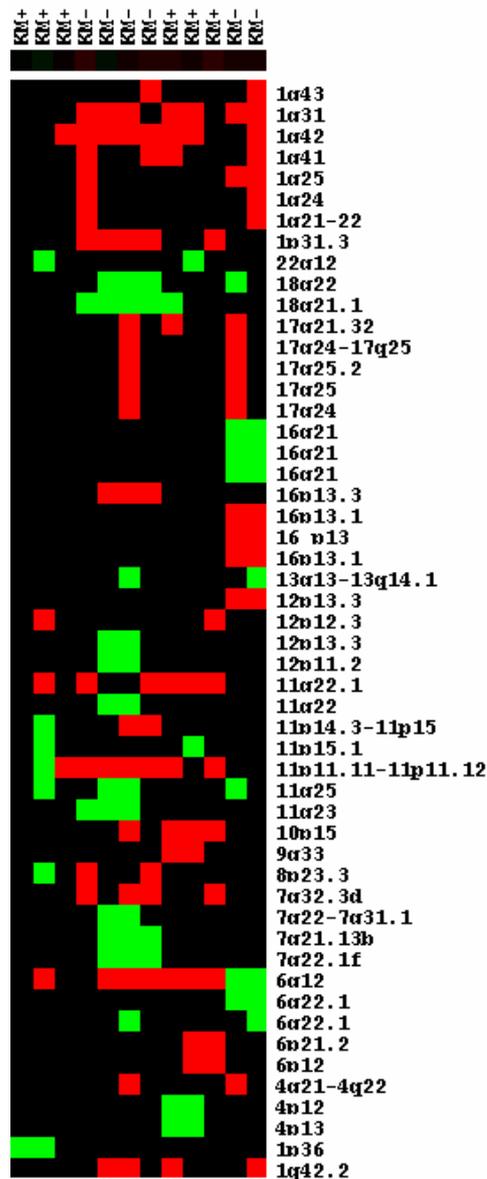


Abb. 3.15 Genomisches Abberationsmuster von insgesamt 12 Primärtumoren von KM-positiven bzw. KM-negativen Patientinnen. Es wurden nur die Genloci dargestellt, in denen sich zwischen den zwei zu vergleichenden Gruppen die Anzahl der Aberrationen um mindestens zwei unterschied. Die genomischen Veränderungen in den jeweiligen Genloci wurden als amplifiziert, deletiert oder unverändert eingestuft, wenn das Fluoreszenzverhältnis der zur Basis 2 logarithmierten Daten $> 0,5$ oder $< -0,5$ war bzw. dazwischen lag. DNA-Gewinnen wurde der Wert 1, DNA-Verlusten der Wert -1 und genomisch unauffälligen Regionen der Wert 0 zugeordnet. In einer Clusteranalyse wurden die Tumore analysiert. Grüne Felder zeigen einen DNA-Gewinn an, rote Felder einen DNA-Verlust und schwarze Felder weisen auf genomisch unauffällige Regionen hin.

4. Diskussion

Maligne epitheliale Tumore sind für die Mehrzahl aller krebsbezogenen Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich. Die wichtigste gemeinsame Ursache für die hohe Mortalität dieser Erkrankung ist die Metastasierung der Tumorzellen.

In dieser Arbeit sollten mit der cDNA-Arraytechnologie Gene identifiziert werden, die mit der hämatogenen und/oder lymphogenen Disseminierung des primären Mammakarzinoms korreliert sind, um mögliche Marker mit prognostischer Relevanz zu identifizieren und die Biologie des Disseminierungsprozesses näher zu untersuchen.

4.1. Methodische Aspekte der Genexpressionsanalyse mit cDNA-Arrays

Zur Identifizierung der Genexpressionsmuster, die mit der Tumorzell-disseminierung verknüpft sind, wurde das in dieser Arbeit verwendete Mammakarzinomgewebe so ausgewählt, dass es sich im wesentlichen nur im KM- oder LK-Status der Patientinnen unterschied. Die genaue Auswahl der Tumorproben ist sehr wichtig, da kürzlich veröffentlichte Genexpressionsanalysen an humanen Mammakarzinomen zeigten, dass das Genexpressionsmuster signifikant durch biologische und histopathologische Variablen wie den Östrogenrezeptorstatus (Gruvberger et al., 2001), das Vorhandensein von BRCA Mutationen (Hedenfalk et al., 2001) und den Histologietyp (Sorlie et al., 2001) beeinflusst wird.

Für die Hybridisierung wurde der 1.2-Cancer-Array von Clontech verwendet; dieser Array enthält 1176 cDNAs humaner Gene, die folgenden funktionellen Prozessen zugeordnet werden können: Zellzykluskontrolle, Apoptose, DNA-Reparatur, Zelladhäsion, Invasion, Wachstumsfaktoren und Signaltransduktion. Mit diesem Array wurden zwar nur etwa 3% der Gene des humanen Genoms untersucht. Es handelte sich hierbei jedoch um eine gut charakterisierte Gruppe von tumorassoziierten Genen. Hierdurch war es relativ einfach möglich, diese Gene in histogenetische und funktionelle Gruppen einzuteilen, sowie in Bezug auf definierte Reaktionswegen zu sondieren.

Durch die Normalisierung wurden Unterschiede innerhalb einzelner Hybridisierungen aufgrund technischer Variationen (Markierungs- und Detektionseffizienz der Proben) ausgeglichen. Da zwischen den in Bezug auf klinisch-pathologische Faktoren einheitlich ausgewählten Tumorproben insgesamt keine großen Unterschiede erwartet wurden (statistisch signifikante Unterschiede wurden nur in disseminierungsrelevanten Genen erwartet), hat sich die Normalisierung über alle Gene angeboten. Diese Auswertungsstrategie wurde auch von

Weinstein et al. in einer Veröffentlichung über bioinformatische Fragestellungen bei der Array-Auswertung vor kurzem favorisiert (Weinstein et al., 2002).

Die Gene wurden als differenziell exprimiert eingestuft, wenn sie im zweiseitigen Student's t-Test statistisch signifikant ($p < 0.05$) waren. Da mit dem konventionellen t-Test vermeintliche Unterschiede in der Genexpression mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% auch zufällig auftreten können, wurden die differenziell exprimierten Gene noch mit der SAM (Significance Analysis of Microarrays)-Analyse überprüft. SAM identifiziert Gene mit statistisch differenzieller Genexpression mit einem Satz spezifischer t-Tests und berechnet daraus einen Fehlerwahrscheinlichkeitsfaktor, der die Verlässlichkeit der Daten anzeigt (Tusher et al., 2001 2448). In der vorliegenden Arbeit zeigten die statistisch signifikant differenziell exprimierten Gene eine mittlere Genexpression von größer 1,9 oder kleiner 0,6. Eine um den Faktor 2 veränderte Genexpression zwischen zwei Kollektiven wurde von mehreren Forschergruppen als geeignetes Kriterium für eine differenzielle Genexpression verwendet (Perou et al., 1999; Takahashi et al., 2001).

Die Mammakarzinomproben enthielten nach der manuellen Mikrodissektion einen Tumorzellanteil von mindestens 75%. Mit der UniGene/SAGE-Datenbank wurden die differenziell exprimierten Gene, die auf eine stromale Kontamination zurückzuführen sein könnten, herausgefiltert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Diese Filterung der Daten ist nötig, da Hamadeh et al. zeigten, dass bereits ein 5%iger Anteil von MCF-7 Zellen in einer Keratinozytenzelllinie ausreicht, um einige MCF-7 spezifische Gene als differenziell exprimiert nachzuweisen (Hamadeh et al., 2002).

Die Plausibilität der in dieser Arbeit mittels cDNA-Array-Hybridisierung erzielten Ergebnisse wurde anhand von bekannten und bereits an größeren Kollektiven untersuchten Metastasierungsgenen, z.B. KISS-1 und Mitglieder der NM-23 Metastasierungssuppressorgenfamilie, überprüft (Lee and Welch, 1997; Milon et al., 1997). In Tumoren von KM-positiven im Vergleich zu KM-negativen Patientinnen zeigten diese metastasierungshemmenden Gene eine verminderte Genexpression.

4.2. Disseminierungsrelevante Genexpression und Regulationswege

In mehreren Studien an insgesamt etwa 2500 Mammakarzinompatientinnen konnte gezeigt werden, dass die Detektion von hämatogen ins KM gestreuten zytokeratinpositiven Zellen zum Zeitpunkt der Primäroperation mit der postoperativen Entstehung von Metastasen im Skelettsystem oder anderen Organen assoziiert ist (Braun et al., 2000b; Diel et al., 1996; Gebauer et al., 2001; Gerber et al., 2001; Mansi et al., 1999). In der hier vorgestellten Arbeit konnte anhand von Genexpressionsanalysen an primären Mammakarzinomgeweben (siehe Kap. 3.2) gezeigt werden, dass die hämatogene Disseminierung ins KM hauptsächlich durch die Hemmung der Genexpression charakterisiert wird. In der KM-positiven zeigten 77 Gene im Vergleich zur KM-negativen Gruppen eine verminderte und nur 9 Gene eine erhöhte Genexpression (siehe Kap. 3.2). Eine konzertierte Herunterregulierung vieler Gene wurde ebenfalls bei der Progression des Ovarialkarzinoms und der Metastasierung des Prostatakarzinoms beschrieben (Shridhar et al., 2001; Varambally et al., 2002). Diese Beobachtung unterstützt das kürzlich beschriebene Konzept, wonach die Herunterregulierung mehrerer Gene ein wichtiger neuer Mechanismus bei der Progression und Metastasierung epithelialer Tumore zu sein scheint (2002; Zetter and Banyard, 2002). Diese Beobachtung könnte damit zusammenhängen, dass Invasion und Migration in normalen Epithelzellen unter anderem durch die Expression von Metastasierungssuppressoren unterdrückt wird, um die Gewebestabilität zu gewährleisten (Bartek and Lukas, 2001). Während des Dedifferenzierungsprozesses epithelialer Tumorzellen, werden transkriptionelle Repressoren möglicherweise überexprimiert, wodurch eine umfangreiche Hemmung der Genexpression (z.B. durch Promotormetylierung) in Tumorzellen verursacht wird. Diese Hemmung der Genexpression könnte das Umschalten von einem benign- in einen maligne wachsenden Tumor ermöglichen. Dem transkriptionellen Repressor EZH2 wurde kürzlich eine bedeutende Rolle bei der Metastasierung des Prostatakarzinoms zugeordnet (Varambally et al., 2002). Hinsichtlich der Disseminierung des Mammakarzinoms ist ein ähnlicher Mechanismus denkbar, da in der vorliegenden Arbeit einige Gene (RAC, RHO, PPP-1R = Proteinghosphatase1-related-protein, Frizzled und ICAM1 = intercellular adhesion molecule) in der KM-positiven Gruppe eine erniedrigte Genexpression zeigten, die nach den Ergebnissen von Varambally et al. von EZH2 reprimiert werden (Varambally et al., 2002).

Unter den in der vorliegenden Arbeit detektierten Genen, die in der KM-positiven Gruppe eine verminderte Genexpression aufwiesen, befanden sich solche, die am Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt sind (z.B. Laminin β -1, Fibronektin, Collagen-2, -6 und -16

sowie TIMP-2 und-3). Diese reduzierte Genexpression könnte Tumorzellen das Verlassen des Tumorzellverbandes erleichtern, indem sie den Tumorzellen die Migration durch die Basalmembran ins Stroma ermöglichen. Die Basalmembran und das Stroma sind die zwei Komponenten, aus denen die ECM aufgebaut wird.

Zytokeratine (z.B. CK-8,-9,-10,-18 und-19) stellen eine weitere große Genfamilie mit verminderter Genexpression in der KM-positiven im Vergleich zur KM-negativen Gruppe dar (siehe Tabelle 6.2 im Anhang). CK-8,-18 und-19 sind die typischen strukturellen Bestandteile des Zytoskelettes normaler und maligner Zellen einfacher luminaler Epithelien, einschließlich duktaler Mammakarzinome, die aus luminalen Brustzellen entstanden sind (zur Anatomie der Brustdrüse siehe Kap. 1.1.1.). Aus diesem Grund eignen sie sich als Marker in der diagnostischen Pathologie. Da die in der Pathologie eingesetzten Zytokeratinantikörper spezifisch ein gemeinsames Epitop verschiedener Zytokeratinkomponenten detektieren, zeigten auch Primärtumoren mit einer erniedrigten Zytokeratinexpression einzelner Zytokeratine, ein eindeutig positives Färbeergebnis. Ferner kann diese differenzielle Zytokeratinexpression nicht dazu geführt haben, dass disseminierte Tumorzellen im KM aufgrund einer schwachen Zytokeratinexpression nicht detektiert wurden, da die Expression der luminalen Zytokeratine in der KM-positiven Gruppe erniedrigt vorlag. Über die Rolle der Zytokeratine in der Tumorprogression ist wenig bekannt. Im Vergleich zu normalem Brustgewebe zeigten Tumore von KM-negativen Patientinnen eine erhöhte Zytokeratinexpression, wohingegen die Zytokeratinexpression in Tumoren von KM-positiven Patientinnen der Genexpression von normalem Brustgewebe entsprach oder geringfügig erniedrigt vorlag. Die luminalen Zytokeratine könnten somit als Tumorsuppressoren wirken. Diese Beobachtung wird von Schaller et al. und Zajchowsky et al. bestätigt, die eine inverse Korrelation zwischen der CK-18 und -19-Expression und dem invasiven Wachstum von Brusttumorzelllinien beschrieben haben (Schaller et al., 1996; Zajchowski et al., 2001). Ferner zeigten Buehler et al., dass die mit CK-18 transfizierte, stark metastasierende Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 nach Injektion in immundefiziente Nacktmäuse zu keiner Metastasenbildung führte, wohingegen die Wildtypzelllinie und die mit einem Kontroll-Vektor transfizierten MDA-MB-231-Zellen in die Lunge, die Leber und das KM metastasierten (Bühler, 2003).

