

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Heinrich-Pette-Institut
für experimentelle Virologie und Immunologie
Direktor: Dr. Heinrich Hohenberg

**Genese des Mammakarzinoms in einem
induzierbaren WAP-T-transgenen Mausmodell**



Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt

von

Heidrun Brigitte Margret Gevensleben
aus Euskirchen

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg am: 22. Juli 2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. W. Deppert

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. U.Schumacher

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. J. Schwarz

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Fragestellung	1
2 Einleitung	2
2.1 Das Mammakarzinom	2
2.1.1 Epidemiologie	2
2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	2
2.1.3 Klassifikation des Mammakarzinoms	4
2.1.3.1 <i>In situ</i> Karzinome	4
2.1.3.2 Invasive Mammakarzinome	6
2.1.4 Prognostische Faktoren	7
2.2 Entwicklung des invasiven Mammakarzinoms	12
2.3 Mausmodelle zur Progression des invasiven Mammakarzinoms	15
2.3.1 Aufbau und Entwicklung der murinen Brustdrüse	15
2.3.2 Das WAP-T transgene Mausmodell	18
3 Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Mammalia	22
3.1.2 Chemikalien	22
3.1.3 Antikörper	24
3.1.4 Kits	24
3.1.5 Puffer und Lösungen	25
3.1.6 Primer	27
3.1.7 Material und Geräte	27

3.2	Methoden	28
3.2.1	Tierexperimentelle Methoden	28
3.2.1.1	Tierpräparation und Gewebeentnahme	28
3.2.2	Histologische Methoden	29
3.2.2.1	Gewebefixation und Paraffineinbettung	29
3.2.2.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung)	29
3.2.2.3	<i>Whole mount</i> Färbung	29
3.2.3	Immunohistochemische Methoden	30
3.2.3.1	PAP bzw. APAAP-Methode	30
3.2.3.2	(Strept-) Avidin-Biotin-Methode	31
3.2.3.3	Immunhistochemische Doppelmarkierung	32
3.2.3.4	ApopTag™ Peroxidase <i>In Situ</i> Oligo Ligation (ISOL) Assay	32
3.2.3.5	Lichtmikroskopische Auswertung	33
3.2.3.6	Statistische Auswertung	33
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.4.1	RNA Isolierung aus Gewebe	34
3.2.4.2	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	34
3.2.4.3	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	35
3.2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Grundcharakterisierung transgener Mauslinien	37
4.1.1	Etablierung transgener Mauslinien	37
4.1.2	Analyse der Transgenintegration	38
4.1.3	Nachweis der Transgentranskription	40
4.2	Linien spezifische Entwicklung invasiver Adenokarzinome der Brustdrüse	41
4.3	Analyse der Transgentranskription und -expression in WAP-T-transgenen Mauslinien	44
4.3.1	Gewebespezifität der Transgentranskription und -expression . . .	44
4.3.2	Induktionsabhängigkeit der Transgentranskription und -expression	46
4.3.3	Transgenexpression während der Laktation	48
4.3.4	Transgenexpression nach abgeschlossener Involution	48
4.3.4.1	WAP-T1 und WAP-T-NP8	49

4.3.4.2	WAP-T-NP6	51
4.4	Analyse der Brustdrüsenmorphologie WAP-T-transgener Mauslinien . . .	53
4.4.1	Nullipares Stadium	54
4.4.2	Laktation	55
4.4.3	Nach abgeschlossener Involution	57
4.4.4	Histopathologische Klassifikation muriner Neoplasien der Brustdrüse	61
4.5	Transgenabhängigkeit muriner Neoplasien der Brustdrüse	64
4.6	Immunhistochemische Charakterisierung transgeninduzierter Neoplasien	68
4.6.1	Hormonrezeptoren	68
4.6.2	c-ErbB2 (Her2/neu)	72
4.6.3	<i>In vivo</i> Zellkinetik	73
4.6.4	Terminale Differenzierungsmarker	78
5	Diskussion	86
5.1	SV40 abhängige Transformation muriner Brustdrüsenepithelien in einem WAP-T-transgenen Mausmodell	86
5.2	Schwangerschafts-assoziierte Progenitorzellen der Brustdrüse als Zielzellen der SV40 induzierten Karzinogenese	89
5.3	WAP-T-transgene Mäuse als Progressionsmodell für den basalen Subtyp des Mammakarzinoms	98
6	Zusammenfassung	103
	Literaturverzeichnis	105
	Danksagung	121
	Lebenslauf	122
	Tabellenverzeichnis	124
	Abbildungsverzeichnis	125
	Eidesstattliche Versicherung	127

Abkürzungsverzeichnis

17kT	17k Tumor-Antigen
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AS	Aminosäure
bp, kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	komplemetäre DNA
CIS	Carcinoma <i>In Situ</i>
d	Tag
CK	Cytokeratin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DCIS	Duktales Karzinom <i>In Situ</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
IAC	Invasives Adenokarzinom
IHC	Immunhistochemie
LA-Einheit	Lobulo-alveoläre Einheit
LT	Großes SV40 Tumor-Antigen
A	Ampère
min	Minute

MIN	Murine Intraepitheliale Neoplasie
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl eingesetzter Versuchstiere
TP53	Tumorsuppressorgen p53
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
pos.	positiv
pp	<i>post partum</i>
PR	Progesteronrezeptor
pw	<i>post weaning</i>
pRb	Retinoblastoma Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase H	Ribonuklease H
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SMA	<i>Smooth muscle actin</i>
SV40	Simian Virus 40
st	Kleines SV40 Tumor-Antigen
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TDLU	<i>Terminal Ductulo-Lobular Unit</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
V	Volt
WAP	<i>whey acidic protein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp

1 Fragestellung

Bei dem invasiven Mammakarzinom handelt es sich um die häufigste Krebserkrankung der Frau. Durch verbesserte diagnostische Möglichkeiten können prä-invasive Stadien wie das Ductale Carcinoma *In Situ* (DCIS) entdeckt und therapiert werden. Die Rolle früher Stadien bei der Karzinogenese des Mammakarzinoms ist allerdings nur unzureichend geklärt. Es besteht daher ein dringender Bedarf an adäquaten Tiermodellen, um frühe Stadien und deren Progression untersuchen zu können.

Die in unserem Institut generierten WAP-T-transgenen Mauslinien tragen die frühe Region des SV40 Genoms unter der Kontrolle des WAP-Promotors. Sie entwickeln nach Induktion der Transgenexpression durch laktotrophe Hormone invasive Adenokarzinome der Brustdrüse. Die Entstehung dieser Adenokarzinome findet über Vorläuferstadien statt, die morphologisch frappierende Ähnlichkeiten mit dem humanen DCIS aufweisen. Das WAP-T-transgene Mausmodell stellt somit ein geeignetes Progressionsmodell zur Untersuchung der Tumorigenese des Mammakarzinoms dar.

Ziel dieser Arbeit war eine umfassende histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung früher Stadien der Karzinogenese des Mammakarzinoms in diesem induzierbaren transgenen Mausmodell. Drei Linien wurden aufgrund ihrer Anzahl Transgen-exprimierender Mammaepithelzellen während der Laktation als „hoch-exprimierende“ (WAP-T1), „intermediär-exprimierende“ (WAP-T-NP8) und „niedrig-exprimierende“ (WAP-T-NP6) Linien aus 22 Linien ausgewählt. Die zeit- und gewebespezifische Expression des Transgens innerhalb der Brustdrüsen sowie ausschließlich nach Induktion durch Laktation sollte zunächst anhand immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden verifiziert werden. Zudem sollte die Untersuchung molekularer Marker Aufschluss geben über Wachstumsvorteile spezifischer Vorläuferläsionen, Herkunft der transformierten Zellen und Mechanismen der SV40-induzierten Karzinogenese.

2 Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von ca. 1.050.000 weltweit handelt es sich bei dem Mammakarzinom um die häufigste Krebserkrankung der Frau (Stewart and Kleihues, 2003). Die Rate der Neuerkrankungen ist in den westlichen Industrieländern mit 580.000 Fällen pro Jahr vergleichsweise hoch. Allein in Deutschland erkranken schätzungsweise 57.000 Frauen jährlich an einem Mammakarzinom (Epidemiologisches Krebsregister Deutschland, 2008). Brustkrebs ist somit für deutlich mehr als ein Viertel aller Krebserkrankungsfälle der weiblichen Bevölkerung verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 63 Jahren sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Die Mortalitätsrate beträgt nach Schätzungen der *World Health Organization* (WHO) jährlich ca. 500.000 Frauen weltweit (Stewart and Kleihues, 2003). Durch Fortschritte in der Früherkennung und adjuvanten Therapien konnte die Mortalitätsrate in den Niederlanden und Großbritannien in den letzten Jahren um etwa 25 % gesenkt werden. In Deutschland beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen derzeit stadienübergreifend betrachtet ca. 81 % (Epidemiologisches Krebsregister Deutschland, 2008).

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist bislang unbekannt. Zwar sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt zahlreiche Einzelaspekte bekannt, die mit der Genese in Zusammenhang gebracht werden können, allerdings scheint die Entstehung des Mammakarzinoms ein multifaktorielles Geschehen mit individuellem Verlauf zu sein. Einige Faktoren korrelieren jedoch mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko.

Lebensalter Neben dem Geschlecht (Giordano et al., 2004) ist das Alter der bei weitem wichtigste Risikofaktor an Brustkrebs zu erkranken. So beschreibt das *National Cancer Institute* (NCI) in 10-Jahres Intervallen einen Anstieg des Erkrankungsrisikos von 0.43 % im Alter von 30-39 Jahren (1/233 Frauen) auf 3.65 % im Alter von 60-69 Jahren (1/27 Frauen) (Ries et al., 2006). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 47.-70. Lebensjahr.

Hereditäre Prädisposition Eine familiäre Häufung ist in 5-10 % aller Brustkrebserkrankungen zu beobachten (Madigan et al., 1995). Etwa die Hälfte dieser Fälle ist mit einer Keimbahnmutation des *Breast Cancer Gene 1* (BRCA1, Chr. 17q21) oder des *Breast Cancer Gene 2* (BRCA2, Chr. 13q12.3) assoziiert (Miki et al., 1994; Venkitaraman, 2002; Wooster et al., 1994). Diese Tumorsuppressorgene spielen eine Rolle bei der Transkriptionsregulation von DNA-Reparaturmechanismen. Trägerinnen einer Mutation des BRCA1 oder BRCA2 Gens haben eine 60-80 %ige Wahrscheinlichkeit vor dem 45. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken. Weiterhin besteht für Trägerinnen einer BRCA1-Mutation ein 20-40 %iges und für Trägerinnen einer BRCA2-Mutation ein 10-20 %iges Risiko ein Ovarialkarzinom zu entwickeln. Die erbliche Genese des Mammakarzinoms kann weiterhin auf Mutationen des TP53-Gens (Chr. 17p13.1) im Rahmen eines Li-Fraumeni-Syndroms, Veränderungen des ATM-Gens (Chr.11q23, Ataxia teleangiectica) oder des PTEN-Gens (Chr. 10q23, Cowden Syndrom) zurückzuführen sein.

Hormonelle Faktoren Endogene und exogene Hormone spielen eine gesicherte Rolle bei der Entstehung des Mammakarzinoms (Yager and Davidson, 2006). Eine kumulative Östrogeneinwirkung durch eine frühe Menarche (< 12 Jahre), späte Menopause (> 52 Jahre), späte Erstparität (> 35 Jahre) oder Nulliparität erhöhen nachweislich das Brustkrebsrisiko. Weiterhin führten Hormonersatztherapien bei Frauen, die bereits an einem Mammakarzinom erkrankt waren, zu einer signifikanten Risikoerhöhung für die Entwicklung eines Rezidivs (Holmberg and Anderson, 2004). Für die Einnahme oraler Kontrazeptiva konnte bislang keine eindeutige Risikosteigerung nachgewiesen werden.

Reproduktive Faktoren Gravidität und Laktation wurden bislang als protektive Faktoren angesehen. Es wurde angenommen, daß bei der auf die Laktation folgenden Involution, nicht nur etwa 95 % der Drüsenepithelien durch Apoptose verloren gehen, sondern ebenfalls Epithelzellen mit somatischen Mutationen durch diesen Mechanismus eliminiert werden (Smalley and Ashworth, 2003). Neueren Erkenntnisse zufolge allerdings muß Schwangerschaft in einigen Fällen als begünstigender Faktor für die Entstehung maligner Brusttumore angesehen werden. Schwangerschafts-assoziierte Mammakarzinome zeichnen sich durch einen besonders aggressiven Krankheitsverlauf mit früher Metastasierung und hoher Mortalität aus (Daling et al., 2002). Als mögliche Ursache wird die einer Wundheilung ähnliche inflammatorische Komponente der Involution diskutiert.

Ernährung Neben übermäßigem Alkohol- und Nikotinkonsum trägt eine Ernährung mit hohem Fleisch- und Fettanteil zu der erhöhten Brustkrebsinzidenz der westlichen Industrieländer bei (Stewart and Kleihues, 2003). Zum einen kommt es insbesondere durch Fleischgenuß zu Sauerstoffradikalbildung, zum anderen fehlt es durch die häufig einseitige Ernährung an Vitaminen und antioxidativen Substanzen. Weiterhin wurde Adipositas als Risikofaktor für das postmenopausale Mammakarzinom identifiziert (Adami and Trichopoulos, 2003).

2.1.3 Klassifikation des Mammakarzinoms

Die aktuell gültige Klassifikation der WHO (Tavassoli and Devilee, 2003) unterscheidet invasive von nicht-invasiven *in situ* Karzinomen. Während invasive Karzinome in das umgebende Gewebe infiltrieren, sind *in situ* Karzinome als maligne Tumorzellproliferate ohne Durchbruch der Basalmembran und damit ohne Stromainvasion definiert.

2.1.3.1 *In situ* Karzinome

In situ Karzinome machen 5-30 % aller Mammakarzinome aus. Sie werden als potentielle Vorläufer invasiver Karzinome betrachtet. Man unterscheidet zwei unterschiedliche Formen: das Ductale Carcinoma *In Situ* (DCIS) und das Carcinoma Lobulare *In Situ* (CLIS). Bei dem DCIS entstehen die Zellproliferate primär aus dem Drüsenepi-

thel terminaler duktulo-lobulärer Einheiten (TDLUs). Sie können sich segmental ausbreiten und Brustdrüsenläppchen im Rahmen einer lobulären Kanzerisierung oder die Mamillenregion miteinbeziehen (Morbus Paget). Man unterscheidet solide, kribriforme, mikropapilläre und papilläre Wachstumsmuster mit oder ohne Komedonekrosen. Die jeweiligen Wachstumsmuster weisen Unterschiede hinsichtlich des DNA-Gehaltes, der Proliferationsaktivität, Hormonrezeptorausstattung und Potenz zur Stromainvasion auf. Beispielsweise geht das intraduktale Karzinom vom Komedo-Typ mit einer schlechteren Prognose einher. Häufig findet sich eine Überexpression des HER2-Onkoproteins (Leal et al., 1995). Nahezu 50 % der mikropapillären, kribriformen und soliden intraduktalen Karzinome weisen einen positiven Östrogenrezeptor-Status auf, während dies nur bei 20 % der Komedokarzinome der Fall ist (Claus et al., 2001). Zur Einschätzung des Rezidivrisikos wird eine Einteilung des DCIS anhand der Van-Nuys-Klassifikation durchgeführt (s. Tab. 2.1).

Score	1	2	3
Grad	non <i>high grade</i> ohne Nekrosen	non <i>high grade</i> mit Nekrosen	<i>high grade</i>
Größe (mm)	1-15	16-40	> 40
Resektionsrand (mm)	> 10	1-9	< 1
Alter (Jahre)	> 60	40-60	< 40
VNPI Grad			
Grad 1 (4-6 Punkte)	geringes Rezidivrisiko, keine Behandlung		
Grad 2 (7-9 Punkte)	mittleres Rezidivrisiko, Strahlentherapie		
Grad 3 (10-12 Punkte)	hohes Rezidivrisiko, Mastektomie		

Tab. 2.1: **Van-Nuys-Prognose-Index (Silverstein and Buchanan, 2003)**. Einschätzung des Rezidivrisikos bei DCIS anhand eines additiven Scores. In die Beurteilung gehen ein Kerngrading, Komedonekrosen, Alter der Patientin bei Erstdiagnose, Größe des DCIS-Herdes und operativer Resektionsrand.

Entsprechend ihres Kerngradings werden DCIS in *high grade* und *non high grade* Karzinome mit oder ohne Komedonekrosen unterschieden. Weitere Kriterien bei der Beurteilung duktaler *in situ* Karzinome stellen das Alter der Patientin bei Erstdiagnose, die Größe des DCIS-Herdes und der operative Resektionsrand dar. Klinisch weisen Patientinnen mit DCIS, die den Gruppen 1 und 2 zugeordnet werden können, signifikant

seltener intramammäre Rezidive auf als Patientinnen der Gruppe 3.

Als LCIS wird die neoplastische Proliferation monomorpher Tumorzellen bezeichnet, die sich intralobulär ausbreiten, die Drüsenläppchen durch locker aggregierte Zellverbände ausfüllen und keine Stromainvasion zeigen. Die genaue Häufigkeit des LCIS ist nicht bekannt, da es sich meist um eine nicht palpable Läsion handelt, die nur selten zu Kalzifikationen führt und deshalb im Allgemeinen nur zufällig im Brustdrüsengewebe, das zur Abklärung anderer Auffälligkeiten entnommen wurde, entdeckt wird. Retrospektive Studien gehen von einer Häufigkeit zwischen 0,6 und 3,9 % aus. Die besondere Problematik des LCIS besteht in seiner Neigung zu multizentrischem und bilateralem Auftreten (Rosen et al., 1981).

Invasives duktales Karzinom, *not otherwise specified* (NOS)
Invasives lobuläres Karzinom
Tubuläres Karzinom
Invasives kribriiformes Karzinom
Medulläres Karzinom
Muzinöse Karzinome
Neuroendokriner Tumor
Invasives papilläres Karzinom
Invasives mikropapilläres Karzinom
Apokrines Karzinom
Metaplastisch Karzinom
Lipidreiches Karzinom
Sekretorisches Karzinom
Onkozytäres Karzinom
Adenoid-zystisches Karzinom
Azinuszell-Karzinom
Glykogenreiches klarzelliges Karzinom
Talgdrüsenkarzinom
Inflammatorisches Karzinom
Morbus Paget der Mamille

Tab. 2.2: **WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome**

2.1.3.2 Invasive Mammakarzinome

Bei dem invasiven Mammakarzinom handelt es sich um einen infiltrativ wachsenden, malignen Tumor epithelialer Herkunft. Die WHO klassifiziert histologische Subtypen, die sich hinsichtlich Verlauf, Prognose und Therapie voneinander unterscheiden (s. Tab. 2.2). Das duktal-invasive Mammakarzinom ist mit 65-80 % das häufigste Mammakarzinom. Tumorzellen mit glandulärem, trabekulärem oder solidem Wachstumsmuster prägen das histologische Bild des Tumors. Mit 10-15 % ist das invasiv-lobuläre Mammakarzinom der zweithäufigste maligne Tumor der weiblichen Brustdrüse. Histologisch zeigt sich ein dissoziiertes Wachstum der Tumorzellen bedingt durch eine Mutation des E-Cadherin-Gens mit Verlust der Expression des Adhäsionsmoleküls. Weitere Karzinomformen stellen das tubuläre (1-15 %), das medulläre (3 %), das papilläre (1-7 %) und das muzinöse Mammakarzinom (1-2%) dar. Alle übrigen Untergruppen treten mit einer Häufigkeit von weniger als 1 % auf.