In Tumoren von KM-positiven Patientinnen wurde ausserdem eine verminderte Genexpression monomerer GTP-bindender Proteine der RAS-Familie (RHOH-6 und RAC-1) detektiert. RHO und RAC spielen bei der Interaktion von Integrinen mit dem Aktinzytoskelett eine wichtige regulatorische Rolle (Keely et al., 1998), so dass eine verminderte Genexpression in Primärtumoren die Zellmigration der Tumorzellen erleichtern könnte. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Zajchowski et al. überein, die zeigten, dass RHOB in

hochmetastatischen im Vergleich zu gering metastatischen Mammakarzinomzelllinien eine verminderte Genexpression aufweisen (Zajchowski et al., 2001). Diese Daten zusammen mit den kürzlich veröffentlichten Genexpressionsstudien über das humane Medulloblastom bestätigen, dass Veränderungen des Zytoskelettes eine bedeutende Rolle für die metastatische Kapazität von soliden Tumorzellen spielen.

Auch Gene, die in den RAS/MAPK-Signalweg involviert sind, zeigten in Tumoren von KM-positiven Patientinnen eine verminderte Genexpression, wie z.B. nachfolgende Serin/Threonin-Kinasen (Serin/Threonin-Kinase-3, MAP-Kinasen), Guanin-Nukleotid-Bindeproteine (RHOH-6, RAC-1 und G-Protein α), und Transkriptionsfaktoren (Jun D). Die Signalübertragung bei dem RAS/MAPK-Reaktionsweg führt u.a. nach der Bindung von Liganden an Rezeptortyrosinkinasen zur Aktivierung von RAS, woraus die Aktivierung verschiedener Tyrosin- oder Serin-Threoninkinasen (MAP-Kinasen = mitogenaktivierte Protein-Kinasen) resultiert, die unter anderem die Expression von Transkriptionsfaktoren wie JUN und FOS induzieren (siehe Abbildung 6.1 im Anhang für die schematische Darstellung dieses Reaktionsweges). Dieser Reaktionsweg scheint im Tumorgewebe der KM-positiven im Vergleich zu KM-negativen Gruppe eine verminderte Aktivität aufzuweisen. Ferner konnte in F9-Mausembryonalzellen CK-18 als eine direkte Zielstruktur des RAS-Signaltransduktionsweges identifiziert werden. Eine geringe Expression von JUN und FOS hemmen unter anderem die CK-18-Genexpression in diesen F9-Mausembryonalzellen, weil das CK-18-Gen einen Enhancer innerhalb des ersten Introns enthält, der direkt mit den Transkriptionsfaktoren JUN und FOS über eine konservierte AP-1 Bindungsstelle interagiert (Oshima et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit ist der Transkriptionsfaktor des RAS-Signaltransduktionsweges JUN herunterreguliert und könnte somit teilweise für eine verminderte CK-18-Genexpression verantwortlich sein.

Außerdem wiesen Tumore von KM-positiven eine im Vergleich zur KM-negativen Patientinnen verminderte TIMP-3-Genexpression auf. TIMP-Proteine (TIMP = Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteases) sind Inhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen und regulieren den Prozess des durch diese Proteinase hervorgerufenen Abbaus der ECM. Durch eine veränderte Genexpression können die TIMP-Proteine die Invasion von Tumorzellen begünstigen. Die TIMP-3-Genexpression der KM-positiven Gruppe entsprach den Genexpressionsverhältnissen von normalem Brustgewebe. In der KM-negativen Gruppe lag im Gegensatz dazu die TIMP-3 Genexpression in Bezug zu normalem Brustgewebe erhöht vor, so dass TIMP-3 möglicherweise invasionshemmend wirkt. Dieses Ergebnis entspricht der von Takahashi et al. beschriebenen Beobachtung beim Nierenzellkarzinom, wonach die TGF β -Expression und der in dieser Signalkaskade auftretende Effektor TIMP-3 ausschliesslich in der Gruppe mit schlechter Prognose herunterreguliert vorlag (Takahashi et al., 2001). Henriët et al. brachten darüber

hinaus eine erhöhte TIMP-2 und -3-Genexpression mit einer hemmenden Wirkung auf die Invasion, das Wachstum und die Angiogenese in Verbindung (Henriet et al., 1999).

Einige Gene, z.B. STAT-1 und (2'-5')Oligoadenylat Synthase-1, die in Tumoren von KM-positiven Patientinnen eine erhöhte Genexpression zeigten, gehören zu dem JAK/STAT Reaktionsweg (siehe Abbildung 6.2 im Anhang für die schematische Darstellung dieses Reaktionsweges). Diese Signalkaskade läuft über die Aktivierung von Januskinasen, Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT-Molekülen zur STAT-vermittelten Transkription von Effektorgenen (Darnell et al., 1994). Ursprünglich wurde dieser Reaktionsweg bei der Untersuchung der Interferon-Signaltransduktionskaskade entdeckt, die u.a. bewirkt, dass Makrophagen bei einem Virusbefall aktiviert werden. Eine signifikant erhöhte STAT-1-Genexpression in nukleären Zellextrakten wurde allerdings auch bei der Mammakarzinomprogression beschrieben (Watson and Miller, 1995). Diese Gene sind somit nicht nur an der Immunabwehr beteiligt. Interessanterweise zeigte eine Expressionsstudie von Perou et al., dass die immunhistochemisch bestimmte Proteinexpression von STAT-1 zwischen histopathologisch ähnlichen Mammakarzinomen unterschiedlich war (Perou et al., 1999). Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit und spiegelt möglicherweise das unterschiedliche metastatische Verhalten der Tumore wider.

Der HIF-1 α -Reaktionsweg, in dessen Zentrum der durch Hypoxie induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 α steht, war ein weiterer Signalweg, der in Tumoren von KM-positiven Patientinnen hochreguliert vorlag (siehe Abbildung 6.3 im Anhang für die schematische Darstellung dieses Reaktionsweges). Da die HIF-1 α -Proteinexpression schon in frühen Stadien der Mammakarzinomentwicklung erhöht ist (Bos et al., 2001), könnte dies zu dem frühen metastatischen Potential von Mammakarzinomzellen beitragen. Hypoxie wird als eine treibende Kraft angesehen, die es Zellen ermöglicht, den Primärtumor zu verlassen (Harris, 2002). In der hier vorgestellten Arbeit zeigten allerdings andere durch Hypoxie induzierte, aber HIF-1 α unabhängige Transkriptionsfaktoren (z.B. CREB und NF κ B) keine differenzielle Genexpression. Hypoxie scheint daher selbst nicht der Auslöser für die Tumorzeldisseminierung zu sein. Wahrscheinlich wird der Beginn der Metastasierung durch eine Disregulation des HIF-1 α Reaktionsweges mitverursacht. Die Aktivierung des HIF-1 α Reaktionsweges ist beschränkt auf bestimmte Gene, z.B. LDH-A (Laktat-Dehydrogenase A) und IGFBP-3 (Insulin like growth factor binding protein 3), wohingegen andere HIF-1 α -abhängige Gene z.B. VEGF (vascular epithelial growth factor), Glukose-Transporter und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in Tumoren von KM-positiven Patientinnen keine erhöhte Genexpression zeigten.

Der HIF-1 α -Reaktionsweg kann außerdem durch Interaktionen mit der Tumorumgebung, wie z.B. der Blutgefäßdichte und der Abgabe von Cytokinen durch Lymphozyten aktiviert werden (Harris et al., 2002). Die Beobachtung, dass in den Tumoren von KM-positiven eine im Vergleich zu KM-negativen Patientinnen signifikant höhere Lymphozyteninfiltration beobachtet wurde, weist auf eine mögliche Rolle der Lymphozyten bei der Disseminierung hin.

Keine der mit dem cDNA-Array untersuchten Gene, die direkt in die Kontrolle der Zellproliferation involviert sind (z.B. Cycline und cyclinabhängige Kinasen), zeigten in dieser Arbeit eine differenzielle Genexpression. Eine gesteigerte Proliferation der Tumorzellen scheint daher nicht unbedingt mit deren Neigung zur Metastasierung verknüpft zu sein. Diese Beobachtung wird von Samant et al. bestätigt, die die hochmetastatische Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 mit dem Metastasierungssuppressorgen BRMS-1 (breast-cancer metastasis suppressor 1) transfizierten. Nach Injektion dieser transfizierten Zelllinie in immundefiziente BALB/c Mäuse konnte die Metastasierungsfähigkeit gehemmt werden, ohne dass das Tumorstadium in den Mäusen beeinflusst wurde (Samant et al., 2000).

Manche Gene (z.B. die Rezeptortyrosinkinase HER-2/NEU, die Protease Cathepsin D, die Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-3 oder der Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor), die bereits mit einem metastatischen Phänotyp beim Mammakarzinom in Verbindung gebracht wurden, zeigten in der hier vorgestellten Genexpressionsanalyse jedoch keine differenzielle Genexpression. Im Vergleich zu normalem Brustgewebe wiesen diese Gene in den untersuchten Mammakarzinomen allerdings eine erhöhte Genexpression auf. Dies weist darauf hin, dass diese Gene nicht für den Beginn der Mammakarzinommetastasierung verantwortlich sind. Diese Schlussfolgerung stimmt mit den von Gerber et al. veröffentlichten immunhistochemischen Analysen von primären Mammakarzinomen überein, in denen keine signifikant differenzielle Proteinexpression von HER-2/NEU und Cathepsin D zwischen Tumoren von KM-positiven und KM-negativen Patientinnen gezeigt werden konnte (Gerber et al., 2001). Zusammenfassend könnte man sich unter Berücksichtigung der differenziell exprimierten Gene für die hämatogene Disseminierung folgendes Modell vorstellen:

In der initialen Wachstumsphase trägt u.a. die Hochregulierung des RAS-Reaktionsweges möglicherweise zum Wachstum des Primärtumors bei, so dass die lokale Tumormasse zunimmt. Im Vergleich zu histomorphologisch normalem Brustgewebe war die RAS-Genexpression in allen untersuchten Mammakarzinomproben erhöht. Die erhöhte RAS-Genexpression ist wahrscheinlich auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen, da aktivierende RAS-Mutationen beim Mammakarzinom nur mit einer Häufigkeit von etwa 5% vorkommen (Weijnen et al., 1999). Der Verlust der Adhäsion, die Umgestaltung der

extrazellulären Matrix und die gesteigerte Tumorzellplastizität durch Reorganisation des epithelialen Zytokeratin- und Aktinzytoskelettes stellen initiale Ereignisse der Metastasierung dar, die möglicherweise u.a. durch eine Herunterregulierung des RAS- und die Induktion des HIF-1 α Reaktionsweges induziert werden.

Das Genexpressionsprofil, das mit der Entstehung distanter hämatogener Metastasen bei LK-negativen Mammakarzinompatientinnen assoziiert ist, wurde bisher in einer Studie von van 't Veer et al. untersucht (van 't Veer et al., 2002). Das Ziel der Studie war die Identifikation von Markern mit prognostischer Relevanz. 11 der 70 ausgewählten Gene mit prognostischer Relevanz für die Metastasierung wurden auch in der hier vorgestellten Arbeit untersucht. Zwei dieser 11 Gene erschienen sowohl in der van 't Veer Studie als auch in dieser Arbeit differenziell exprimiert: DCK (Deoxycytidine-Kinase; herunterreguliert in KM-positiven Patientinnen: $p=0,07$; grenzwertig signifikant) und TGF β 3 (Transforming Growth Factor β ; herunterreguliert in Tumoren von KM-positiven Patientinnen: $p=0,045$). DCK ist für die Phosphorylierung mehrerer Desoxynukleoside verantwortlich und eine verminderte Enzymaktivität ist mit einer Resistenz gegenüber antikarzinogenen Chemotherapeutika verbunden. TGF β wird in der frühen Phase der Tumorprogression als Tumorsuppressor und später als ein Mediator für Invasion und aggressiveres Tumorwachstum beschrieben (Derynck et al., 2001). Für die anderen Gene konnte in der vorliegenden Arbeit keine statistische Signifikanz gezeigt werden. Dieser Unterschied könnte damit zusammenhängen, dass ein Teil dieser Gene nicht von Tumorzellen exprimiert wird (z.B. MMP-9 (Matrix-Metalloproteinase-9)), da sich die vorliegende Arbeit auf die von Mammakarzinomzellen exprimierten Transkripte konzentriert hat. Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von mikrometastatischen Zellen im KM und nicht das Vorhandensein von manifesten Knochenmetastasen zur Gruppeneinteilung der Primärtumore ausgewählt. Auf diese Weise konnte die der Disseminierung zu Grunde liegende Biologie untersucht werden. Da der Metastasierungsprozess aus mehreren Schritten (Streuung der Tumorzellen, Überleben dieser Zellen im Blut und in Sekundärorganen, Auswachsen disseminierter Tumorzellen zu Metastasen und Angiogenese) besteht, kann mit dem Fokus auf manifeste Metastasen nur das Ende dieses komplexen Prozesses untersucht werden.

Es zeigte sich, dass sich das Genexpressionsmuster, das mit der hämatogenen Tumorzeldisseminierung assoziiert war, beträchtlich von dem Genexpressionsmuster der lymphogenen Tumorzeldisseminierung unterschied. Um die hämatogene Streuung zu Sekundärorganen zu ermöglichen, benötigen Zellen bestimmte Adaptationen, um in den Blutstrom einwandern und dort überleben zu können. Im Gegensatz dazu scheinen diese

Anpassungen bei der lymphogenen Metastasierung weniger stark ausgeprägt zu sein. Dies zeigt sich darin, dass bei der lymphogenen Metastasierung nur etwa halb so viele Gene wie bei der hämatogenen Disseminierung differenziell exprimiert wurden (73 Gene bei der hämatogenen Disseminierung im Vergleich zu 40 Genen bei der lymphogenen Metastasierung) und dass keine eindeutigen Signalwege identifiziert werden konnten (siehe Tabelle 3.3. unter 3.2.3.). Für diesen Vergleich wurden nur die exprimierten Gene berücksichtigt, die höchstwahrscheinlich aus den disseminierten Brusttumorzellen stammten. Ferner ergab die SAM-Analyse einen hohen Wert für den Fehlerwahrscheinlichkeitsfaktor, was ebenfalls anzeigt, dass das Genexpressionsprofil der Primärtumoren für die lymphogene Disseminierung nicht sehr prägnant war, um den LK-Status vorauszusagen.