2.1.4 Prognostische Faktoren

Ein Prognosefaktor beschreibt definitionsgemäß einen Meßwert, der mit dem krankheitsfreien Überleben oder dem Gesamtüberleben zum Zeitpunkt der Primäroperation ohne adjuvante Systemtherapie korreliert. Er korreliert somit mit dem natürlichen Verlauf der Erkrankung unabhängig von der gewählten Therapie. Für das invasive Mammakarzinom wurde 1994 durch das *College of American Pathologists* eine Subklassifizierung der relevanten Prognosefaktoren durchgeführt (Hermanek et al., 1995):

Gruppe I: Histologischer Typ, TNM-Klassifikation, Grading, Hormonrezeptoren

Gruppe IIa: Proliferationsmarker (Ki67), Mitose-Index

Gruppe IIb: TP53, HER2-Neu, Angioinvasion

Gruppe III: weitere Faktoren

In Übereinstimmung mit den *Consensus Statements* der *National Institutes of Health* (NIH 2000), der *American Association of Clinical Oncology* (ASCO 1996) und der *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC 1995) basieren die aktuellen Therapieempfehlungen auf den Faktoren der Kategorie I. Sie entsprechen

den etablierten Prognosefaktoren. Faktoren der übrigen Gruppen werden als zusätzliche Hilfsparameter verwendet oder sind Gegenstand aktueller Forschung.

Histologischer Typ Verglichen mit dem invasiv-lobulären Mammakarzinom hat das invasiv-duktales Mammakarzinom eine etwas schlechtere Prognose. Seltener Subtypen wie das muzinöse, medulläre, tubuläre und das papilläre Karzinom zeichnen sich durch eine bessere Prognose als das invasiv-duktales Karzinom aus (Ellis et al., 1992).

pT	Primärtumor
pTX	Nicht beurteilbar
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ Tis (DCIS) Tis (CLIS)
pT1	Tumor < 2 cm pT1mic Mikroinvasion < 0,1 cm pT1a < 0,5 cm pT1b > 0,5 cm, < 1 cm pT1c > 1 cm, < 2 cm
pT2	Tumor > 2 cm, < 5 cm
pT3	Tumor > 5 cm
pT4	Tumor mit Ausdehnung auf Haut oder Brustwand
pN	Regionäre Lymphknoten
pNX	Nicht beurteilbar
pN0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pN1mic	Mikrometastasen > 0,2 mm, < 2 mm
pN1	Metastasen in 1-3 ipsilateralen LK
pN2	Metastasen in 4-9 ipsilateralen LK
pN3	Metastasen > 10 ipsilateralen LK, oder klinisch auffällig
pM	Fernmetastasen
pMX	Nicht beurteilbar
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tab. 2.3: **TNM-Klassifikation**

Tumor-Staging In die Beurteilung des Mammakarzinoms nach der TNM-Klassifikation (American Joint Committee on Cancer, 2002) gehen die Ausdehnung des Primärtumors, der Befall regionärer Lymphknoten sowie das Auftreten von Fernmetastasen ein. Das Präfix „p“ beschreibt die Klassifikation anhand des postoperativen, histopathologischen Befundes. Der Befall axillärer Lymphknoten stellt den stärksten prognostischen Faktor dar. Die rezidivfreie 5-Jahres-Überlebensrate bei nodal-negativem Status liegt bei ca. 80 %, bei Lymphknotenbefall dagegen bei nur noch 20 % (Hilsenbeck et al., 1998). Das Risiko eines Rezidivs steigt weiterhin mit dem Durchmesser des Primärtumors. Mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen bei der Diagnosestellung verschlechtert sich die Prognose eklatant (Carter et al., 1989).

	Score	5-Jahres Überlebensrate
Tubuläre Differenzierung		
> 75 %	1	
10-75 %	2	
< 10 %	3	
Kernpleomorphie		
Kleine, monomorphe Zellen	1	
Moderate Größenvarianz	2	
Ausgeprägte Größenvarianz	3	
Mitosen (pro 10 HPF)		
< 7	1	
8-14	2	
> 15	3	
Finaler histologischer Grad		
Grad 1 (3-5 Punkte)		90 %
Grad 2 (6-7 Punkte)		75 %
Grad 3 (8-9 Punkte)		50 %

Tab. 2.4: **Histologisches Grading nach Bloom-Richardson.**

Histologisches Grading Neben dem TNM-Status spielt das histologische Grading die größte Rolle als prognostischer Faktor. Es korreliert eng mit dem Differenzierungsgrad des Karzinoms, dem Lymphknotenstatus, der Rezidiv- und Überlebensrate (Elston

and Ellis, 1991). Während Karzinome mit guter Differenzierung (G1) eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 90 % aufweisen, beträgt sie bei Tumoren mäßiger (G2) und schlechter Differenzierung (G3) nur noch 75 % bzw. 50 %. Die Beurteilung erfolgt gemäß dem Standard nach Elston und Ellis modifiziert nach Bloom und Richardson (Bloom and Richardson, 1957) (Tab. 2.4). Neben dem Ausmaß der tubulären Differenzierung eines Tumors gehen der Grad der Kernpleomorphie und die Mitoserate in die Beurteilung ein.

Hormonrezeptorstatus Der Östrogen (ER) - und Progesteronrezeptor (PR) zählen zu den Steroidrezeptoren und sind in die Zellwachstumsregulation involviert. Während ein positiver Hormonrezeptorstatus mit einer hohen histologischen Differenzierung, einem negativen Lymphknotenstatus, einem diploiden DNA-Gehalt, einer geringen Zellproliferationsrate und einem günstigeren klinischen Verlauf assoziiert ist, weisen ER/PR-negative Karzinome einen aggressiveren Krankheitsverlauf, Amplifikationen von HER2 und *c-myc* sowie Mutationen des TP53-Gens auf (Locker, 1998; Osborne, 1998). Weiterhin zählt der Hormonrezeptorstatus zu den prädiktiven Faktoren, die den Erfolg einer adjuvanten, anti-östrogenen Therapie abschätzen lassen. In Betracht dieser zusätzlichen Therapieoption gehört die Bestimmung des ER- und PR-Status zum diagnostischen Standard.

HER2 Status Das HER2/neu (synonym: erbB2) -Onkoprotein ist ein transmembranöser Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ. Es hat eine Schlüsselfunktion bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung. Rund 20-30 % aller invasiven Mammakarzinome weisen eine HER2-Überexpression auf (Kallioniemi et al., 1992). Diese ist verbunden mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, fehlender Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, einer erhöhter Anzahl befallener axillärer Lymphknoten und einem ungünstigen klinischen Verlauf. Rekombinante, monoklonale Antikörper gegen HER2 (Herceptin™) haben sich als effektiver Inhibitor in der Tumorthherapie erwiesen. Bei einer Behandlung mit Herceptin™ wird eine längere progressionsfreie Zeit sowie ein verbessertes Gesamtüberleben beschrieben (Vogel et al., 2001).

Lymphangiosis carcinomatosa und Angioinvasion Die Invasion des Tumors in umgebende Blut- oder Lymphgefäße geht mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher (Kato et al., 2003). So konnte in einer multivariaten Analyse die Lymphgefäßinvasion als unabhängiger Faktor für das krankheitsfreie Überleben und für das Gesamtüberleben ermittelt werden (Schoppmann et al., 2004). Insbesondere die Gefäßinvasion wird bei der Risikoklassifikation nodalnegativer Patientinnen eingesetzt.

Proliferationsmarker Ki67 Ki67 ist ein Zellproliferation-assoziiertes Antigen, welches in allen Phasen des Zellzyklus mit Ausnahme der G0-Phase ruhender Zellen exprimiert wird (Gerdes et al., 1983). Es beschreibt somit die Wachstumsaktivität einer Zelle und wurde als unabhängiger Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf des Mammakarzinoms beschrieben. Ein hoher Ki67-Index wurde mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer schlechteren Überlebensrate in Verbindung gebracht (de Azambuja et al., 2007)

TP53 und pRb Neben BRCA1 und BRCA2 sind Mutationen der Tumorsuppressorgene TP53 (Tumorprotein 53, Chr.17p13.1) und Rb (Retinoblastoma-Gen, Chr. 13q14.2) ebenfalls mit der Entstehung von Brustkrebs assoziiert. Die Mutationsrate des TP53-Gens beträgt bei Mammakarzinomen 25 % und korreliert mit einem progressiven Krankheitsverlauf sowie einer reduzierten Überlebenszeit (Gasco et al., 2002). Zusätzlich sind Mammakarzinome mit TP53-Mutation mit einer schlechten Differenzierung, hohen Mitoseraten, negativem Hormonrezeptorstatus, aneuploidem DNA-Gehalt und einem hohen Proliferationsindex assoziiert (Bhargava et al., 1994; Børresen-Dale, 2003). Eine verringerte Expression des pRb durch *loss of heterozygosity* (LOH) ist über eine erhöhte Proliferationsrate und eine schlechtere Prognose hinaus mit dem basalen Subtyp des Mammakarzinoms vergesellschaftet (Herschkowitz et al., 2008).

Zytokeratinexpression Das Zytoskelett der Zelle besteht aus drei unterschiedlichen Fasersystemen, die entsprechend ihres Durchmessers in Mikrofilamente (5-6 nm), Intermediärfilamente (7-11 nm) und Mikrotubuli (20-26 nm) eingeteilt werden. Neben Desmin, Vimentin, Gliafilamentprotein und einigen weiteren Proteinen besteht die Gruppe der Intermediärfilamente hauptsächlich aus Zytokeratinen (CK). Sie stellen eine Gruppe wasserunlöslicher Filamentproteine dar, die Bestandteil des Zytoskeletts epithelialer

Zellen sind. Gelelektrophoretisch wurden bisher 20 verschiedene Zytokeratine charakterisiert, die sich aufgrund ihrer molekularen Charakteristika in basische und saure Unterfamilien aufteilen lassen (Moll et al., 1982):

Typ I: saure Zytokertine (CK 9-20)

Typ II: neutral/basische Zytokeratine (Ck 1-8)

Typ I und Typ II Zytokeratine werden jeweils paarweise exprimiert und bilden Heterodimere, die sich in einem zweiten Schritt zu Tetramer-Komplexen zusammenlagern. Entsprechend ihrer gewebstypischen Verteilung unterscheidet man hochmolekulare, plattenepitheliale Zytokeratine (Typ I: Ck 9-17, Typ II: Ck1-6) von niedermolekularen, zylinderepithelialen Zytokeratinen (Typ I: Ck 18-20, Typ II: Ck 7,8). Physiologisch exprimiert das Brustdrüsengewebe ein spezifisches Zytokeratinmuster aus zylinderepitheltypischen Zytokeratinen (CK7, CK8, CK18 und CK19) selektiv in luminalen Epithelzellen und plattenepitheltypischen Zytokeratinen (CK5, CK14, CK15 und CK17) in den Basalzellen. Im Jahre 2000 stellten Perou et al. eine innovative Subtypisierung humaner Mammakarzinome mittels Genexpressionsanalysen vor (Perou et al., 2000). Die Einteilung erfolgte dabei in vier Kategorien: luminal, *normal-like*, basal und HER2-positiv. Während luminalen Tumore, die sich durch die Expression luminaler Keratine auszeichneten neben einer hohen ER-Expression vor allem eine vergleichsweise gute Prognose aufwiesen, war der basale Subtyp mit einer ausgesprochen schlechten Prognose assoziiert (Sørlie et al., 2001).

2.2 Entwicklung des invasiven Mammakarzinoms

Bei der Karzinogenese handelt es sich um einen komplexen, mehrstufigen Prozess, bei dem es zu einer Transformation normaler Zellen zu malignen Tumorzellen kommt. Das Dreistufenmodell nach Bishop und Weinberg beschreibt eine vereinfachte Darstellung und unterteilt den Mechanismus der Tumorentstehung in Initiation, Promotion und Progression (Bishop, 1987; Weinberg, 1989). Demnach erfährt die Zelle während der Initiation eine von einem Karzinogen ausgelöste Mutation. Wird diese Mutation nicht per DNA-Reparatur beseitigt oder die Zelle mittels Apoptose eliminiert, persistiert sie. Handelt es sich bei dem betroffenen Gen um ein Tumorsuppressorgen, welches für die Kontrolle des Zellzyklus und der Zellteilung zuständig ist, kann dies zu einem Funk-

tionsverlust führen. In einem zweiten Schritt erfährt die initiierte Zelle während der Promotion einen Wachstumsstimulus. Sie gibt ihre geschädigte DNA an die Tochterzelle weiter und weist während der Proliferation selbst instabiles Erbgut auf. Das Risiko für weitere Mutationen steigt. Durch den stetigen Wachstumsreiz und die Zellproliferation entsteht ein präneoplastischer Fokus. Nach Akkumulation weiterer Mutationen findet die eigentliche maligne Transformation statt. Die Zelle ist nun potentiell bösartig, teilt sich ohne Unterbrechung und wird immortal. Zahlreiche Zellteilungen führen zum Aufbau einer Tumormasse und es kommt zu einer zunehmenden Entdifferenzierung der Zellen. Während der Progression, der letzten Stufe der Tumorgenese, entfalten die Tumorzellen ihr gefährliches Potential durch Metastasierung.

Klassische Modelle zur Karzinogenese des invasiven Mammakarzinoms gehen von einer schrittweisen Entdifferenzierung benigner Vorstufen analog zu der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms aus (Fearon and Vogelstein, 1990). Entsprechend dieses Modells kommt es während der Progression zu einer Akkumulation genetischer Alterationen, welche die weitere Entdifferenzierung vorantreiben (Allred et al., 1993; Shackney and Silverman, 2003). Insbesondere die Überexpression von Onkogenen bzw. die Mutation von Tumorsuppressorgenen konnte als für die Tumorentstehung wichtiger Faktor belegt werden. Anhalt für eine lineare Tumorprogression über Vorläuferläsionen gab die Beobachtung, daß neben *in situ* Karzinomen eine Reihe benigner, proliferativer Brustdrüsenläsionen mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines invasiven Mammakarzinoms einhergeht (Dupont and Page, 1985; Tavassoli and Norris, 1990). So ist die einfache duktale Hyperplasie (UDH) mit einem 2-fach erhöhten Brustkrebsrisiko, die atypische duktale Hyperplasie (ADH) mit einem 4-fach erhöhten Risiko assoziiert, während das DCIS mit einem 8-10-fachen und das CLIS mit einem 10-11-fachen Risiko einer Mammakarzinomentstehung vergesellschaftet ist. Zudem konnten diese Veränderungen in Brustdrüsen mit einem invasiven Mammakarzinom gehäuft detektiert werden (Jensen et al., 1976).

Neuere Forschungsergebnisse haben fundierten Anlass zu einer Neuinterpretation der gängigen Progressionsmodelle gegeben und teils bereits zu einem Paradigmenwechsel geführt. Insbesondere die Ergebnisse molekulargenetischer Analysen wie z.B. Gewebemikrodissektion (Emmert-Buck et al., 1996), DNA Amplifikation (Lage et al., 2003; Stoecklein et al., 2002; Telenius et al., 1992) und der Genomanalyse (*comparative ge-*

nomic hybridization (CGH), *loss of heterozygosity* (LOH), Genexpressionsanalysen) haben zu komplexeren Modellen mit unterschiedlichen Progressionszweigen geführt (Buerger et al., 1999; Ma et al., 2003; O'Connell et al., 1998). Obwohl die Klassifikation des Mammakarzinoms nach wie vor anhand des histologischen Subtyps durchgeführt wird, stellt sich zunehmend heraus, daß das Grading von weit höherer prognostischer Relevanz ist. Molekulare Untersuchungsmethoden bestätigen, daß das Grading das Ausmaß genetischer Aberrationen besser widerspiegelt als andere klinisch-pathologische Parameter (Buerger et al., 2001; Roylance et al., 1999). So gehen gut differenzierte (G1) und tubuläre Mammakarzinome mit einer geringen Anzahl genetischer Aberrationen und einem rekurrenten Verlust von 16q einher, während schlecht differenzierte Karzinome (G3) komplexe Genotypen mit einem hochfrequenten Verlust von 11q, 14q, 8p, 13q, einem Zugewinn von 17q, 8q, 5p sowie Amplifikationen in 17q12, 17q22-24, 6q22, 8q22, 11q13 und 20q13 aufweisen (Roylance et al., 1999). Zudem findet sich der für gut differenzierte Karzinome typische Verlust von 16q sehr selten in schlecht differenzierten Tumoren. Aufgrund dieser unterschiedlichen molekularen Profile wird davon ausgegangen, daß eine Progression von gut zu schlecht differenzierten Mammakarzinomen ein eher seltenes Ereignis darstellt (Buerger et al., 2001; Roylance et al., 1999). Genexpressionsanalysen geben weitere Einblicke in die Systematik der Mammakarzinomklassifizierung. So wurden entsprechend ihres Genexpressionsprofils vier Kategorien unterschieden: lumbale, HER-2-positive, basale, und *normal breast-like* Karzinome (Perou et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass diese Kategorisierung die jeweilige Prognose widerspiegelt: während HER-2-positive oder basale Karzinome eine schlechtere Prognose haben, zeigen lumbale oder *normal breast-like* Tumore einen besseren Verlauf (Sørli et al., 2001). Fundamental scheint hier für die Kategorisierung neben dem Tumorigrad der Hormonrezeptorstatus zu sein. So zählen ER- und PR-positive Karzinome ohne Nachweis einer HER2 Amplifikation zu den lumbalen, gut differenzierten Karzinomen mit nur geringer genomischer Instabilität und einem häufigen Verlust von 16q. Es wird angenommen, dass diese Karzinome aus *low grade* DCIS entstehen, die häufig ähnliche genetische Konstellationen aufweisen (Reis-Filho and Lakhani, 2003). Andererseits werden *high grade* DCIS als Vorläuferläsionen des schlecht differenzierten Mammakarzinoms betrachtet. Interessanterweise zeigen ADH ebenfalls häufig einen Verlust des 16q auf und weisen ähnliche Immunprofile wie *low grade* DCIS auf (Reis-Filho and Lakhani, 2003; Shackney and Silverman, 2003). Bei

der UDH finden sich dagegen kaum Übereinstimmungen, was zu der Annahme führte, dass sie keinen direkten Vorläufer der ADH darstellen wie ursprünglich angenommen (Reis-Filho and Lakhani, 2003; O'Connell et al., 1998). Die Definition einer Vorläuferläsion für das *high grade* DCIS ist bislang nicht gelungen.

Die biologische Heterogenität des Mammakarzinoms ist in den vergangenen Jahren insbesondere durch die Weiterentwicklung molekularer Methoden deutlich geworden. Folglich wird das klassische lineare Progressionsmodell zunehmend durch die Vorstellung abgelöst, daß eine komplexe Häufung genetischer Alterationen zu unterschiedlichen Entwicklungszweigen führt. So wird von der Existenz eines eher hoch differenzierten Zweiges ausgegangen, welchem die ADH, das *low grade* DCIS und gut differenzierte Karzinome anzugehören scheinen, während dem schlecht differenzierten Entwicklungszweig das *high grade* DCIS und G3-Mammakarzinome zuzuordnen sind (Simpson et al., 2005). Eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung wird dem Hormonrezeptorstatus, dem HER2-Status und dem Proliferationsindex eingeräumt. Diese Entwicklungen auf dem Gebiet der Mammakarzinomentstehung sind von entscheidender klinischer Relevanz und nehmen Einfluß auf die Prognose und therapeutische Entscheidungen bei der Behandlung des Mammakarzinoms.

2.3 Mausmodelle zur Progression des invasiven Mammakarzinoms

Tiermodelle haben in den vergangenen Jahren wesentlich zum Verständnis von Krankheitsprozessen beigetragen. Im Vergleich zu genetisch sehr heterogenen Patientenproben, die meist nur eine Momentaufnahme ohne mögliche Verlaufskontrolle darstellen, bieten Tiermodelle den Vorteil genetisch homogener Populationen mit hohen verfügbaren Fallzahlen, der Möglichkeit der Verlaufsbeobachtung und der Durchführung funktionseller Versuche. Bei der Erforschung maligner Brusttumore bieten Tiermodellen insbesondere die Möglichkeit die Brustkrebsentstehung und Progression unter dem Einfluß von Hormonen und physiologischen, involutions-assoziierten *Remodelling*-Prozessen zu untersuchen.