Der Unterschied in der Genexpression der beiden Disseminierungswege erklärt möglicherweise auch die fehlende Korrelation zwischen der Detektion von disseminierten Mammakarzinomzellen im KM und in den regionalen LK (Braun et al., 2000b). Obwohl Tumorzellen vom LK zu Sekundärorganen streuen können und der LK-Status der wichtigste traditionelle Prognosefaktor beim primären Mammakarzinom ist, finden sich bei 60% von Mammakarzinompatientinnen mit LK-Metastasen keine disseminierten Tumorzellen im KM (Braun et al., 2000), d.h. die Korrelation zwischen dem Nodalstatus und dem Auftreten von Fernmetastasen beim Mammakarzinom ist nicht so stark ausgeprägt wie bei anderen soliden Tumoren (z.B. bei Kopf-Hals-Tumoren; Zarbo and Crissman, 1988).

Neun Gene stellten sich sowohl bei der hämatogenen als auch bei der lymphogenen Disseminierung als differenziell exprimiert heraus. Unter diesen Genen war auch Plakoglobin, dem eine zentrale Rolle bei der homotypischen epithelialen Zelladhäsion zugeordnet wird. Der Verlust der Zell-Zell Adhäsion wurde als ein früher Schritt in der Progression von epithelialen Tumoren beschrieben (Bex and Van Roy, 2001). Eine mögliche prognostische Relevanz von Plakoglobin bei der Metastasierung wurde bei Lungenkarzinomen nachgewiesen (Panel et al., 1998). In dieser Arbeit konnte allerdings die Plakoglobingenexpression, wie in Kap. 3.3. beschrieben, nicht mit der Proteinexpression verifiziert werden, so dass die Bedeutung von Plakoglobin für die hämatogene und lymphogene Disseminierung beim Mammakarzinom fraglich bleibt.

Zytokeratine wurden bei der lymphogenen Disseminierung nicht differenziell exprimiert, d.h. die differenzielle Zytokeratinexpression ist offenbar spezifisch für die hämatogene Disseminierung.

Die differenzielle Genexpression von STAT-1, HIF-1 α und von CK-8,-18 und-19 in Tumoren von KM-positiven im Vergleich zu KM-negativen Patientinnen korrelierte mit der entsprechenden Proteinexpression. Zusätzlich wurde die Expression dieser Proteine an einem größeren Kollektiv mit einer unabhängigen Testgruppe validiert. Diese Testgruppe bestand aus 83

Mammakarzinomstanzen von Patientinnen mit bekanntem KM-Status, die in einem Gewebearray (Mikrometastasenarray) zusammengefasst wurden. Für CK-8,-18 und-19 konnte eine signifikant verminderte Proteinexpression und für STAT-1 und HIF-1 α eine erhöhte Proteinexpression in dem Mammakarzinomen von KM-positiven im Vergleich zu KM-negativen Patientinnen gezeigt werden (siehe Kap. 3.4).

In einem weiteren Ansatz wurde überprüft, ob die reduzierte Proteinexpression von CK-8,-18 und-19 außer für die Disseminierung auch für das Anwachsen der disseminierten Brusttumorzellen zu distanten Metastasen eine Rolle spielt. Hierfür wurde die prognostische Relevanz dieser Zytokeratine bestimmt, da die Prognose der Mammakarzinompatientinnen hauptsächlich durch das Auftreten von Metastasen bestimmt wird. Diese Untersuchung erfolgte mit einem Mammakarzinomprognosearray bestehend aus 611 Brusttumorstanzen von Mammakarzinompatientinnen mit bekannten Daten über deren tumorassoziiertes Überleben. Mit der Kaplan-Meier-Analyse wurde die Anzahl der Überlebenden in beiden Gruppen (d.h. Tumore mit normaler bzw. reduzierter CK-8,-18 oder-19 Proteinexpression) abgeschätzt (siehe Kap. 3.5). Bei dieser Analyse des tumorspezifischen Überlebens wurden nur die Tumore von Patientinnen berücksichtigt, deren Todesfälle auf die Tumorerkrankung zurückzuführen waren. Dabei zeigte sich, dass eine herunterregulierte CK-18-Proteinexpression mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert ist als die herunterregulierte CK-8- oder -19-Proteinexpression. Alle drei Zytokeratine sind signifikant mit der Tumorzelldisseminierung ins KM assoziiert, jedoch nur eine herunterregulierte CK-18-Proteinexpression spielt auch für das Anwachsen der disseminierten Brusttumorzellen zu distanten Metastasen eine Rolle. Die herunterregulierte CK-8 und -19-Proteinexpression scheint für diese zweite Phase der metastatischen Kaskade dagegen weniger relevant zu sein.

Für Plakogobin, TGF β 2 und RhoB konnte die differenzielle Genexpression auf Proteinebene nicht verifiziert werden (siehe unter 3.3). Dies mag teilweise daran liegen, dass die Proteinexpression dieser Gene im Mammakarzinomgewebe heterogen vorlag, so dass die immunhistochemische Bestimmung der Proteinexpression nicht eindeutig möglich war. Möglicherweise werden diese Gene auch posttranslational und nicht nur transkriptionell reguliert werden.

4.3. Disseminierungsrelevante genomische Aberrationen

In einem weiteren Ansatz wurde überprüft, ob der mit der Disseminierung assoziierte Phänotyp durch eine Kaskade von DNA-Aberrationen determiniert ist. Hierfür wurde zusätzlich zu der

Genexpressionsanalyse der genomische Status der Tumorzellen mit Hilfe der hochauflösenden Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization) bestimmt. Das Beispiel des Her2/neu Gens hat gezeigt, dass amplifizierte Gene, die zur Überexpression eines funktionell relevanten Proteins führen, besonders geeignete pharmakologische Zielstrukturen für eine spezifische Krebstherapie darstellen.

Mit der CGH können DNA-Verluste und -Gewinne entlang des gesamten Genoms erkannt werden (siehe Kap. 3.4). Doch aufgrund der Hybridisierung der DNA auf normale Metaphasen-Chromosomen, die hochkondensierte und „supercoilte“ DNA enthalten, können mit der CGH nur genomische Aberrationen mit einer Größe von mehr als 20 Mb detektiert werden. Bei der hier beschriebenen Array-CGH wurde die Tumor- und Referenz-DNA auf Glasobjektträgern, die fast 2500 in Triplikaten aufgebrachte BAC-Klone enthielten (= Arrays), hybridisiert. Dadurch konnte eine Auflösung von bis zu 40 kb erreicht werden (Pinkel et al., 1998; Snijders et al., 2001).

Um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit dem genomischen Abberationszustand der entsprechenden Gene zu vergleichen, wurde eine Array-CGH an jeweils 6 autologen Mammakarzinomgeweben der KM-positiven bzw. KM-negativen Gruppe durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich der genomische Zustand der betreffenden Gene in der KM-positiven im Vergleich zu der KM-negativen Gruppe nur geringfügig unterschied. Die in dieser Arbeit beschriebene differenzielle Genexpression scheint somit überwiegend auf regulatorische Veränderungen zurückzuführen zu sein. Diese Beobachtung entspricht den von Pollack et al. beschriebenen Ergebnissen, die bei der Mammakarzinomzelllinie BT474 das genomische Aberrationsmuster und die Genexpressionsergebnisse verglichen. Diese Forschergruppe verwendete sowohl für die Genom- als auch für die Transkriptomanalyse einen Array der 4000 cDNAs enthielt (Pollack et al., 1999). Dabei zeigte sich, dass viele stark exprimierte Gene nicht amplifiziert waren und nicht alle amplifizierten Gene hoch exprimiert wurden. Nur eine kleine Anzahl von Genen lag sowohl amplifiziert als auch hochexprimiert vor. Wie Pollak et al. kürzlich darstellte, sollen nur 12% aller Veränderungen in der Genexpression zwischen Mammakarzinomen direkt auf Variationen in der Genkopiezahl zurückzuführen sind (Pollack et al., 2002). Platzer et al., berichteten beim metastatischen Kolonkarzinomen sogar von nur 4% von Genen, die innerhalb amplifizierter Regionen im Vergleich zu normalem Kolonepithel hochreguliert (> 2-fach) vorlagen (Platzer et al., 2002). Aus dieser Beobachtung folgerten Platzer et al., dass chromosomale Amplifikationen nicht zu einer weitreichenden Induktion der Genexpression führen, sondern dass die Genexpression im Grossteil durch die Transkriptionsmaschinerie streng reguliert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das genomische Gesamtmuster des Primärtumors zwischen der KM-positiven und KM-negativen Gruppe sehr heterogen war und keine eindeutige genomische Prädisposition für einen Disseminierungsphänotyp aufwies.

Deshalb konnten die Tumore der KM-positiven und KM-negativen Patientinnen auch nicht entsprechend ihres KM-Status bei der Clusteranalyse in zwei Gruppen unterteilt werden. Im Gegensatz dazu konnte auf der Genexpressionsebene diese Unterteilung wie in Kap. 3.2.1. beschrieben erfolgreich durchgeführt werden.

Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit beschriebenen differenziell exprimierten Genen keine genomischen Aberrationen zeigten, könnte möglicherweise auch an epigenetischen Veränderungen liegen, wie z.B. der Inaktivierung von Genen durch Methylierungen. Beim Ovarialkarzinom wurden derartige Veränderungen als ein frühes Ereignis in der Karzinomprogression beschrieben (Cheng et al., 1997). Die Theorie, dass Amplifikationen und Deletionen späte Ereignisse in der Karzinogenese sind (Ranzani et al., 1990) und mit unserem Ansatz deswegen möglicherweise nicht erfasst werden konnten, trifft für das untersuchte Kollektiv nicht zu. Im Durchschnitt konnten in der KM-positiven Gruppe 72 und in der KM-negativen Gruppe 84 Aberrationen detektiert werden.

4.4. Neues Modell der Tumorzeldisseminierung

Trotz der genetischen Heterogenität von Mammakarzinomen konnte in dieser Studie ein klares molekulares Expressionsmuster mit der hämatogenen und weniger prägnant mit der lymphogenen Disseminierung assoziiert werden. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die frühe Tumorzellstreuung ein fundamentaler biologischer Prozess beim Mammakarzinom ist, der zumindest teilweise im Phänotyp des Primärtumors verankert ist (van de Vijver et al., 2002; van 't Veer et al., 2002). Die traditionelle Hypothese der Tumorprogression nach Vogelstein (Vogelstein et al., 1988) wurde am Beispiel der Progression des Kolonkarzinoms beschrieben. Sie besagt, dass solide Tumore durch aufeinanderfolgende Mutationen charakteristische Eigenschaften erwerben, die für das Tumorwachstum essentiell sind, wie z.B. die konstitutive Expression mitotischer Signale, die Ausschaltung des Apoptose-Mechanismus und die Einschaltung der Angiogenese (Hanahan and Weinberg, 2000). Nach diesem Modell erwerben einige Tumorzellen während der Tumorentstehung bestimmte zusätzliche Mutationen, die ihnen die Fähigkeit zur Metastasierung verleihen. Die Metastasen entstehen nur aus kleinen Subklonen des Primärtumors (Poste and Fidler, 1980). Da diese metastatischen Tumorzellen allerdings innerhalb des Primärtumors nicht effizienter als andere Tumorzellen proliferieren und gleichzeitig nur sehr wenige metastatische Zellen (etwa 0,05%) erfolgreich zu manifesten Metastasen auswachsen (Abati and Liotta, 1996), ist unklar, wie Metastasen überhaupt entstehen können.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse belegen, dass Subklone eines Primärtumors mit metastatischem Potential zumindest so groß innerhalb des Primärtumors sein müssen, dass Genexpressionsprofile, die mit der metastatischen Streuung assoziiert sind, unterschieden werden können. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einem von Weinberg und Bernand vorgestellten alternativen Konzept zur Metastasierung, demzufolge schon sehr früh in der Tumorentwicklung Tumorzellen sowohl mit Wachstumsvorteil als auch mit einer Neigung zur Metastasierung entstehen (Bernards and Weinberg, 2002). Als Konsequenz davon trägt die Mehrzahl der Zellen in einem metastasierenden Tumor (und nicht nur eine kleine Subpopulation) den metastatischen Phänotyp. Dieses Konzept kann auch erklären, weshalb schon in sehr frühen Stadien der Mammakarzinomentstehung disseminierte Tumorzellen im KM gefunden werden können. Nach diesem Modell gibt es keine Gene, die speziell oder ausschliesslich für die Metastasierung zuständig sind, sondern der Metastasierungsprozess wird vielmehr durch die bekannten Tumorsuppressorgene oder Onkogene auf Genexpressionsebene bestimmt. Für die Onkogene RAS und MYC konnte bereits am Mausmodell gezeigt werden, dass diese Gene Tumorzellen die Fähigkeit zur Metastasierung verleihen können (Webb and Vande Woude, 2001).

4.5. Ausblick

Die frühe Detektion von disseminierten Tumorzellen im KM zum Zeitpunkt der Primäroperation kann bei der Entscheidung helfen, ob eine Mammakarzinompatientin durch die Entfernung des Primärtumors und der axillären LK ausreichend behandelt wurde oder ob eine adjuvante (operationsbegleitende) Therapie benötigt wird. Die KM-Biopsie und der Nachweis disseminierter Tumorzellen im KM sind aufwendige Analyseverfahren, die nicht routinemäßig in allen Labors durchgeführt werden können. Deshalb besteht die Notwendigkeit, Markerproteine zu identifizieren, die sich immunhistochemisch an Paraffinschnitten bestimmen lassen und einen Hinweis auf das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im KM geben. Anhand der unterschiedlichen Genexpressionsprofile primärer Mammakarzinome von Patientinnen mit bzw. ohne Tumorzell dissemination konnten mögliche Marker (z.B. eine herunterregulierte CK-8, -18 und -19 Proteinexpression) identifiziert werden, die eine Tumorzell dissemination anzeigen. Da es mehrere Antikörper gegen diese luminalen Zytokeratine gibt und von jedem Patienten Paraffinschnitte mit Tumorgewebe zur Verfügung stehen, könnte diese Analyse leicht in die Klinik eingeführt werden. Inwiefern der Beginn der Metastasierung durch eine einfache immunhistochemische Färbung von Primärtumoren mit Antikörpern gegen einige Marker (z.B.

Zytokeratine und HIF-1 α), erkannt werden kann und wieviele Marker untersucht werden müssen, um eine zuverlässige Aussage über den Disseminierungszustand der Patientinnen treffen zu können, muss noch an großen Patientenkollektiven untersucht werden.

Durch eine bessere Selektion der Mammakarzinompatientinnen, die eine systemische adjuvante Therapie benötigen, könnte der Prozentsatz von durchschnittlich 68% übertherapierten Patientinnen nach den Richtlinien der St. Gallen Konsensus-Konferenz von 2001 (siehe Kap. 1.1.2) deutlich gesenkt werden. In der Genexpressionsstudie von van't Veer (siehe Kap. 1.5) konnten 70 prädiktive Markergene identifiziert (van 't Veer et al., 2002) und an einem Kollektiv von fast 300 LK-positiven und -negativen Mammakarzinompatientinnen überprüft werden (van de Vijver et al., 2002). Anhand des Genexpressionsprofils der 70 Markergene in den primären Mammakarzinomen wurden mehr LK-negativen Patientinnen in die Niedrigrisikogruppe eingeteilt, als mit den Kriterien der St. Gallen Konsensus Konferenz von 2001 (40% im Vergleich zu 15% aufgrund der Genexpressionsergebnisse). Allerdings ist diese Methode der Bestimmung des Genexpressionsprofils des Primärtumors sehr aufwendig, teuer und auf die Verfügbarkeit von Frischgewebe angewiesen, so dass sie sich nicht für eine klinische Routineuntersuchung eignet. Hierfür eignen sich Färbungen an Paraffinschnitten mit Markerproteinen, die mit der Metastasierung assoziiert sind wesentlich besser.

Neben der Identifizierung möglicher Markerproteine für die hämatogene Disseminierung beim Mammakarzinom wurde in dieser Arbeit insbesondere die Biologie des Disseminierungsprozesses untersucht. Durch die Identifikation von Signalwegen bei der Tumorzell-disseminierung (z.B. der RAS und HIF1- α -Reaktionsweg) könnte die zukünftige Entwicklung effizienterer anti-metastatischer Behandlungsmethoden (z.B. Antikörpertherapien oder Therapien mit Tyrosinkinaseinhibitoren) ermöglicht werden.

5. Literatur

- Abati, A., and Liotta, L. A. (1996). Looking forward in diagnostic pathology: the molecular superhighway. *Cancer* 78, 1-3.
- Ali, S. M., and Coombes, R. C. (2002). Endocrine-Responsive Breast Cancer And Strategies For Combating Resistance. *Nature Reviews Cancer* 2, 101-112.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Are all cancer genes equal? *Nature* 2001Jun28;411(6841):1001-2 411, 1001-1102.
- Basak, S., Speicher, D, Eck, S., Wunner, W., Maul, G., Simmons, M. S., and Herlyn, D. (1998). Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue. *J Natl Cancer Inst* 90, 691-697.
- Bernards, R., and Weinberg, R. A. (2002). A progression puzzle. *nature* 418, 823.
- Berx, G., and Van Roy, F. (2001). The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 3, 289-293.
- Bissell, M. J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1, 46-54.
- Bloom, H. J. G., and Richardson, W. W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases in which 359 have been followed for 15 years. *BritJCancer* 11, 359.
- Bos, R., van der Groep, P., Greijer, A. E., Sharts, A., Meijer, S., Pinedo, H. M., Semenza, G. L., van Diest, P. J., and van der Wall, E. (in press). Level of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Independently Predict Prognosis in Lymph Node negative Breast Cancer Patients. *Cancer*.
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C. F., Mommers, E. C., Semenza, G. L., Pinedo, H. M., Abeloff, M. D., Simons, J. W., van Diest, P. J., and van der Wall, E. (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 93, 309-314.
- Braun, S., and Pantel, K. (1998). Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. *Breast Cancer Res Treat* 52, 201-216.
- Braun, S., and Pantel, K. (1999). Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer Metastasis Rev* 18, 75-90.
- Braun, S., Kentenich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H., and Pantel, K. (2000a). Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18, 80-86.
- Braun, S., Pantel, K., Muller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, C. R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmuller, G., Schlimok, G. (2000b). Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342, 525-533.
- Braun, S., Schlimok, G., Heumos, I., Schaller, G., Riethdorf, L., Riethmuller, G., and Pantel, K. (2001). ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 61, 1890-1185.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo,

J., Vingron, M. (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29, 365-371.

Bühler, H, Becker, C, and Schaller, G. (2003 submitted). Transfected keratin 18 is a potent inhibitor of metastasis in breast cancer.

Burck, H-C. (1982) *Histologische Technik*. Thieme-Verlag (5. unveränderte Auflage).

Cameron, M. D, Schmidt, E. E., Kerkvliet, N, Nadkarni, K. V., Morris, V. L., Groom, A. C, Chambers, A. F., and MacDonald, I. C. (2000). Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 60, 2541-2546.

Chambers, A. F., Groom, A. C, and MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2, 563-572.

Cheng, P, Schmutte, C, Cofer, K. F., Felix, J. C., Yu, M. C., and Dubeau, L. (1997). Alterations in DNA methylation are early, but not initial, events in ovarian tumorigenesis. *Br J Cancer* 75, 396-402.

Clark, G. M., and McGuire, W. L. (1988). Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *SeminOncol* 15, 20-25.

Cole, B. F., Gelber, R. D., Gelber, S., Coates, A. S., and Goldhirsch, A. (2001). Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised clinical trials with quality-adjusted survival analysis. *Lancet* 358, 277-286.

Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K. A., Stein, H., and Mason, D. Y. (1984). Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32, 219-229.

Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.

De Vita, V. T., Jr. (1989). Breast cancer therapy: exercising all our options. *N Engl J Med* 320, 527-529.

Dearnaley, D. P., Sloane, J. P., Ormerod, M. G., Steele, K., Coombes, R. C., Clink, H. M., Powles, T. J., Ford, H. T., Gazet, J. C., and Neville, A. M. (1981). Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 44, 85-90.

Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-129.

Di Pietro, S., Bertario, L., Cantu, G., and Re, A. (1976). An analysis of 800 breast cancer patients relapsed after radical mastectomy. *Tumori* 62, 99-112.

Diel, I. J., Kaufmann, M., Costa, S. D., Holle, R., von Minckwitz, G., Solomayer, E. F., Kaul, S., and Bastert, G. (1996). Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 88, 1652-1658.

Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.

Ewing, J. (1928). *A treatise on tumours.*, 3rd edn. edn (Philadesphia, Saunders,W.B.).

Falcioni, R., Antonini, A., Nistico, P., Di Stefano, S., Crescenzi, M., Natali, P. G., and Sacchi, A. (1997). Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 236, 76-85.

Fidler, I. J., and Hart, I. R. (1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217, 998-1003.

Finlin, B. S., Gau, C. L., Murphy, G. A., Shao, H., Kimel, T., Seitz, R. S., Chiu, Y. F., Botstein, D., Brown, P. O., Der, C. J., Tamanoi, F., Andres, D.A., Perou, C.M. (2001). RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *J Biol Chem* 276, 42259-42267.

Fox, S. B., Leek, R. D., Bliss, J., Mansi, J. L., Gusterson, B., Gatter, K. C., and Harris, A. L. (1997). Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 89, 1044-1049.

Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D., and Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113, 173-185.

Gebauer, G., Fehm, T., Merkle, E., Beck, E. P., Lang, N., and Jager, W. (2001). Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 19, 3669-3674.

Gerber, B., Krause, A., Muller, H., Richter, D., Reimer, T., Makovitzky, J., Herrring, C., Jeschke, U., Kundt, G., and Friese, K. (2001). Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 19, 960-971.

Goldhirsch, A., Glick, J. H., Gelber, R. D., Coates, A. S., and Senn, H. J. (2001). Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 19, 3817-3827.

Gruvberger, S., Ringner, M., Chen, Y., Panavally, S., Saal, L. H., Borg, A., Ferno, M., Peterson, C., and Meltzer, P. S. (2001). Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 61, 5979-5984.

Guise, T. A. (1997). Parathyroid hormone-related protein and bone metastases. *Cancer* 80, 1572-1580.

Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T., and Mundy, G. R. (1996). Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98, 1544-1549.

Hamadeh, H. K., Bushel, P., Tucker, C. J., Martin, K., Paules, R., and Afshari, C. A. (2002). Detection of diluted gene expression alterations using cDNA microarrays. *Biotechniques* 32, 322, 324, 326-329.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Harbeck, N., Dettmar, P., Thomssen, C., Henselmann, B., Kuhn, W., Ulm, K., Janicke, F., Hofler, H., Graeff, H., and Schmitt, M. (1998). Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer. *Anticancer Res* 18, 2187-2197.

Harris, A. L. (2002). Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2, 38-47.

Hart, I. R., and Saini, A. (1992). Biology of tumour metastasis. *Lancet* 339, 1453-1457.

- Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Kallioniemi, O. P., Wilfond, B., Borg, A., Trent, J. (2001). Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 344, 539-548.
- Henriet, P., Blavier, L., and Declerck, Y. A. (1999). Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *Apmis* 107, 111-119.
- Holmgren, L., O'Reilly, M. S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1, 149-153.
- Hosch, S., Kraus, J., Scheunemann, P., Izbicki, J. R., Schneider, C., Schumacher, U., Witter, K., Speicher, M. R., and Pantel, K. (2000). Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Res* 60, 6836-6840.
- Huang, H., Colella, S., Kurrer, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2000). Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 60, 6868-6874.
- Hulsken, J., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1994). Tumor-suppressor gene products in cell contacts: the cadherin-APC-armadillo connection. *Curr Opin Cell Biol* 6, 711-716.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Kaplan, E. L., and Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *American Statistical Association Journal* 53, 457-481.
- Keely, P., Parise, L., and Juliano, R. (1998). Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. *Trends Cell Biol* 8, 101-106.
- Khoury, H., Dankort, D. L., Sadekova, S., Naujokas, M. A., Muller, W. J., and Park, M. (2001). Distinct tyrosine autophosphorylation sites mediate induction of epithelial mesenchymal like transition by an activated ErbB-2/Neu receptor. *Oncogene*, 20(7), 788-799.
- Klein, C. A., Blankenstein, T. J. F., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H., and G., R. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *The Lancet* 360, 683-689.
- Klein, C. A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J. A., Pantel, K., Speicher, M. R., and Riethmuller, G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4494-4499.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., and Kallioniemi, O. P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844-847.
- Kubuschok, B., Passlick, B., Izbicki, J. R., Thetter, O., and Pantel, K. (1999). Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 17, 19-24.
- Lee, J. H., and Welch, D. R. (1997). Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 57, 2384-2387.
- Liotta, L. A., and Kohn, E. (1990). Cancer invasion and metastases. *Jama* 263, 1123-1126.
- Liotta, L. A., Kleinerman, J., and Saidel, G. M. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34, 997-1004.

- Loeb, K. R., and Loeb, L. A. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21, 379-385.
- Lonning, P. E., Sorlie, T., Perou, C. M., Brown, P. O., Botstein, D., and Borresen-Dale, A. L. (2001). Microarrays in primary breast cancer-lessons from chemotherapy studies. *Endocr Relat Cancer* 8, 259-263.
- Maehara, Y., Hasuda, S., Abe, T., Oki, E., Kakeji, Y., Ohno, S., and Sugimachi, K. (1998). Tumor angiogenesis and micrometastasis in bone marrow of patients with early gastric cancer. *Clin Cancer Res* 4, 2129-2134.
- Maniatis, T.; Sambrook, J., Fritsch, E.F. (1998). *Molecular Cloning* (1). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mansi, J. L., Gogas, H., Bliss, J. M., Gazet, J. C., Berger, U., and Coombes, R. C. (1999). Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 354, 197-202.
- Milon, L., Rousseau-Merck, M. F., Munier, A., Erent, M., Lascu, I., Capeau, J., and Lacombe, M. L. (1997). nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13. *Hum Genet* 99, 550-557.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Mundy, G. R. (1991). Mechanisms of osteolytic bone destruction. *Bone* 12 Suppl 1, S1-6.
- Mundy, G. R. (1997). Mechanisms of bone metastasis. *Cancer* 80, 1546-1556.
- Mundy, G. R. (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2, 584-593.
- Nabeshima, K, Inoue, T., Shimao, Y., and Sameshima, T. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. *Pathol Int* 52, 255-264.
- Oshima, R. G., Abrams, L., and Kulesh, D. (1990). Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev* 4, 835-848.
- Overgaard, M., Hansen, P. S., Overgaard, J., Rose, C., Andersson, M., Bach, F., Kjaer, M., Gadeberg, C. C., Mouridsen, H. T., Jensen, M. B., and Zedeler, K. (1997).
- Paget, S. (1889). the distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 99-101.
- Pantel, K., Braun, S., Passlick, B., and Schlimok, G. (1996). Minimal residual epithelial cancer: diagnostic approaches and prognostic relevance. *Prog Histochem Cytochem* 30, 1-60.
- Pantel, K., Cote, R. J., and Fodstad, O. (1999). Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91, 1113-1124.
- Pantel, K., Passlick, B., Vogt, J, Stosiek, P, Angstwurm, M., Seen-Hibler, R., Haussinger, K., Thetter, O., Izbicki, J. R., and Riethmuller, G. (1998). Reduced expression of plakoglobin indicates an unfavorable prognosis in subsets of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 16, 1407-1413.
- Pantel, K., Dickmanns, A., Zippelius, A., Klein, C., Shi, J., Hoechtlen-Vollmar, W., Schlimok, G., Weckermann, D., Oberneder, R., Fanning, E (1995). Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 87, 1162-1168.