2.3.1 Aufbau und Entwicklung der murinen Brustdrüse

Die Maus (*Mus musculus*) besitzt fünf Brustdrüsenpaare (Abb. 2.1). Diese entstehen entlang der Milchdrüsenleisten. Das erste Drüsenpaar befindet sich in der zervikalen Region nahe der Glandula parotis. Die beiden thorakalen Paare überlappen sich im Bereich des Brustkorbs. Die größten Brustdrüsen finden sich abdominal und stehen über eine schmale Gewebebrücke mit den inguinalen Drüsen der Leistenregion in Verbindung. Im Folgenden sollen die einzelnen Phasen der murinen Brustdrüsenentwicklung dargestellt werden.

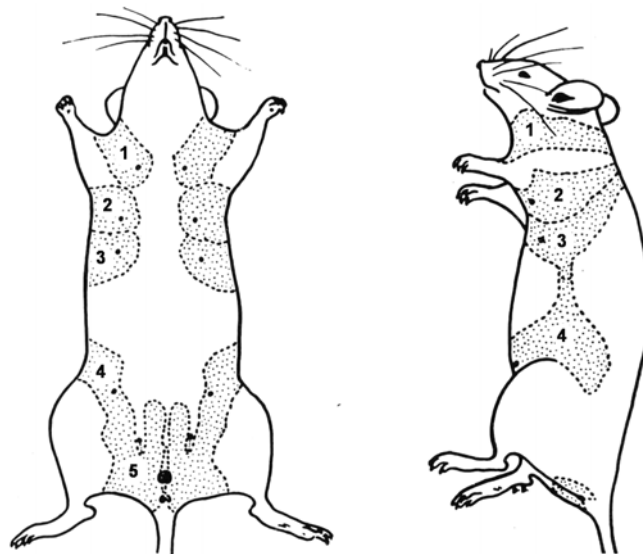


Abb. 2.1: **Schematische Darstellung der Topographie muriner Brustdrüsen.** Die weibliche Maus besitzt fünf Brustdrüsenpaare. Zervikale(1), thorakale(2 und 3), abdominale(4) sowie inguinale(5) Brustdrüsen. Modifiziert nach Snell (Snell, 1941).

Embryonale Phase Zu Beginn der Embryonalentwicklung wandern ektodermale Zellen entlang der Milchleisten in das umgebende Mesenchym und bilden Knospen aus. Bis zur Geburt wachsen diese Knospen und formen einen rudimentären Drüsenkörper. Er besteht aus einem primären Dukt mit wenigen Verzweigungen sowie dem umliegenden Fettgewebe. In der Zeit nach der Geburt kommt es vorerst zu keiner weiteren Differenzierung dieser rudimentären Epithelanlage.

Pubertät Im Alter von etwa drei Wochen beginnt mit dem Einsetzen der zyklischen Gonadotropinsekretion und unter der Einwirkung von Östrogen die duktale Wachstumsphase der Brustdrüsen (Daniel and Silberstein, 1987). An den distalen Enden der rudimentären Duktale werden Knospen, die sogenannten *Terminal End Buds* (TEBs) sichtbar, welche aus multiplen, epithelialen Zellschichten bestehen. Die äußerste der Zellschichten wird von undifferenzierten und pluripotenten Stammzellen, den *Cap cells* gebildet. Von ihnen geht das Längenwachstum und die Verzweigung der Duktale aus. Bis zu einem Alter von 10-12 Wochen verzweigen sich die Duktale in sekundäre und tertiäre Gangstrukturen und füllen den gesamten Fettkörper aus. Erreichen die TEBs die Grenzen des Fettgewebes und somit das umgebende Bindegewebe, wird zum einen die weitere Proliferation gestoppt, zum anderen findet eine Differenzierung statt. Die *Cap cells* bilden ein einschichtiges Epithel und myoepitheliale Zellen aus, die das Epithel umschließen. Desweiteren werden die terminalen Duktale von Stroma und einer Basalmembran, gebildet durch das Myoepithel umgeben (Williams and Daniel, 1983). Die zyklische Sekretion von Hormonen durch die Ovarien während jedes Östrus führt zu einer weiteren Differenzierung der terminalen Duktale zu rudimentären Alveolen (Andres and Strange, 1999).

Schwangerschaft und Laktation Die vollständige Differenzierung des Brustdrüsen-gewebes findet während der 19-21 Tage dauernden Schwangerschaft statt (Nandi, 1958). Unter dem Einfluß von Progesteron kommt es initial zu einer ausgeprägten Proliferation der alveolären Knospen. Das Verhältnis epithelialer Zellen zu Adipozyten verschiebt sich zugunsten des Drüsenkörpers und Kapillaren sprießen in das umgebende Bindegewebe ein. Innerhalb der zweiten Schwangerschaftshälfte, der sogenannten lobulo-alveolären Phase, differenzieren die alveolären Knospen zu reifen Alveolen, die von einer kontinuierlichen Schicht myoepithelialer Zellen umgeben sind. Erst kurz vor der Geburt der Jungtiere beginnt innerhalb der alveolären Epithelzellen die Milchsynthese. Es kommt zu einer Vermehrung des rauhen endoplasmatischen Retikulums und einer Expansion des Golgi-Apparates (Mather and Keenan, 1998). Der Übergang in die Laktationsphase erfolgt mit der Geburt. Die mit Milchproteinen und Lipiden gefüllten, intrazellulären Vesikel werden nun in die Lumina sezerniert.

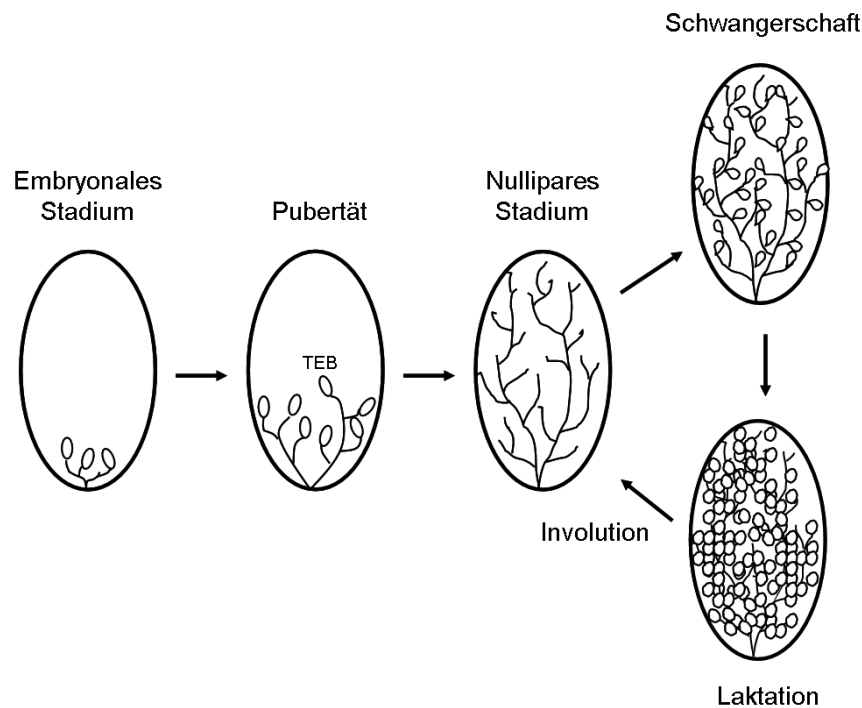


Abb. 2.2: **Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus der murinen Brustdrüse.** Modifiziert nach Hennighausen und Robinson (Hennighausen and Robinson, 2005)

Involution Nach Abschluß der etwa dreiwöchigen Laktationsphase durchläuft die Brustdrüse einen zweiphasigen Prozess der Rückbildung, die sogenannte Involution. Diese wird durch Milchakkumulation eingeleitet sobald die Jungtiere nicht mehr säugen (Quarrie et al., 1996). In den ersten 48 Stunden nach Absetzen der Jungtiere ist der Ablauf der Involution noch reversibel (Li et al., 1997). Bis auf eine Abflachung der Epithelien infolge der Milchstase erscheinen die Alveolen morphologisch intakt. Erst am dritten Tag der Involution kommt es irreversibel zu einer massiven Apoptose der alveolären Epithelzellen und somit zur Zerstörung der alveolären Strukturen. Während apoptotische Zellen von benachbarten Epithelzellen oder Makrophagen abgeräumt werden, expandieren die verbliebenen Adipozyten und das umgebende Bindegewebe (Fadok, 1999). Durch diesen lipomatösen und bindegewebigen Umbau der Brustdrüse wird im Laufe der etwa 21 Tage dauernden Involution ein Zustand erreicht, der morphologisch der postpubertären virginen Brustdrüse ähnelt.

2.3.2 Das WAP-T transgene Mausmodell

Bei dem hier beschriebenen WAP-T-transgenen Mausmodell handelt es sich um ein Modell mit induzierbarer Transgenexpression. Erst gegen Ende der Schwangerschaft wird die frühe Region des SV40 Genoms unter der Kontrolle des *whey acidic protein* (WAP)-Promotors gewebespezifisch in Epithelzellen der Brustdrüse exprimiert (Schulze-Garg et al., 2000). Als Folge der Transgenexpression entwickeln die Tiere intraepitheliale Neoplasien, welche eine große morphologische Ähnlichkeit zu humanen DCIS aufweisen. Sie bieten kribriiforme, solide, papilläre und „clinging“-artige Wachstumsmuster und haben weiterhin die Fähigkeit zur Progression. Aus ihnen entstehen invasive Adenokarzinome vom gut differenzierten (G1) Typ mit zumeist tubulärem, trabekulärem oder papillärem Wachstumsmuster, sowie mäßig (G2), schlecht (G3) und seltener undifferenzierte (G4) Tumoren.