- Pantel, K, Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, D, Schmaus, W., Gath, H, Passlick, B., Izbicki, J. R., and Riethmuller, G. (1994). Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 3, 165-173.
- Pantel, K, Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D, Lindemann, F., Schaller, G., Funke, I., Izbicki, J. R., and Riethmuller, G. (1993). Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85, 1419-1424.
- Pantel, K, Schlimok, G., Kutter, D, Schaller, G., Genz, T., Wiebecke, B., Backmann, R., Funke, I., and Riethmuller, G. (1991). Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* 51, 4712-4715.
- Paterson, A. H. (2002). Bisphosphonates: biological response modifiers in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 3, 206-216.
- Pauli, B. U., and Lee, C. L. (1988). Organ preference of metastasis. The role of organ-specifically modulated endothelial cells. *Lab Invest* 58, 379-387.
- Perou, C. M., Jeffrey, S. S., van de Rijn, M., Rees, C. A., Eisen, M. B., Ross, D. T., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Zhu, S. X., Lee, J. C., Lashkari D., Shalon, D. Brown, P.O., Botstein, D. (1999). Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9212-9217.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fuge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Pierceall, W. E., Woodard, A. S., Morrow, J. S., Rimm, D, and Fearon, E. R. (1995). Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 11, 1319-1326.
- Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S.H., Ljung, B.M., Gray, J.W., Albertson, D.G. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 207-211.
- Platzer, P., Upender, M. B., Wilson, K., Willis, J., Lutterbaugh, J., Nosrati, A., Willson, J. K., Mack, D., Ried, T., and Markowitz, S. (2002). Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. *Cancer Res* 62, 1134-1138.
- Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D. and Brown, P. O. (1999). Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *NatGenet* 23, 41-46.
- Pollack, J. R., Sorlie, T., Perou, C. M., Rees, C. A., Jeffrey, S. S., Lonning, P. E., Tibshirani, R., Botstein, D., Borresen-Dale, A. L., and Brown, P. O. (2002). Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12963-12968.
- Poste, G., and Fidler, I. J. (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283, 139-146.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., and Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33, 1-6.
- Ranzani, G. N, Pellegata, N. S., Previdere, C, Saragoni, A., Vio, A., Maltoni, M., and Amadori, D. (1990). Heterogeneous protooncogene amplification correlates with tumor progression and presence of metastases in gastric cancer patients. *Cancer Res* 50, 7811-7814.

- Samant, R. S., Seraj, M. J., Saunders, M. M., Sakamaki, T. S., Shevde, L. A., Harms, J. F., Leonard, T. O., Goldberg, S. F., Budgeon, L., Meehan, W. J., *et al.* (2000). Analysis of mechanisms underlying BRMS1 suppression of metastasis. *Clin Exp Metastasis* 18, 683-693.
- Schaller, G., Fuchs, I., Pritze, W., Ebert, A., Herbst, H., Pantel, K., Weitzel, H., and Lengyel, E. (1996). Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2, 1879-1885.
- Schlimok, G., Funke, I., Bock, B., Schweiberer, B., and Riethmuller, G. (1988). [Monoclonal antibodies-new probes for diagnosis and therapy. Their use as an example of the micrometastasizing of solid tumors]. *Arzneimittelforschung* 38, 435-437.
- Shridhar, V., Lee, J., Pandita, A., Iturria, S., Avula, R., Staub, J., Morrissey, M., Calhoun, E., Sen, A., Kalli, K., *et al.* (2001). Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors. *Cancer Res* 61, 5895-5904.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Snijders, A. M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A. K., Huey, B., Kimura, K., Keeney, G., Roche, P., Cliby, W., Lu, K., Schmandt, R., Mills, G. B., Bast, R. C., Jr., James, C. D., Couch, F. J., Hartmann, L. C., Lillie, J., Smith, D. I. (2001). Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29, 263-264.
- Solakoglu, O., Maierhofer, C., Lahr, G., Breit, E., Scheunemann, P., Heumos, I., Pichlmeier, U., Schlimok, G., Oberneder, R., Kollermann, M. W., Kollermann, I., Speicher, M.R., Pantel, K. (2002). Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2246-2251.
- Solomayer, E. F., Diel, I. J., Salanti, G., Hahn, M., Gollan, C., Schutz, F., and Bastert, G. (2001). Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 7, 4102-4108.
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.
- Takahashi, M., Rhodes, D. R., Furge, K. A., Kanayama, H., Kagawa, S., Haab, B. B., and Teh, B. T. (2001). Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9754-9759.
- Takes, R. P., Baatenburg de Jong, R. J., Schuurung, E., Hermans, J., Vis, A. A., Litvinov, S. V., and van Krieken, J. H. (1997). Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123, 412-419.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-5121.
- Uhr, J. W., Scheuermann, R. H., Street, N. E., and Vitetta, E. S. (1997). Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med* 3, 505-509.
- van de Vijver, M. J., He, Y. D., van't Veer, L. J., Dai, H., Hart, A. A., Voskuil, D. W., Schreiber, G. J., Peterse, J. L., Roberts, C., Marton, M. J., Parrish, M., Atsma, D., Witteveen, A., Glas, A., Delahaye, L., van der Velde, T., Bartelink, H., Rodenhuis, S., Rutgers, E. T., Friend, S. H., Bernards, R. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347, 1999-2009.

van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, B.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., Friend, S.M. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.

Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Rubin, M.A., Chinnaiyan, A.M. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629.

Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S.J., Press, M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719-726.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532.

Wang, J. M., Deng, X, Gong, W., and Su, S. (1998). Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* 220, 1-17.

Watson, C. J., and Miller, W. R. (1995). Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer* 71, 840-844.

Webb, C. P., and Vande Woude, G. F. (2001). Animal models for Ras-induced metastasis. *Methods Enzymol* 333, 318-329.

Weijzen, S., Velders, M. P., and Kast, W. M. (1999). Modulation of the immune response and tumor growth by activated Ras. *Leukemia* 13, 502-513.

Weinstein, J. N., Scherf, U., Lee, J. K., Nishizuka, S., Gwadry, F., Bussey, A. K., Kim, S., Smith, L. H., Tanabe, L., Richman, S., *et al.* (2002). The bioinformatics of microarray gene expression profiling. *Cytometry* 47, 46-49.

Yi, B., Williams, P. J., Niewolna, M., Wang, Y, and Yoneda, T. (2002). Tumor-derived platelet-derived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer. *Cancer Res* 62, 917-923.

Yoneda, T. (2000). Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone. *J Orthop Sci* 5, 75-81.

Yoneda, T., Sasaki, A., and Mundy, G. R. (1994). Osteolytic bone metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 32, 73-84.

Zajchowski, D. A., Bartholdi, M. F., Gong, Y, Webster, L., Liu, H. L., Munishkin, A., Beauheim, C., Harvey, S., Ethier, S. P., and Johnson, P. H. (2001). Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res* 61, 5168-5178.

Zarbo, R. J., and Crissman, J. D. (1988). The surgical pathology of head and neck cancer. *Semin Oncol* 15, 10-19.

Zetter, B. R., and Banyard, J. (2002). Cancer. The silence of the genes. *Nature* 419, 572-573.

6. Anhang

Tabelle 6.1 Lymphozyteninfiltration in den Mammakarzinomen von KM-positiven und KM-negativen Patientinnen der Genexpressionsanalyse

Patienten-Nr*	peri-tumoral	intra-tumoral	herd-förmig	diffus	gesamte Lymphozyteninfiltration
KM-positive Gruppe					
1	+	-	+	-	+
2		-	-	-	-
3	+	-	+	-	+
4	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-
6	+	-	+	-	++
7	-	-	-	-	-
KM-negative Gruppe					
8	-	++	+	-	++
9	+	++	-	+	++
10	+	+	+	+	++
11	+	-	+	-	+
12	+++	++	+	+	+++
13	++	+	+	+	++
14	+++	++	+	+	+++

*Die Patientennummern entsprechen der Nummerierung von Tabelle 2.1 in Kap. 2.1.2.1. Die Lymphozyteninfiltration wurde eingeteilt in fehlend (-), schwach (+), mäßig, (++) und stark (+++).

Tabelle 6.2 Differenziell exprimierte Gene zwischen Tumoren von Knochenmark-positiven (KM+) und Knochenmark-negativen (KM-) Patientinnen

Gen	GenBank Accession#	KM ⁺ ^a	KM ⁻ ^a	Verhältnis KM+/KM-	p-Wert ^b	nicht malignes Brustgewebe ^c
<u>Aufbau der extrazellulären Matrix:</u>						
<i>Laminin beta-1</i>	M61916	3,0 ± 1,3	7,6 ± 3,2	0,4	0,002	4,7
<i>Osteonectin</i>	J03040	21,1 ± 12,2	57,3 ± 20,4	0,4	0,003	10,8
<i>Fibronectin 1</i>	X02761	89,5 ± 64,0	261,3 ± 148,4	0,4	0,010	11,8
<i>Biglycan^f</i>	J04599	9,0 ± 4,1	22,9 ± 12,0	0,4	0,015	1,0
<i>PM-5 protein</i>	X57398	4,9 ± 1,6	8,7 ± 3,3	0,6	0,036	7,1
<i>TIMP-2</i>	J05593	4,2 ± 2,0	9,7 ± 4,9	0,4	0,019	5,9
<i>TIMP-3</i>	Z30183	26,0 ± 15,9	86,6 ± 70,8	0,3	0,031	35,0
<i>MMP-11^d</i>	X57766	42,2 ± 19,8	88,5 ± 39,9	0,5	0,027	13,5
<i>MMP-14^e</i>	D26512	15,5 ± 6,5	40,2 ± 15,7	0,4	0,004	10,9
<i>Collagen-2A1</i>	X16468	8,5 ± 2,7	24,1 ± 16,7	0,4	0,014	4,4
<i>Collagen-6A1^f</i>	X15879	24,1 ± 13,1	75,6 ± 51,6	0,3	0,030	12,7
<i>Collagen 6A3</i>	X52022	13,5 ± 6,7	32,0 ± 15,5	0,4	0,013	5,7
<i>Collagen 16A1</i>	M92642	3,7 ± 2,5	8,4 ± 2,7	0,4	0,007	5,7
<u>Adhäsion:</u>						
<i>Plakoglobin</i>	M23410	5,0 ± 4,0	14,1 ± 3,5	0,4	0,000	10,8
<i>L1CAM homologue</i>	AF002246	0,3 ± 0,5	2,3 ± 3,0	0,1	0,025	0,0
<i>Cadherin 11^e</i>	L34056	3,2 ± 2,2	7,8 ± 3,1	0,4	0,004	0,5
<u>Aufbau des Zytoskelettes:</u>						
<i>Zytokeratin-2A</i>	M99061	3,0 ± 1,3	5,8 ± 2,0	0,5	0,038	9,9
<i>Zytokeratin-8</i>	M34225	11,6 ± 4,9	23,7 ± 9,0	0,5	0,038	9,9
<i>Zytokeratin-9</i>	Z29074	0,5 ± 0,4	1,0 ± 0,9	0,5	0,049	1,3
<i>Zytokeratin-10</i>	M19156	7,7 ± 6,2	18,3 ± 9,6	0,4	0,039	1,3
<i>Zytokeratin-18</i>	M26326	26,3 ± 7,8	42,8 ± 14,7	0,6	0,022	24,2
<i>Zytokeratin-19</i>	Y00503	24,5 ± 16,2	61,2 ± 23,7	0,4	0,008	33,9
<i>Tubulin gamma 1</i>	M61764	1,6 ± 1,3	5,6 ± 1,9	0,3	0,003	4,7
<i>Desmin^g</i>	U59167	1,6 ± 0,8	3,4 ± 1,8	0,5	0,019	2,0
<i>RHOH-6</i>	X06820	26,4 ± 15,2	48,7 ± 12,0	0,5	0,018	29,3

Gen	GenBank Accession#	KM+ ^a	KM- ^a	Verhältnis KM+/KM-	p-Wert ^b	nicht malignes Brustgewebe ^c
<i>RHO GDIalpha</i>	X69550	26,1 ± 9,2	40,6 ± 6,9	0,6	0,028	42,9
<i>RAC-1</i>	M29870	8,1 ± 1,5	17,0 ± 6,4	0,5	0,001	6,6
Signaltransduktion:						
<i>HIF-1alpha</i>	U22431	8,9 ± 7,4	3,3 ± 1,8	2,7	0,043	0,2
<i>VHL tumor suppressor</i>	L15409	1,3 ± 0,9	3,1 ± 1,2	0,4	0,025	2,4
<i>Cullin-2</i>	U83410	0,5 ± 0,3	2,6 ± 2,8	0,2	0,007	2,5
<i>KiSS-1</i>	U43527	0,9 ± 1,0	2,1 ± 2,0	0,4	0,040	0,0
<i>IGF1R</i>	X04434	2,6 ± 1,1	6,0 ± 2,5	0,4	0,023	4,4
<i>IGFBP-3</i>	M31159	3,2 ± 1,7	6,1 ± 2,8	0,5	0,050	4,4
<i>IGFBP-4</i>	M62403	8,7 ± 6,4	48,1 ± 38,0	0,2	0,006	2,6
<i>EGFL-2</i>	D87469	1,2 ± 0,8	2,1 ± 1,2	0,6	0,020	1,5
<i>STAT-1</i>	M97935	12,3 ± 9,0	4,2 ± 2,0	3,0	0,017	3,7
	U59752	7,3 ± 2,8	14,2 ± 2,6	0,5	0,001	10,6
Cytohesin-1 (adaptor)						
<i>PPP2R-4</i>	X73478	2,8 ± 1,3	5,7 ± 2,1	0,5	0,010	3,2
<i>PPP2R5E</i>	L76703	1,2 ± 0,8	2,0 ± 1,5	0,6	0,028	0,0
<i>G-protein alpha-3</i>	M27543	2,4 ± 0,9	5,0 ± 2,0	0,5	0,020	0,0
<i>Trio (adaptor)</i>	U42390	1,4 ± 1,4	3,6 ± 2,0	0,4	0,028	1,5
<i>Ser/Thr-kinase-3</i>	U26424	1,6 ± 1,4	3,7 ± 1,0	0,4	0,006	5,3
<i>MADD</i>	U77352	0,8 ± 0,6	2,8 ± 2,1	0,3	0,020	0,0
<i>Frizzled-5</i>	U43318	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,9	0,1	0,028	0,3
<i>Secreted frizzled-related protein-2</i>	AF017986	18,0 ± 10,3	83,8 ± 62,6	0,2	0,008	15,7
<i>ETS-related TF</i>	U32645	1,0 ± 0,8	2,7 ± 1,7	0,4	0,043	0,0
<i>TFAP2C</i>	U85658	2,7 ± 0,9	5,9 ± 2,5	0,5	0,022	8,8
<i>MAPK-3</i>	X60188	3,9 ± 2,0	6,3 ± 1,5	0,6	0,037	1,0
<i>MAP2K-2</i>	L11285	0,1 ± 0,2	1,3 ± 1,4	0,1	0,042	0,0
<i>MAP3K-12</i>	U07358	0,5 ± 0,4	1,7 ± 2,0	0,3	0,022	1,4
<i>MAPK-7</i>	U25278	1,5 ± 0,4	2,5 ± 0,9	0,6	0,026	2,2
<i>Jun D proto-oncogene</i>	X56681	7,3 ± 3,7	14,2 ± 6,3	0,5	0,033	5,8
<i>AKAP-1</i>	X97335	4,1 ± 2,7	7,3 ± 2,8	0,6	0,048	13,6
<i>REA</i>	U72511	9,2 ± 4,1	15,7 ± 4,6	0,6	0,030	25,4
<i>CGR-19</i>	U66469	0,2 ± 0,2	0,9 ± 1,4	0,2	0,016	1,0

Gen	GenBank Accession#	KM ⁺ ^a	KM ⁻ ^a	Verhältnis KM ⁺ /KM ⁻	p-Wert ^b	nicht malignes Brustgewebe ^c
<i>RRAD</i>	L24564	2,3 ± 1,1	4,2 ± 1,9	0,5	0,030	2,0
<i>Ephrin receptor-5A</i>	X95425	0,9 ± 0,9	1,6 ± 2,1	0,6	0,041	0,0
<i>Erythropoietin receptor</i>	M60459	1,0 ± 1,0	0,2 ± 0,2	6,1	0,042	0,0
<i>AXL RTK^e</i>	M76125	2,6 ± 1,3	5,3 ± 2,4	0,5	0,042	2,1
<i>GAS6 (AXL RTK ligand)</i>	L13720	1,4 ± 0,6	4,2 ± 1,4	0,3	0,006	5,7
<i>CXCR-6</i>	U73531	0,3 ± 0,2	0,6 ± 1,0	0,5	0,000	2,3
<i>Stem cell growth factor^e</i>	D86586	1,6 ± 0,9	3,0 ± 2,0	0,5	0,014	0,6
<i>TGFB-3</i>	J03241	4,7 ± 2,1	9,1 ± 3,5	0,5	0,045	4,1
<u>Apoptose:</u>						
<i>TRAF-interacting protein</i>	U59863	1,9 ± 0,9	0,4 ± 0,3	4,8	0,010	0,0
<i>TRADD</i>	L41690	3,9 ± 1,3	1,7 ± 1,1	2,3	0,018	0,0
<i>IL-1 receptor antagonist</i>	M63099	1,1 ± 0,6	2,7 ± 1,7	0,4	0,043	1,7
<i>BCL2L2</i>	U59747	1,7 ± 0,6	3,8 ± 1,7	0,4	0,007	2,8
<u>Stoffwechsel:</u>						
<i>Adenosine deaminase (ADA)</i>	X02994	1,0 ± 0,9	3,0 ± 1,1	0,3	0,050	0,0
<i>(2'-5')oligoadenylate synthetase-1</i>	M11810	5,2 ± 3,9	1,1 ± 1,3	4,7	0,009	0,0
<i>PIG-12</i>	AF010316	2,6 ± 3,1	8,1 ± 4,5	0,3	0,006	4,0
<i>BTN1A1</i>	U39576	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,9	0,1	0,033	0,0
<i>LDH A</i>	X02152	15,6 ± 8,5	8,2 ± 2,9	1,9	0,039	3,9
<i>NME-3</i>	U29656	4,0 ± 1,7	7,0 ± 1,6	0,6	0,008	1,5
<i>NME-4</i>	Y07604	25,5 ± 10,6	51,4 ± 20,9	0,5	0,019	16,9
<u>Angiogenese:</u>						
<i>VEGF B</i>	U48801	3,9 ± 2,5	8,8 ± 4,6	0,4	0,019	2,4
<u>Immunantwort:</u>						
<i>PSMB9 (proteasome)</i>	Z14977	7,7 ± 4,3	3,1 ± 1,5	2,5	0,035	3,4
<i>HLA G antigen</i>	M32800	216,0 ± 108,5	101,0 ± 36,0	2,1	0,050	71,4
<i>FCGR2B (Fc receptor)^d</i>	M28696	1,1 ± 0,9	2,3 ± 1,6	0,5	0,029	2,3
<i>Fc receptor Ia^d</i>	X14356	1,2 ± 0,6	1,6 ± 1,1	0,7	0,027	0,0
<i>LCK^d</i>	U07236	0,6 ± 0,5	1,7 ± 1,4	0,3	0,035	0,5

Gen	GenBank Accession#	KM+ ^a	KM- ^a	Verhältnis KM+/KM-	p-Wert ^b	nicht malignes Brustgewebe ^c
<i>TGFB inducible early gene</i> ^d	S81439	7,0 ± 3,4	11,9 ± 3,8	0,6	0,043	6,7
<i>MIC2Y</i> ^d	M16279	5,1 ± 1,8	9,4 ± 4,2	0,5	0,049	1,6
Replikation/Reparatur/Transkription:						
<i>HnRNP-1</i>	X65372	7,5 ± 2,0	13,2 ± 4,8	0,6	0,018	11,9
<i>RAD-51</i>	D13804	1,0 ± 0,6	1,7 ± 1,7	0,6	0,020	0,0
<i>FRAP</i>	L34075	0,6 ± 0,5	1,1 ± 1,1	0,6	0,021	2,8
<i>CHAF1A</i>	U20979	1,6 ± 0,7	2,8 ± 1,0	0,6	0,031	1,0

^amittlere RNA-Expressionswerte ± Standardabweichung der normalisierten Daten; ^bStudent's *t*-Test wurde an log2-transformierten normalisierten Daten durchgeführt; ^cRNA-Expression von histopathologisch normalem Brustgewebe nach Normalisierung ^dvon Lymphozyten exprimierte Gene; ^evon Fibroblasten exprimierte Gene; ^fvon Endothelzellen exprimierte Gene; ^gvon Muskelzellen exprimierte Gene. Die Expressionsdaten wurden wie in Kap. 2.2.6.4. beschrieben analysiert.

Tabelle 6.3 Differenziell exprimierte Gene zwischen Tumoren von Lymphknoten-positiven (LK+) und Lymphknoten-negativen (LK-) Patientinnen

Gen	Genbank Accession#	LK+ ^a	LK- ^a	Verhältnis LK+/LK-	p-Werte ^b	Nicht malignes Brustgewebe ^c
<u>Aufbau der extrazellulären Matrix:</u>						
<i>Collagen 16A1</i>	M92642	5,6 ± 2,0	9,6 ± 3,3	0,6	0,020	1,8
<i>BMP1</i>	M22488	1,9 ± 0,8	3,6 ± 1,3	0,5	0,023	1,6
<i>TIMP4^g</i>	U76456	0,1 ± 0,15	1,3 ± 1,4	0,1	0,004	9,0
<i>KIAA0022</i>	D14664	0,5 ± 0,4	1,2 ± 0,7	0,4	0,020	2,9
<u>Adhäsion:</u>						
<i>Plakoglobin</i>	M23410	11,1 ± 1,8	16,1 ± 4,4	0,7	0,025	0,0
Cadherin 11 ^e	L34056	4,7 ± 2,6	8,9 ± 3,9	0,5	0,036	0,0
<i>Integrin alpha5</i>	X06256	2,5 ± 0,8	3,9 ± 2,4	0,6	0,033	1,6
<i>Integrin beta3</i>	J02703	1,9 ± 0,3	1,2 ± 0,7	1,7	0,027	0,0
<u>Aufbau des Zytoskelettes:</u>						
<i>RAC1</i>	M29870	10,8 ± 5,0	19,4 ± 8,0	0,6	0,028	0,0
<u>Signaltransduktion:</u>						
<i>Erythropoietin receptor</i>	M60459	2,1 ± 0,8	0,2 ± 0,2	10,4	0,009	4,8
<i>CGR-19</i>	U66469	0,2 ± 0,2	1,0 ± 1,7	0,2	0,006	19,7

Gen	Genbank Accession#	LK+ ^a	LK- ^a	Verhältnis LK+/LK-	p-Werte ^b	Nicht malignes Brustgewebe ^c
<i>IGFBP-4</i>	M62403	15,1 ± 8,8	55,0 ± 46,9	0,3	0,023	44,3
<i>EGF-like growth factor</i>	M60278	0,5 ± 0,5	2,8 ± 1,9	0,2	0,001	0,0
<i>MxB</i>	M30818	1,4 ± 0,7	3,5 ± 2,1	0,4	0,022	2,8
<i>EGFR-PS15</i>	U07707	3,7 ± 0,5	7,2 ± 5,3	0,5	0,020	3,2
<i>CBL2 proto-oncogene</i>	X57110	1,0 ± 0,6	3,3 ± 3,9	0,3	0,012	9,2
<i>FGFR1</i>	M37722	17,0 ± 7,5	6,9 ± 4,2	2,5	0,020	5,5
<i>TNF-R2</i>	M32315	4,3 ± 1,0	2,6 ± 0,9	1,7	0,028	4,3
<i>ICSBP1</i>	M91196	0,6 ± 0,6	2,1 ± 0,8	0,3	0,016	2,6
<i>Integrin beta3-endonexin</i>	U37139	1,1 ± 0,5	2,3 ± 2,7	0,5	0,022	0,0
<i>PPP2R1B</i>	M65254	0,9 ± 0,7	1,9 ± 0,7	0,5	0,022	2,9
<i>Wnt-5A</i>	L20861	1,7 ± 0,7	3,7 ± 2,0	0,5	0,026	18,0
<i>RhoHP1</i>	D85815	0,7 ± 0,6	1,1 ± 1,6	0,7	0,041	4,7
<i>MAP2K1</i>	L05624	6,0 ± 2,1	2,9 ± 1,7	2,1	0,046	0,0
<i>Ephrin-B3</i>	U66406	0,2 ± 0,3	1,1 ± 1,2	0,2	0,046	1,2
<i>PDGF-RA</i>	M21574	1,5 ± 1,0	3,3 ± 4,0	0,5	0,048	33,8
<u>Apoptose:</u>						
<i>TRAF-interacting protein</i>	U59863	2,9 ± 1,4	0,5 ± 0,4	6,1	0,005	6,7
<i>Caspase 4</i>	U28014	3,1 ± 1,3	8,8 ± 5,4	0,4	0,011	1,8
<u>Stoffwechsel:</u>						
<i>NME4</i>	Y07604	29,4 ± 12,8	58,7 ± 25,8	0,5	0,030	9,6
<i>Ubiquitin-like 1</i>	U83117	12,1 ± 3,4	6,7 ± 3,9	1,8	0,041	5,9
<i>Tyrosinase</i>	M27160	0,5 ± 0,3	1,7 ± 1,6	0,3	0,044	0,3
<i>PIG3</i>	AF010309	0,5 ± 0,5	1,6 ± 2,1	0,3	0,048	6,3

Gen	Genbank Accession#	LK ⁺ ^a	LK ⁻ ^a	Verhältnis LK+/LK-	p-Werte ^b	Nicht malignes Brustgewebe ^c
<u>Angiogenese:</u>						
keine						
<u>Immunantwort:</u>						
<i>NKG7^d</i>	S69115	1,0 ± 0,5	2,5 ± 1,9	0,4	0,013	1,5
<i>IgL-5^d</i>	M27749	30,4 ± 25,8	5,5 ± 7,9	5,5	0,035	0,0
<i>Semaphorin 4D</i>	U60800	0,6 ± 0,5	1,5 ± 1,6	0,4	0,037	2,4
<i>HLA-DPB1</i>	M83664	10,6 ± 2,5	14,6 ± 3,3	0,7	0,047	31,8
<u>Replikation/Reparatur/Transkription:</u>						
<i>HnRNP1</i>	X65372	7,5 ± 0,9	15,1 ± 6,0	0,5	0,007	1,3
<i>XRCC1</i>	M36089	11,4 ± 4,5	5,4 ± 3,5	2,1	0,027	26,2
<i>MGMT</i>	M29971	4,4 ± 1,5	6,9 ± 1,9	0,6	0,031	1,9
<i>HMG17</i>	M12623	5,2 ± 0,7	9,3 ± 4,3	0,6	0,035	7,4
<i>HnRNP-K</i>	S74678	27,5 ± 8,5	50,5 ± 23,4	0,5	0,024	7,1
<u>Nicht klassifizierte Gene:</u>						
<i>PIR121</i>	L47738	0,9 ± 0,6	1,1 ± 1,5	0,8	0,013	10,4
<i>KIAA0231</i>	D86984	0,5 ± 0,6	1,7 ± 1,9	0,3	0,029	2,9
<i>BCL-7B</i>	X89985	3,1 ± 1,9	6,4 ± 3,1	0,5	0,047	3,1

^amittlere RNA-Expressionswerte ± Standardabweichung der normalisierten Daten; ^bStudent's *t*-Test wurde an log2-transformierten normalisierten Daten durchgeführt; ^cRNA-Expression von histopathologisch normalem Brustgewebe nach Normalisierung ^dvon Lymphozyten exprimierte Gene;

^evon Fibroblasten exprimierte Gene, ^gvon Muskelzellen exprimierte Gene. Die Expressionsdaten wurden, wie in Kap. 2.2.6.4 beschrieben, analysiert, Die unterstrichenen Gene waren auch zwischen der KM-positiven und der KM-negativen Gruppe differenziell exprimiert.