Frühe Region des SV40 Virus Das Simian Virus 40 (SV40) gehört zu den Polyomaviren. Während des frühen Stadiums seiner Replikation wird die „frühe“ Genregion der viralen DNA transkribiert. Diese Genregion kodiert für das große T-Antigen (LT), das kleine T-Antigen (st) und das 17kT Protein. 17kT und st entstehen hierbei durch alternatives Spleißen der „frühen“ SV40 RNA. Da LT, st und 17kT in der Lage sind Zellen in Kultur zu transformieren, werden sie als Onkogene eingestuft. Die transformierende Eigenschaft des LT beruht auf der Komplexierung und Inaktivierung zellulärer Proteine. Zu diesen Proteinen gehören die Tumorsuppressor-Proteine pRb und TP53. Durch ihre Bindung an LT kommt es zu einer funktionellen Inaktivierung der Proteine, die für die Zelle eine Null-Situation simuliert (Sheng et al., 2000; Voorhoeve and Agami, 2003). pRb hemmt die E2F-abhängige Transkription zahlreicher Gene, deren Produkte für die DNA-Synthese benötigt werden (Bartek et al., 1997). TP53 ist entscheidend an der Regulation des Kontrollpunktes beteiligt, der das Wachstum von Zellen mit geschädigter DNA in der G1 Phase arretiert. Als Transkriptionsfaktor aktiviert TP53 Zellzyklusinhibitoren, Apoptose-Induktoren und DNA-Reparatur Gene um eine Replikation geschädigter DNA zu verhindern. Ein für die Tumorentstehung wichtiger Aspekt der TP53-Komplexierung durch LT ist die Endoreplikation, welche zuerst zu tetraploiden und anschließend zu aneuploiden Zellen führt (Ramel et al., 1995). Sind pRb und TP53 funktionell inhibiert kommt es zu einem Eintritt der Zelle in die S-Phase

und eine Steigerung der Proliferationsrate ist die Folge. Durch eine Bindung an pp2A trägt st zu der Transformation der Zelle bei. Die Phosphatase-Aktivität des pp2A wird inhibiert, was zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalweges führt (Ali-Seyed et al., 2006; Chen et al., 2004). Die genauen Mechanismen der Transformation durch 17kT sind nicht geklärt. Allerdings scheint es, die Menge an pRb zu reduzieren und die Zellzyklus-Progression zu stimulieren (Boyapati et al., 2003).

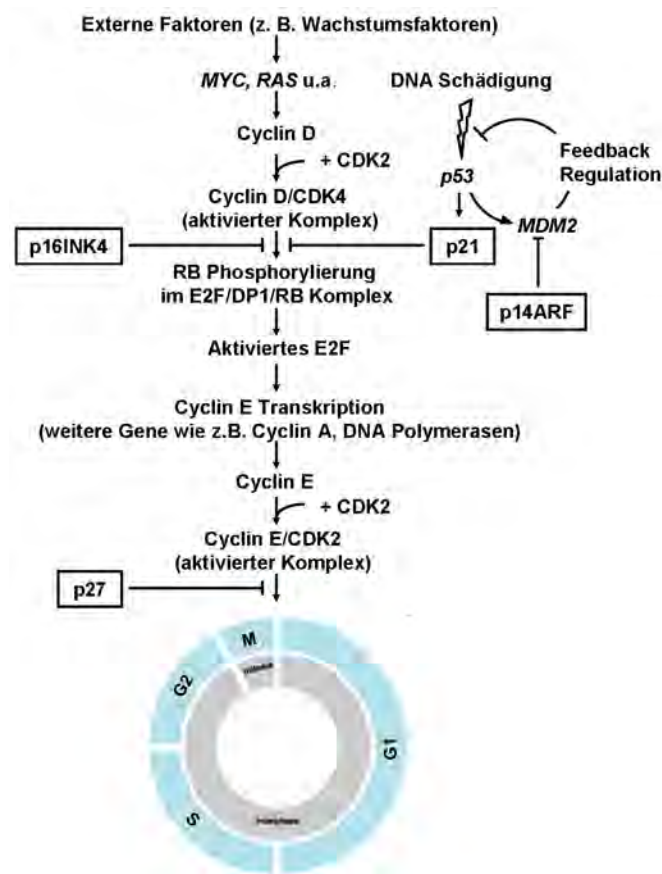


Abb. 2.3: **Einfluß des SV40 T-Antigens auf den Zellzyklus.** LT komplexiert und inaktiviert TP53 und pRb. Geschädigte Zellen werden nicht mehr in der G1-Phase arretiert, treten in die S-Phase ein und proliferieren.

WAP-Promotor WAP-T transgene Mäuse tragen die „frühe“ Region des SV40 Gens unter der Kontrolle des murinen WAP-Promotors. Dieser wird gegen Ende der Schwangerschaft, ab dem 15. Tag nach Vaginalpfropfbildung und während der Laktation in Epithelzellen der murinen Brustdrüse durch laktotrophe Hormone wie Prolaktin und Östrogen, allerdings in seltenen Fälle auch durch Hydrokortison und Insulin induziert (Pittius et al., 1988). Die Kopplung des Transgens an den WAP-Promotor fand mit dem Ziel einer zeitlich und lokal definierten Transgenexpression nach Induktion durch Verpaarung in den Epithelien der terminalen Drüsenendstücken sowie den duktalem Epithelzellen statt.

Balb/c Hintergrund Das WAP-T Mausmodell wurde in Mäusen des C57BL/6 Inzuchtstamms etabliert und anschließend in einen Balb/c Hintergrund zurückgekreuzt. Mäuse des Balb/c Stamms tragen eine Prädisposition für Mammakarzinome (Kuperwasser et al., 2000; Sherr, 2001). Eine Punktmutation im *Cdkn2a*-Lokus wirkt sich hierbei auf zwei Gene mit überlagernden Leserastern aus: p16 (INK4a, Inhibitor von CDK4) und ARF (*alternative reading frame*, p19). In seiner unbeeinträchtigen Funktion inhibiert p16 die Cyclin-abhängige Kinase CDK4 und unterbindet somit die Phosphorylierung des pRb Proteins. Dies führt zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase. Punktmutiertes p16 hat eine reduzierte Aktivität (Zhang et al., 1998). Interessanterweise ist die Inaktivierung von p16 durch Mutation oder Hypermethylierung in humanen normalen Brustdrüsenepithelien und frühen prämaligen Läsionen häufig anzutreffen (Crawford et al., 2004). Sie stellen somit die ersten genetischen Aberrationen in der Mammakarzinogenese dar. Die Funktion des ARF-Proteins scheint durch die Mutation nicht beeinträchtigt zu sein. Zwei weitere Punktmutationen im *Prkdc*-Lokus begünstigen allerdings die Entstehung maligner Tumore der Brustdrüsen. Das betroffene Protein ist an der Reparatur von DNA-Doppelsträngen beteiligt und sein Verlust führt zu einer erhöhten genomischen Instabilität (Yu et al., 2001).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mammalia

Die Versuchstiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Heinrich-Pette-Instituts unter spezifisch pathogenfreien (SFP) Bedingungen gehalten. Alle Experimente unter Verwendung von Versuchstieren wurden durch die Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales (BAGS) Hamburg genehmigt.

Folgende Mauslinien werden verwendet:

1. WAP-T1/BALB/c (Schulze-Garg *et al.*, 2000)
2. WAP-T-NP8/BALB/c (Schulze-Garg *et al.*, 2000)
3. WAP-T-NP6/BALB/c (Schulze-Garg *et al.*, 2000)
4. BALB/c (Jackson Tierhaltung, USA)

3.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden handelsübliche Chemikalien der Firmen Merck und Sigma verwendet. Spezielle Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

2-Butanol	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
AEC u. High Sensitivity Substrate Chromogen	DakoCytomation, Glostrup, DK

Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg
Carmin	Sigma, Steinheim
Concentrated (10x) Antigen	
Retrival Citra Plus Solution	Biogenex, Hamburg
DAKO Liquid DAB	
u. Substrate Chromogen System	DakoCytomation, Glostrup, DK
DAKO Fuchsin	
u. Substrate Chromogen System	DakoCytomation, Glostrup, DK
Diethylether	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix (10mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Eosin Y solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Eukitt	Kindler GmbH&Co, Freiburg
Formaldehydlösung	
mind. 37% säurefrei	Merck, Darmstadt
Levamisole	DakoCytomation, Glostrup, DK
Mayers Hämalalaun	Merck, Darmstadt
Methylgrün Standard	Fluka, Neu-Ulm
Methylsalicylat	Merck, Darmstadt
Paraffin Typ 3 u. 6	Richard-Allen Scientific, Kalamazoo MI, USA
Perhydrol™ 30% H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Shandon Hematoxylin	Thermo Electron Corporation
Simple Stain AP (R)	DakoCytomation, Glostrup, DK
N-Histofine™ Simple Stain MAX PO	Nichirei, Tokyo, J
Target Unmasking Fluid (TUF)	PanPath, Amsterdam, NL
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Ultramount	DiaPath, Martinengo, I
Xylol	Merck, Darmstadt
Enzyme:	
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg

Größenstandard:

Gene Ruler™ 1 kb DNA-Leiter Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog Nr.	Herkunft	Verdünnung
R15 α -SDS LT	Deppert & Pates (1979)	-	Kaninchen polyklonal	1:10 000
ER α	Santa Cruz	sc-542	Kaninchen polyklonal	1:50
c-ErbB2	Dako	A0485	Kaninchen polyklonal	1:100
CK6	Covance	14814002	Kaninchen polyklonal	1:300
CK14	Covance	14814701	Kaninchen polyklonal	1:1000
CK18	Progen	61028	Maus monoklonal	1:20
c-Met	Zymed	(X)182257	Kaninchen polyklonal	1:250
Ki67	Dianova	DIA 55067	Kaninchen polyklonal	1:2000
PR	Dako	A0098	Kaninchen polyklonal	1:200
SMA	Dako	M0851	Maus monoklonal	1:40
Vimentin	Hartig & Traub (1997)	-	Ziege polyklonal	1: 1000

Tab. 3.1: **Verwendete Antikörper****3.1.4 Kits**

ApopTag™ Peroxidase In Situ	
Apoptosis Detection Kit S7100	Millipore, Schwalbach
DAKO Envision™	
Doublestain System	DakoCytomation, Glostrup, DK
HISTMOUSE™ MAX	
Broad Spektrum (DAB)	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD RNA PURE solution	Peqlab, Erlangen
Thermoscript™ RT-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe
Turbo DNA-free™	Ambion, Huntington
Vectastain ABC Kit (Rabbit IgG)	Biologo, Kronshagen

3.1.5 Puffer und Lösungen

5 x DNA-Gelladepuffer:	30% Glycerol 0,25% Bromphenolblau
5 x RNA-Gelladepuffer:	50% Glycerol 50% H ₂ O 0,25% Bromphenolblau
	Gebrauchslösung: 3 µl 5 x RNA Gelladepuffer 12 µl Formamid 2 µl RNA
Carnoy Lösung:	600 ml 100% Ethanol 300 ml Chloroform 100 ml Eisessig
Carmin-Färbelösung:	2 g Carmin 5 g Aluminium Potassium Dodecahydrate (Reagent Grade ACS) 1000 ml Aqua dest.
DEPC-H₂O:	0,1% DEPC in H ₂ O _{deion.} über Nacht RT, autoklavieren
Methylengrün-Färbelösung:	2g Methylengrün 200 ml Aqua dest. 25 ml 100% Ethanol
PBS-Puffer:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄

	1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH 8,0
TBE-Puffer:	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA, pH 8,0
Trispuffer:	685 g Tris-HCl 80 g Trizma Base 878 g NaCl ad 5000 ml Aqua dest. Gebrauchslösung: 50 ml Stammlösung ad 1000 ml Aqua dest.
Trispuffer-TritonX:	50 ml Stammlösung Trispuffer 1 ml TritonX ad 1000 ml Aqua dest.
Saures Formalin:	24 ml 37% Formalin, säurefrei 2 ml Eisessig 200 ml Aqua dest.

3.1.6 Primer

Primer	Bp	Orient.	Beschreibung	Sequenz 5'-3'
FKR12	24	⇒	murines <i>p53</i> Exon VI; Pos. 578-601	ggg tgg aag gaa att tgt atc ccg
p53EXI	23	⇐	murines <i>p53</i> Exon XI; Pos. 1164-1142	gtc agg ccc cac ttt ctt gac ca
T4	23	⇒	SV40 Genom; Pos. 4198-4220	gca gac act cta tgc ctg tgt gg
T5	24	⇐	SV40 Genom; Pos. 4936-4959	gct cca aag tca ggt tga tga gca
T7	23	⇐	SV40 Genom; Pos. 4409-4431	cct tgg ggt ctt cta cct ttc tc
T8	25	⇒	SV40 Genom; Pos. 3758-3782	gta ggc tat caa ccc gct ttt tag c
T9	25	⇐	SV40 Genom; Pos. 5140-5116	aag gtc cat tag ctg caa aga ttc c
T10	25	⇐	SV40 Genom; Pos. 4685-4661	gta gtt tgt cca att atg tca cac c

Tab. 3.2: **Verwendete Primer**

3.1.7 Material und Geräte

Analysenwaage PM 460	Mettler, Gießen
Brutschrank Kelvitron t	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Cryogefäße	Nunc, Wiesbaden
Digitalkamera PowerShot G3	Canon GmbH, Krefeld
Eismaschine AF 30	Scotsman, Vernon Hill, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Fast Prep Homogenisator FP120	Qbiogene, Heidelberg
Gefrierschrank -80°C	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Geldokumentation	BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen
Gelkammer Horizon 11.14	Whatman Inc., Dassel
Handschuhe (Latex, Nitril)	Kimberly-Clark, Zaventem, B
Histologiekassetten TissueTek	Sakura, Zouterwoude, NL
Kühlschrank 4-8°C	Liebherr, Biberach
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss, Göttingen
Lysin Matrix D Tubes	Qbiogene, Heidelberg
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Mikrotom HM 350 SV	Mikrom, Walldorf
Mikrowelle Supratronic M754	Miele, Gütersloh
Objektträger Superfrost Plus	Assistant, Sondheim

Paraffingießstation EG 1160	Leica, Solms
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Sektionsbesteck	Waldemar Link GmbH&Co, Hamburg
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Göttingen
Super PAP PEN	Beckman Coulter
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Massachusetts, USA
Vortexer Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Zellstoff Pehazell	Hartmann, Heidenheim
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 4°C 5810 R	Eppendorf, Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1.1 Tierpräparation und Gewebeentnahme

Tierpräparation und Gewebeentnahme wurden entsprechend den vom Heinrich-Pette-Institut eingereichten Tierversuchsanträgen an Tag 5 der Laktation, Tag 30, Tag 60 und Tag 120 *post weaning* (pw) durchgeführt.

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch Diethylether-Inhalation. Nach Eröffnung des Situs wurden makroskopisch sichtbare Veränderungen der Organe und Brustdrüsen beurteilt und dokumentiert. Anschließend wurden Brustdrüsen, Leber, Lunge, Milz, Niere und Uterus entnommen. Die Fixation der Gewebeproben zur Anfertigung von Paraffinschnitten erfolgte in saurem Formalin. Zur Herstellung von *Wholemout*-Präparaten wurden Brustdrüsen im Ganzen nach Entnahme auf einen Objektträger aufgezogen. Gewebe für RNA-Analysen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C asserviert.

3.2.2 Histologische Methoden

3.2.2.1 Gewebefixation und Paraffineinbettung

Alle für die Histologie vorgesehenen Gewebeproben wurden 24 h bei RT in 4 % saurem Formalin auf einem Horizontalschüttler fixiert. Im Anschluß daran wurden die Präparate bis zur Einbettung in Paraffin für unbegrenzte Zeit bei 4 °C in 4 % Formalin aufbewahrt. Zur Einbettung wurden die Gewebe 1-2 h in fließendem Leitungswasser gewässert und anschließend unter Verwendung eines Entwässerungsautomaten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60 %, 70 %, 80 %, 96 %), Methylbenzoat und Toluol entwässert. Die Paraffinierung erfolgte in drei konsekutiven Paraffinbädern bei 60 °C.

An einem Rotationsmikrotom angefertigte Schnitte der Paraffinblöcke wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 50 °C für 24 h gebacken. Die Schnittstärke für histochemische Färbungen betrug 3-5 µm, während Schnitte für immunhistochemische Färbungen 5-10 µm dick waren.

3.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung)

Bei der Hämatoxylin-Eosin Färbung handelt es sich um eine Färbemethode für die morphologische Untersuchung verschiedener Gewebestrukturen in feingeweblichen Schnitten anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen.

Zur Anfertigung der HE Färbung wurden die über Nacht getrockneten Objektträger in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 90 % und 75 % Ethanol) hydriert und kurz in Aqua dest. geschwenkt. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Präparate 1 min in Hämatoxylinlösung gefärbt und 5 min in Leitungswasser „gebläut“. Eine Färbung des Zellzytosols erfolgte nach kurzem Schwenken in Aqua dest. durch Inkubation der Schnitte für 30 sec in 1 % Eosinlösung. Abschließend wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe und eine Xylolinkubation dehydriert und mit Eukitt eingedeckelt.

3.2.2.3 Whole mount Färbung

Whole mount Präparate ermöglichen die submakroskopische Darstellung eines gesamten Organs. Es lassen sich auf diese Weise Schlüsse über die räumliche Ausdehnung

spezifischer Strukturen ziehen.

Während der Entnahme der Gewebeproben wurden Brustdrüsen im Ganzen reseziert, auf Objektträger aufgezogen und kurz bei RT getrocknet. Nach 2-4 h Fixation in Carnoy-Lösung wurden die Präparate 30 min in Aceton inkubiert und anschließend jeweils 25 min in einer absteigenden Alkoholreihe (70 %, 50 % und 30 % Ethanol) hydriert. In destilliertem Wasser wurden die Brustdrüsen 5 min gewässert und bei RT über Nacht in Carmin-Färbelösung gefärbt. Eine Dehydrierung des Gewebes erfolgte durch jeweils 25 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 % und 100 % Ethanol). Nach zwei Xylol-Bädern von jeweils 15 min wurden die Präparate fotodokumentiert und für unbegrenzte Zeit in Methylsalicylat aufbewahrt.

3.2.3 Immunohistochemische Methoden

Das Prinzip immunhistochemischer Methoden beruht auf der Detektion spezifischer Epitope mit Antikörpern. Sind diese selbst mit einem Enzym konjugiert, welches durch eine Farbreaktion die Antigen-Antikörper Komplexe sichtbar macht, spricht man von der direkten Methode. Wird das gesuchte Antigen in einem ersten Schritt mit einem Primärantikörper markiert und anschließend von einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper erkannt, handelt es sich um die sogenannte indirekte Methode.

3.2.3.1 PAP bzw. APAAP-Methode

Die Anwendung der indirekten Methode bietet den Vorteil erhöhter Sensitivität, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können und so zu einer Signalverstärkung führen. Je nachdem mit welchem Enzym der Sekundärantikörper hierbei gekoppelt ist, unterscheidet man die Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) - von der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) - Reaktion.