Tabelle 6.4 Zytokeratinexpression in primären Mammakarzinomen in Korrelation zu klinisch-pathologischen Daten

Klinisch- pathologische Charakterisierung der Tumore	CK-8-Proteinexpression			CK-18-Proteinexpression			CK-19-Proteinexpression		
	normale (n=881)	herunter- reguliert (n=577)	p-Wert*	normale (n=1087)	herunter- reguliert (n=371)	p-Wert*	normale (n=961)	herunter- reguliert (n=497)	p-Wert*
Alter									
≤ 50 (n=250)	141 (56,4%)	109 (43,6%)	0,553	185 (74%)	65 (26%)	0,855	159 (63,6%)	91 (36,4%)	
> 50 (n=937)	548 (58,5%)	389 (41,5%)		688 (73,4%)	249 (26,6%)		597 (63,7%)	340 (36,3%)	
Histologischer Typ									
Ductales Karzinom (n=1042)	624 (59,9%)	418 (40,1%)	0,0001	777 (74,6%)	265 (25,4%)	0,002	687 (65,9%)	355 (34,1%)	0,0001
Lobuläres Karzinom (n=188)	139 (73,9%)	49 (26,1%)		156 (83%)	32 (17,0%)		146 (77,7%)	42 (22,3%)	
Andere Typen (n=228)	118 (51,8%)	110 (48,2%)		154 (67,5%)	74 (32,5%)		128 (56,1%)	100 (43,9%)	
Tumorgroße									
pT1 (n=497)	341 (68,6%)	156 (31,4%)	0,0001	394 (79,3%)	103 (20,7%)	0,008	344 (69,2%)	153 (30,8%)	0,075
pT2 (n=676)	375 (55,5%)	301 (44,5%)		483 (71,4%)	193 (28,6%)		422 (62,4%)	254 (37,6%)	
pT3 (n=94)	48 (51,1%)	46 (48,9%)		64 (68,1)	30 (31,9%)		65 (69,1%)	29 (30,9%)	
pT4 (n=185)	113 (61,1%)	72 (38,9%)		142 (76,8%)	43 (23,2%)		126 (68,1%)	59 (31,9%)	
Differenzierungsgrad									
G1 (n=330)	238 (72,1%)	92 (27,9%)	0,0001	284 (86,1%)	46 (13,9%)	0,0001	249 (75,5)	81 (24,5%)	0,0001
G2 (n=566)	382 (67,5%)	184 (32,5%)		452 (79,9%)	114 (20,1%)		397 (70,1%)	169 (29,9%)	
G3 (n=474)	213 (44,9%)	261 (55,1%)		286 (60,3%)	188 (39,7%)		267 (56,3%)	207 (43,7%)	
LK-Status									
pN0 (n=585)	343 (58,6%)	242 (41,4%)	0,670	429 (73,3%)	156 (26,7%)	0,640	369 (63,1%)	216 (36,9%)	0,199
pN1/2 (n=620)	371 (59,8)	249 (40,2%)		462 (74,5%)	158 (25,5%)		413 (66,6%)	207 (33,4%)	

*Die Analyse wurde mit dem Chi-square Test im SPSS Programm errechnet.

Tabelle 6.5. Zusammenfassung der DNA -Gewinne bzw. DNA-Verluste in 12 unter-suchten Mammakarzinomproben des Kollektivs der Genexpressionsanalyse

Patienten Nr.	DNA-Gewinne					DNA-Verluste			
	1q	8q	11q	17q	20q	1p	8p	13q	17p
KM-negative Gruppe									
2	+							+	
3	+								
4			+	+				+	
5	+						+	+	
6	+		+			+	+		+
7		+		+	+		+		
KM-positive Gruppe									
8	+	+	+	+		+	+	+	+
9	+	+	+	+	+		+		
10	+				+	+		+	
11			+				+		
12		+		+			+		
14						+		+	
Summe der Abberationen	7/12 (58%)	4/12 (33%)	5/12 (42%)	5/12 (42%)	3/12 (25%)	4/12 (33%)	7/12 (58%)	6/12 (50%)	2/12 (17%)

Die klinisch-pathologischen Daten der betreffenden Patientinnen sind in Tabelle 2.1 (2.1.2.1.) zusammengefasst. DNA-Gewinne/Verluste in dem betreffenden Chromosomenarm wurden mit einem „Plus“ dargestellt, wenn in dem betreffende Chromosomenarm mehr als ein Genabschnitt ein Fluoreszenzverhältnis > 0,5 für DNA-Gewinne oder < -0,5 für DNA Verluste zeigte.

Tabelle 6.6 Genomisches Abberationsmuster der differenziell exprimierten Gene zwischen der KM-positiven und KM-negativen Gruppe

Gene	Gen-Lokus	Tumore von KM-negativen Patientinnen*						Tumore von KM-positiven Patientinnen*					
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
<u>Aufbau der extrazellulären Matrix</u>													
<i>Laminin beta-1</i>	7q31.1-q31.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nb	-	-
<i>Osteonectin</i>	5q31.3-q32	nb	-	nb	-	-	-	nb	-	-	-	-	-
<i>Fibronectin 1</i>	2q34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PM5 protein</i>	16p13.1-16p12	-	-	-	-	-	-	nb	-	-	-	-	-
<i>TIMP-2</i>	17q25	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>TIMP-3</i>	22q12.3	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	↓
<i>Collagen-2A1</i>	12q13.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Collagen-6A3</i>	2q37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Collagen-16A1**</i>	1p35-p34	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<u>Adhäsion</u>													
<i>Plakoglobin</i>	17q21	-	-	-	-	-	-	-	nb	-	-	-	-
<i>L1CAM homolog</i>	3p26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Aufbau des Zytoskelettes</u>													
<i>Zytokeratin-2A**</i>	2q11-q13	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<i>Cytokeratin-8</i>	12q13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zytokeratin-10**</i>	17q21-23	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<i>Cytokeratin-18</i>	12q13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cytokeratin-19</i>	17q21,2	↑	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
<i>Tubulin gamma-1</i>	17q21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>RHOH-6</i>	2pter-p12	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>RHOGD1alpha</i>	17q25.3	↑	-	↑	-	-	↑	-	-	↑	-	-	-
<i>RAC-1</i>	7p22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gene	Gen-Lokus	Tumore von KM-negativen Patientinnen*						Tumore von KM-positiven Patientinnen*					
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
Signaltransduktion:													
<i>HIF-1alpha</i>	14q21-q24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>VHL tumor suppressor</i>	3p26-p25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cullin-2</i>	10p11.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>KiSS-1</i>	1q32	-	↑	-	↑	↑	-	-	nb	↑	-	-	-
<i>STAT-1**</i>	2q32.2-q32.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G-protein alpha-3</i>	1p13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ser/Thr-kinase-3</i>	8p22-q22.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>MADD</i>	11p11.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>MAPK-3</i>	16p12-p11.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>MAP2K-2</i>	19p13.2	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
<i>MAP3K-12</i>	12q13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>MAPK-7</i>	17p11.2	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<i>Jun D</i>	19p13.2	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
<i>TGFB-3</i>	14q24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffwechsel													
(2'-5')oligoadenylate synthetase-1	12q24.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>LDH A</i>	11p15.4	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<i>NME-3</i>	16p13.3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<i>NME-4</i>	16p13.3	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb

Darstellung der Gene, die aus der Genexpressionsanalyse als differenziell exprimiert hervorgegangen waren und in dieser Arbeit näher untersucht wurden. Es wurden 6 Tumore von KM-positiven bzw. KM-negativen Patientinnen des Kollektivs der Genexpressionsanalyse untersucht (von 2 Proben der Genexpressionsanalyse war für die genomische Untersuchung keine ausreichende Gewebemenge mehr verfügbar). Die mit der Array-CGH ermittelten genomischen Veränderungen in den jeweiligen Genloci wurden als amplifiziert (↑), deletiert (↓) oder unverändert (↔) eingestuft, wenn das Fluoreszenzverhältnis der zur Basis 2 logarithmierten Daten > 0,5 oder <0,5 war bzw. dazwischen lag.

* Die klinisch-pathologischen Daten der betreffenden Patientinnen sind in Tabelle 2.1 (Kap. 2.1.2.1.) zusammengefasst. Die Zahlen entsprechen den Patienten-Nummern.

**Diese Genloci konnten auf dem Array nicht einem Gen zugeordnet werden, da die Auflösungsgrenze des Arrays bei 40 kb liegt.

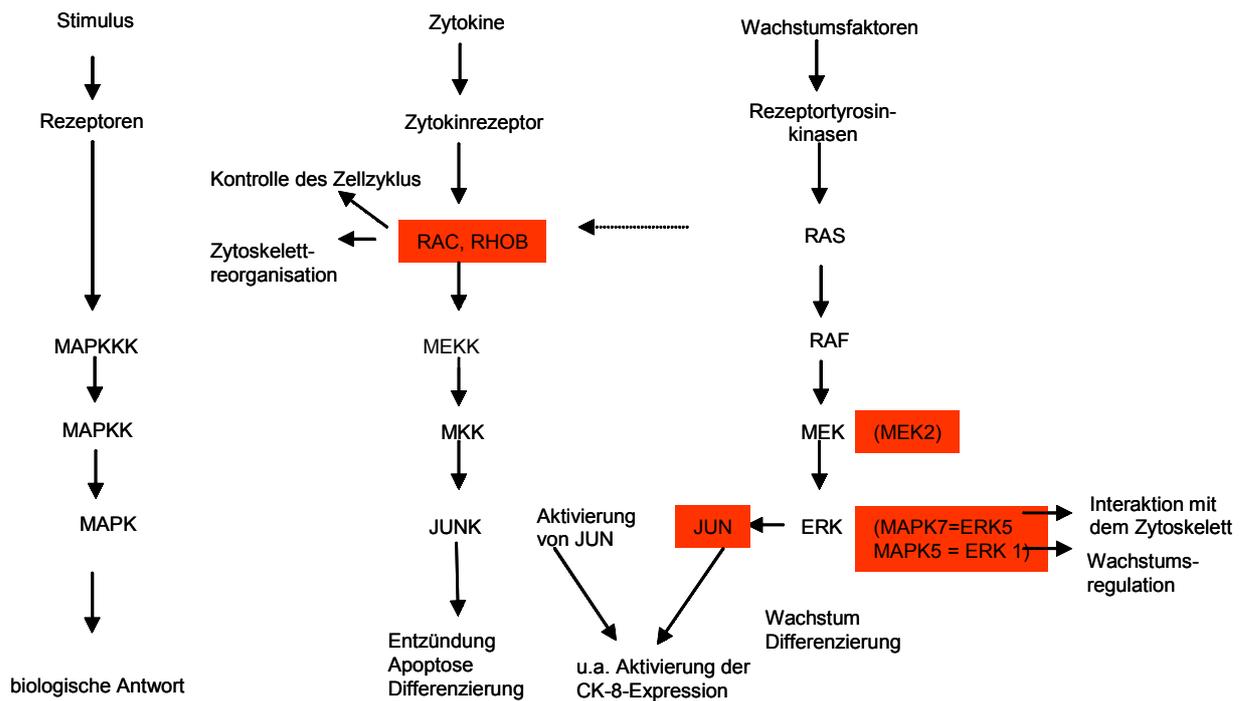


Abb. 6.1 MAP-Kinase-Kaskade, die nach Rezeptoraktivierung von kleinen GTP-bindenden Proteinen ausgeht (RAS oder RHO und RAC).

RAS kann über die PI3 (Phosphoinositol-3)-Kinase auch RAC aktivieren. Daraufhin folgt die Serin/Threonin Phosphorylierung der MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), die Tyrosin/Threonin-Reste der MAPK-Kinase (MAPKK) phosphoryliert, woraus die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinasen (MAPK) folgt. Die aktivierten MAP-Kinasen aktivieren dann andere Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren und initiieren die Transkription

Die in rot unterlegten Gene sind in der KM-positiven im Vergleich zur KM-negativen Gruppe herunterreguliert. Die RHOB-Expression wurde auch auf Proteinebene untersucht, korrelierte jedoch nicht mit der Genexpression. Eine herunterregulierte CK-18 Expression konnte auf Proteinebene verifiziert und validiert werden.

ERK: Extracellular signal Regulated Kinases

TGFβ: Transforming Growth Faktor beta

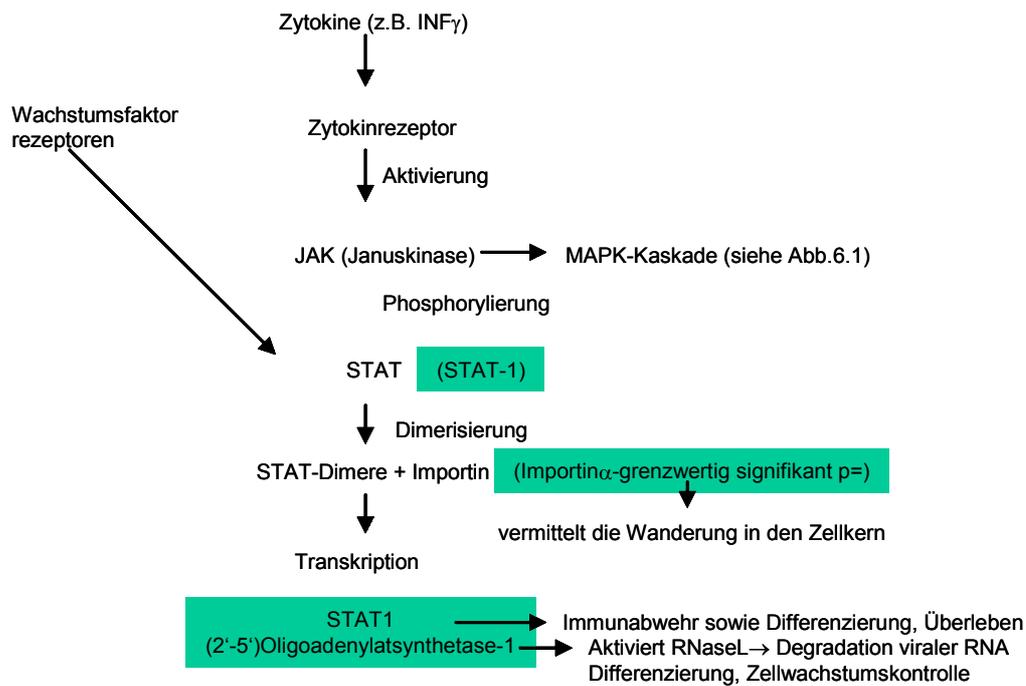


Abb. 6.2. JAK-STAT-Signalweg. Mit Zytokinrezeptoren assoziierte JAK-Kinasen phosphorylieren nach Rezeptoraktivierung STAT-Moleküle, die nach Tyrosinphosphorylierung Dimere bilden, die nach Importin-vermitteltem Kerntransport als Transkriptionsfaktoren u.a. ihre eigene Transkription induzieren können. Die in grün unterlegten Gene zeigten in der KM-positiven Gruppe im Vergleich zur KM-negativen Gruppe eine erhöhte Genexpression. Für STAT-1 konnten die Ergebnisse der Genexpression auf Proteinebene verifiziert und validiert werden.

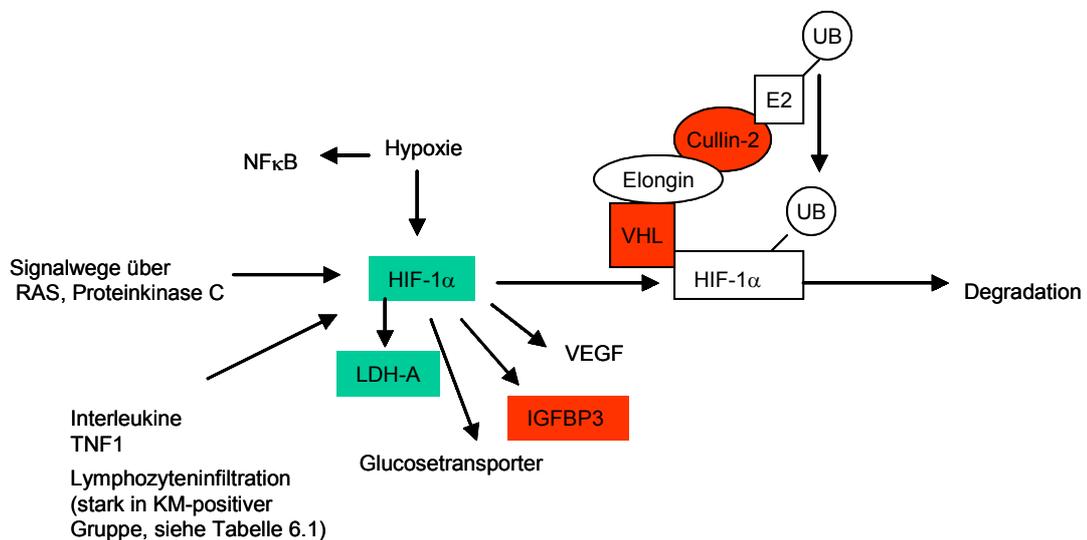


Abb. 6.3 HIF-1 α -Reaktionsweg. Die Genexpression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α kann durch Hypoxie, Onkogene und durch Interleukine induziert werden. HIF-1 α kann mit Cullin-2, Elongin, dem VHL (von Hippel Lindau)-Tumorsuppressor und einem Ubiquitin (UB)-konjugierten Enzym (E2) einen Komplex bilden, der die Ubiquitinylierung und anschließende Degradation des HIF-1 α -Genes vermittelt. Die grün unterlegten Gene zeigen in der KM-positiven im Vergleich zu der KM-negativen Gruppe eine erhöhte und die rot unterlegten Gene eine herunterregulierte Genexpression. Die erhöhte HIF-1 α -Genexpression konnte auf Proteinebene verifiziert und validiert werden.
 LDH-A: Laktat-Dehydrogenase-A
 IGFBP-3: Insulin like growth factor

7. Abkürzungen und Glossar

7.1 Abkürzungen

Abkürzungen von Chemikalien sind in Kap. 2.1.3.1. vermerkt

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
APPAP	alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CGH	komparative genomische Hybridisierung
CK	Zytokeratin (cytokeratin)
cmp	Zählereignisse/Minute (counts per minute)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	duktales Karzinom <i>in situ</i>
DCK	Deoxycytidine-Kinase
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
E	Extinktion
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal Growth Faktor Rezeptor)
EMA	Epitheliales Membranantigen
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül (epithelial Cell Adhesion Molecule)
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
HIF-1 α	durch Hypoxie induzierbarer Faktor 1 alpha
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (Insuline-like Growth Factor)
Ig	Immunglobulin
JAK	Januskinase (Just Another Kinase)
Kap.	Kapitel

kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
LCIS	lobuläres Karzinom <i>in situ</i>
LK	Lymphknoten
mA	Milliampere
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MRD	Minimale residuelle Erkrankung (Minimal residual Disease)
OD	optisch Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PTHrP	Parathyroid Hormone related Protein
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale RNA
T	Thymin
TIMP	Gewebeinhibitor von Matrix-Metalloproteinasen (tissue inhibitor of Metalloproteases)
tRNA	Transfer-RNA
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SPSS	Statistical Package of the Social Sciences
STAT	Signalüberträger und Transkriptionsaktivator (Signal Transducer and Activator of Transcription)
STS	Sequence Tagged Site
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth Faktor)
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
U	Unit; Aktivitätseinheit
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

7.2. Glossar

Abberationen: Abweichungen von der normalen Chromosomenzahl (44 Autosomen und 2 Gonosomen) oder strukturelle Abweichungen einzelner Chromosomen (z.B. Amplifikationen oder Deletionen).

Adjuvante Therapie: Therapien (z.B. Chemotherapie) die operationsbegleitend verabreicht werden.

Amplifikation: Vervielfachung eines Gens oder Chromosomenabschnittes.

Angiogenese: Entstehung neuer Blutgefäße aus vorhandenen Blutgefäßen.

Apoptose: Programmierter Zelltod, der durch typische morphologische Veränderungen (z.B. Fragmentierung des Chromatins) gekennzeichnet ist.

BACs: artifizielle Bakterienchromosomen - aus Centromeren, Telomeren und ARSs (autonom replizierenden Sequenzen) zusammengesetzte Vektoren zum Klonieren großer DNA Fragmente (bis zu 1Mb).

CGH (Komparative genomische Hybridisierung): Methode um DNA-Gewinne oder Verluste entlang des gesamten Genoms zu detektieren.

Deletion: Verlust einzelner Basen, DNA-Fragmente oder Chromosomenabschnitte.

Dedifferenzierung: Verlust spezifischer morphologischer oder funktioneller Eigenschaften in Zellen und Geweben.

Differenzierung: Herausbildung spezifischer morphologischer oder funktioneller Eigenschaften in Zellen und Geweben.

Disseminierung: Ablösung einzelner metastatischer Zellen und Wanderung zu Sekundärorganen.

Epigenetisch: Regulation der Genaktivität durch andere Mechanismen als eine veränderte Genstruktur.

Epithelien: Aus dem Ektoderm (dem äußeren der Keimblätter) entstandene Gewebe, die aus polarisierten Zellen mit definierten apikalen und basolateralen Domänen bestehen.

Extravasion: Austritt von metastatischen Tumorzellen aus der Blutbahn.

Extrazelluläre Matrix: Gelartige Grundmasse zwischen Zellen aus u.a. Kollagenen, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen.

FISH (Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung): Methode zum Nachweis spezifischer DNA Sequenzen in Chromosomen von Zellen und Geweben.

Genotyp: Gesamtheit aller genetisch festgelegten Merkmale.

Gesamtüberleben: Zeitraum von der ersten Diagnosestellung bis zum Tod.

Hämatogene Metastasierung: Metastasierung von Tumorzellen über das Blutsystem in Sekundärorgane.

Hypoxie: Sauerstoffarmut

Immunhistochemie: Histologische Darstellung bestimmter Strukturen in Geweben durch die Färbung mit spezifischen Antikörpern.

Karzinome: Maligne Tumore, die aus epithelialen Zellen entstanden sind.

Intravasion: Eindringen der Tumorzellen in die Blutbahn.

Knochenmarkzellen: Stammzellen und Vorstufen der Erythro-, Granulo- und Thrombozyten sowie Monozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Gefäßendothelien.

Lymphogene Metastasierung: Metastasierung von Tumorzellen über das Lymphsystem in die Lymphknoten.

Malignität: Kennzeichen der Malignität sind eine invasive lokale Ausbreitung und die Metastasierung der Tumorzellen in sekundäre Organe.

Metastasierung: Absiedelung von Tumorzellen über Blut- oder Lymphwege in bisher tumorfreie Organe.

Mesenchymale Organe: Knochen, Fett, Bindegewebe, Blutgefäße, die aus dem embryonalen Mesoderm entstanden sind.

Mikrometastasen: Einzelne Tumorzellen oder Tumorzellaggregate (kleiner als 2 mm), die sich vom Primärtumor abgesiedelt haben, in das Gewebeparenchym eines Sekundärorgans eingewandert sind, dort jedoch vorerst noch nicht proliferieren.

Metastasen: aus Mikrometastasen ausgewachsene Makrometastasen (Metastasen), die ihre eigenen Blutgefäße produziert haben (Angiogenese) und eine eigene ECM sezernieren.

MRD (Minimal Residual Disease): Vor der operativen Entfernung von Primärtumoren bereits disseminierte Tumorzellen, die mit klinisch-radiologischen Methoden nicht detektiert werden können. Diese okkulten Tumorzellen können noch nach vielen Monaten oder Jahren zu einer Metastase heranwachsen.

Nomenklatur: Für die Nomenklatur der Gene und Proteine wurden die Empfehlungen des „Genetic Nomenclature Guide“ benutzt. Abkürzungen für menschliche Gene wurden in Großbuchstaben *KURSIV* geschrieben (z.B. *MYC*). Die Produkte der Tumorgene wurden als „Tumorproteine“ bezeichnet. Die Abkürzungen wurden in Großbuchstaben und normaler Schrift (z.B. MYC) geschrieben.

Okkulte Tumorzellen: mit klinisch-radiologischen Untersuchungsmethoden nicht zu detektierende Tumorzellen.

Phänotyp: Erscheinungsbild eines Individuums, das aus dem Genotyp und den Umwelteinflüssen resultiert.

Polyploidie. Vervielfältigung eines haploiden Chromosomensatzes um mehr als das Doppelte.

Prädiktion: Ansprechen auf eine Therapie.

Prognose: Krankheitsverlauf.

Prognostische Marker: Faktoren, die helfen, die Prognose vorherzusagen.

Progression: Veränderungen, die zu einer gesteigerten Aggressivität (Dedifferenzierung) eines Tumors führen.

Stroma: Bindegewebiges Stützgewebe eines Organs oder eines Tumors.

Zytokeratine: Strukturelle Bestandteile des Zytoskelettes von Epithelzellen, die in Typ-I-Keratine (CK1-8; saure Keratine) und Typ-II-Keratine (CK 9-20; basische und neutrale Keratine) eingeteilt werden. Im Zytoskelett bilden sich Heterodimere zwischen Typ I und TypII Zytokeratinen.

Zytoskelett: Strukturelle Bestandteile der Zelle im Zytoplasma, u.a. zusammengesetzt aus Intermediär-, Mikrotubuli- und Aktinfilamenten.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde von Ende 1999 bis zum Frühjahr 2003 am Institut für Tumorbilogie an der Universität Hamburg erstellt, und ich möchte mich deshalb auf diesem Wege zuerst bei Prof. Dr. Klaus Pantel für die Überlassung des Promotionsthemas, die Möglichkeit in seinem Labor diese Arbeit durchzuführen, sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und seine vielen wertvollen Anregungen bedanken.

PD Dr. James Olcese vom IHF danke ich für seine Bereitschaft diese Dissertation zu begutachten.

PD Dr. Ruud Brakenhoff und Dr. Jacqueline Cloos vom Medical Center der freien Universität Amsterdam danke ich für die gute Kooperation und kompetente Unterstützung bei der Auswertung der Arrayhybridisierungen. Und natürlich auch für die schönen Abende in Amsterdam.

PD Dr. Lutz Riethdorf und Dr. Julia Ramirez-Porras von der Abteilung für Gynäkopathologie danke ich für die pathologische Begutachtung und Auswertungen der Kryoschnitte und Paraffinschnitte.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Wieland von der Pharmakologie für die freundliche Erlaubnis der Mitbenutzung des Phosphoimagers, bei Prof. Dr. Yorma Isola für die Möglichkeit in seinem Labor in Helsinki den Mikrometastasenarray herzustellen, bei Guido Sauter vom Institut für Pathologie in Basel für die Überlassung und Auswertung der Prognosearrays und bei Dr. Richard Segraves und Dr. Donna Albertson vom USCF (Comprehensive Cancer Center) in San Francisco für die Durchführung der Array-CGH.

Katrin Baack, Cornelia Coith, Antje Andreas und Sonja Santjes danke ich ganz herzlich für die Hilfe und Unterstützung bei allen im Labor anfallenden Problemen und Fragestellungen. Antje ohne Deine mindestens 10 kg Schokolade, Kekse etc. hätte ich so manchen Abend während der Endphase dieser Arbeit nicht überlebt.

Natürlich möchte ich mich an dieser Stelle auch bei allen anderen Kollegen der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, das tolle Arbeitsklima und die vielen (nicht nur wissenschaftlichen) Gespräche bedanken, sowie für die aufmunternden Worte immer dann, wenn ich mal wieder Probleme mit dem PC hatte (oder er mit mir).

Ich bedanke mich auch bei Allen, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben und mir viele Anregungen gaben, besonders erwähnt seien hier Natalie Reimers und Dr. Volker Assmann - ich weiß man kann seine Abende und Wochenenden auch unterhaltsamer verbringen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Freunden: ohne Eure Zuneigung, Geduld und Unterstützung hätte ich das alles nicht geschafft!