Um die jeweiligen Zielproteine besser für Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Gewebeschnitte für 45 min in 10 % Citratpuffer in der Mikrowelle gekocht. Bei der Färbung gegen *Smooth Muscle Actin* (SMA) wurden die Schnitte mit einer *Target Unmasking Fluid* (TUF) Lösung vorbehandelt. Nach 20 minütigem Abkühlen wurden die Schnitte dreimal in Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan) Puffer bzw. Tris-TritonX Puf-

fer gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Die CK 6, CK 18 und SMA Färbungen wurden vor der Inkubation mit dem Primärantikörper zur Blockierung unspezifischer Mausantigene mit dem HISTOMOUSE™ MAX Broad Spektrum Kit nach Angaben des Herstellers behandelt. Am Folgetag wurden die Präparate nach mehrmaligem Waschen in Tris Puffer bzw. Tris-TritonX Puffer für 40 min bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Es handelte sich dabei entweder um ein Peroxidase- oder Alkalische-Phosphate-konjugiertes Polymer, welches speziesspezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet war. Nach erneutem Waschen wurden die Gewebeschnitte mit DAB (3,3'- Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) oder Neufuchsin als Chromogen überschichtet und die Färbereaktion nach 5 min bzw. 15 min. in Aqua dest. gestoppt. In Mayers Hämalaunlösung wurden die Schnitte für 5 sec gegengefärbt und für 5 min in Leitungswasser „gebläut“. Mit DAB gefärbte Schnitte wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und abschließend in Eukitt eingedeckelt, während mit AEC gefärbte Schnitte umgehend mit Ultramount fixiert und nach antrocknen mit Eukitt eingedeckelt wurden.

3.2.3.2 (Strept-) Avidin-Biotin-Methode

Bei der ER α -Färbung wurde die Streptavidin-Biotin-Methode angewandt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin für Biotin. Da Streptavidin für Biotin jeweils vier Bindungsstellen besitzt, kommt es zu einer weiteren Signalverstärkung.

In diesem Fall wurde das Rabbit IgG ABC-Kit von Vectastain verwendet. Nach Entparaffinierung der Objektträger in der absteigenden Alkoholreihe wurde die endogene Peroxidase durch Behandlung mit 1 % Wasserstoffperoxid für 30 min geblockt. Die Blockierung unspezifischer Bindungen fand durch Inkubation mit Normalserum aus dem Kaninchen für 20 min bei RT statt. Nach drei Waschschritten in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 min bei RT. Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde nach erneutem Waschen für 30 min bei RT hinzugegeben und anschließend mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex detektiert. Die farbliche Markierung der Antigene erfolgte über DAB, die Gegenfärbung über Mayers Hämalaunlösung.

3.2.3.3 Immunhistochemische Doppelmarkierung

Die immunhistochemische Doppelmarkierung im Falle der Vimentin-LT-Färbung wurde mit dem DAKO Envision™ Doublestain System unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers angefertigt. Dabei wurde die erste immunhistochemische Färbung bis zum Schritt der DAB-Färbung durchgeführt und die zweite Färbung durch Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper daran angeschlossen. Das erste enzymatische Detektionssystem basierte auf Peroxidaseaktivität während bei dem zweiten die Alkalische Phosphatase das Substrat umsetzte. Für die erste IHC wurde der Antikörper und das Substrat mit dem stärkeren Signal verwendet, da ein Auswaschen der ersten Färbung durch die Waschschriffe der zweiten nicht ausgeschlossen werden konnte.

3.2.3.4 ApopTag™ Peroxidase *In Situ* Oligo Ligation (ISOL) Assay

Bei dem ApopTag™ Peroxidase *In Situ* Oligo Ligation (ISOL) Assay handelt es sich um eine Methode zur Detektion apoptotischer Zellen *in situ*, die sich durch eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität auszeichnet.

Während der Apoptose werden DNA-Stränge durch Endonuklasen fragmentiert und es kommt zum Freiwerden von Hydroxylgruppen (3'-OH-Gruppen) an den Bruchenden. Diese 3'-OH-Enden werden von dem Enzym T4 DNA Ligase mit biotinylierten Oligonukleotiden verknüpft. Streptavidin-Peroxidase Konjugate markieren diese Nukleotide und werden durch Substrat-Chromogen Reaktion sichtbar gemacht. Auf diese Weise werden in der Apoptose befindliche Zellkerne spezifisch und sensitiv erkannt.

Für diese Untersuchung wurde das Standard-Protokoll der Firma Millipore aus dem ApopTag™ Peroxidase *In Situ* Oligo Ligation (ISOL) Apoptosis Detection Kit S7100 verwendet. Nach Deparaffinierung der Gewebeschnitte fand die Blockierung der endogenen Peroxidase in 3 % H₂O₂/PBS für 10 min statt. Im Anschluß daran wurden die Schnittpräparate nach mehrmaligem Spülen in Aqua dest. und PBS für 5 min mit Proteinase K für 15 min bei RT vorbehandelt. Die Schnitte wurden bei RT für 1 h mit einem Equilibationspuffer überschichtet. Anschließend wurden die Präparate mit der T4 DNA Ligase und Biotin-konjugierten Oligonukleotiden bei 21 °C für 16 h inkubiert. In diesem Schritt wurden die 3'-OH-Gruppen an den Bruchenden der fragmentierten DNA durch das Enzym mit den Oligonukleotiden verknüpft. Die Detektion der Oligonukleo-

tide erfolgte mit dem Streptavidin-Peroxidase Konjugat, welchem zur Farbentwicklung ein Peroxidasesubstrat hinzugefügt wurde. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Methylengrün. An mehrere Waschschriffe in Aqua dest. und 100 % Butanol schloß sich das Eindeckeln der Gewebe an.

3.2.3.5 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Befundung entstandener Brustdrüsenläsionen fand nach den für dieses Modell festgelegten Diagnosestandards (s. Abschnitt 4.4.4) statt. Zur Analyse der Transgenexpression in der LT-Färbung wurden 1500 Zellen in 5 Feldern pro Objektträger bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Pro Tier wurden dabei jeweils zwei repräsentative Brustdrüsen bewertet. Der Anteil positiver Zellen zur Gesamtzahl ausgezählter Zellen wurde in Prozent angegeben. Die Felder wurden nach Anzahl der meisten LT-positiven Zellen ausgewählt. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen gegen CK6, CK14, CK18, SMA und Vimentin erfolgte mittels eines semiquantitativen Scores von 0 bis 4 unter Berücksichtigung des Anteils positiver Zellen in Prozent.

0 = keine Färbereaktion

1 = < 10 %

2 = 11-50 %

3 = 50-80 %

4 = 80-100 %

Bei der Auswertung der Ki67-, ER- und PR-Färbung wurde zusätzlich die Färbeintensität mit 0=keine Färbung, 1=schwache, 2=mäßige und 3= starke Färbeintensität angegeben. Das Produkt der vergebenen Punkte wurde analog zur humanen Diagnostik im etablierten immuneaktiven (IRS) Score nach Remmele zusammengefasst (Remmele and Stegner, 1987) und ergaben einen Maximalwert von 12 Punkten. Für den Apoptoseindex wurde der Anteil positiver Zellen in Prozent angegeben.

3.2.3.6 Statistische Auswertung

Die Datenaufbereitung und Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2003. Für die Signifikanzbestimmung unabhängiger Vergleichsgruppen bei der linienspezifischen

Entwicklung invasiver Adenokarzinome wurde der χ^2 -Test angewandt. Als signifikant wurden Unterschiede mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ bewertet.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RNA Isolierung aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA wurden 50-100 mg in Stickstoff gefrorenes Gewebe unter Zugabe von 500 μl peq GOLD RNA PURE in Lysin Matrix D Tubes gegeben und mit Hilfe eines Fast Prep Homogenisators homogenisiert. Nach 5 min bei RT wurden 200 μl Chloroform hinzugegeben, die Proben invertiert und nochmals 10 min bei RT belassen. Die Röhrchen wurden anschließend 5 min bei RT zentrifugiert. Die dabei entstehende obere wäßrige Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 μl Isopropanol vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C entstand ein Pellet, welches in zwei Schritten mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und erneut bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Das RNA-Pellet wurde nach Verwerfen des Ethanols bei RT getrocknet und in 35 μl 0,1 % DEPC- H_2O_2 unter Schütteln bei 50°C für 10 min gelöst. Noch vorhandene genomische DNA wurde anhand des TURBO DNA-free™Kits nach Herstellerangaben verdaut.

Vor der weiteren Verwendung der RNA wurde der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren anhand einer gelelektrophoretischen Analyse bestimmt. Der Vorteil gegenüber photometrischer Analysen besteht darin, daß der Degradationszustand der RNA beurteilt werden kann. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurden 2 μl der isolierten RNA mit 10 μl RNA-Ladepuffer bei 70°C für 5 min erhitzt und auf einem 1 % Agarosegel in 0,5x TBE Puffer für 45 min bei 100 V aufgetrennt. Zwei diskrete Banden für die 18 S und 28 S rRNA sprachen für eine intakte Präparation der RNA. Die Konzentration wurde anhand der Intensität der Banden optisch bestimmt.

3.2.4.2 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) lassen sich spezifisch mRNA-Sequenzen in einen komplementäre DNA-Strang (cDNA) umschreiben, um sie anschließend durch Polymerasekettenreaktion zu amplifizieren.

Die RT-PCR fand unter Verwendung des Standardprotokolls des Invitrogen Thermo-script RT Kits statt. Hierbei erfolgte zunächst die cDNA-Erststrangsynthese anhand von Oligo(dT)-Primern. Diese Primer werden in der Regel verwendet, um möglichst selektiv mRNA-Sequenzen in cDNA zu übersetzen, da sie im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisieren. Es wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

1 μ l RNA
1 μ l Oligo-dT Primer
9 μ l DEPC H₂O₂

Der Reaktionsansatz wurde bei 72°C für 10 min inkubiert. Folgende weitere Komponenten wurden anschließend bei 4°C hinzupipettiert:

4 μ l cDNA Synthese Puffer (5x)
2 μ l dNTP Mix (10mM)
1 μ l DTT (0,1M)
1 μ RNase Out
1 μ l ThermoScript RT

Der Ansatz wurde bei 52°C für 50 min inkubiert. Bei 75°C für 15 min wurde die Aktivität der reversen Transkriptase gestoppt. Die Zugänglichkeit der Einzelstrang-cDNA ist für die effektive Amplifikation essentiell. Während der initialen Denaturierung des RNA-cDNA-Hybrids bei der PCR kann das Hybrid häufig nicht vollständig denaturiert werden. Der Einsatz von RNase H als RNA-DNA-Hybrid-abhängige RNase führt erst dann zum Abbau von RNA, wenn cDNA gebildet worden ist, und ermöglicht so eine Sensitivitätssteigerung. Nach Zugabe der RNase H wurde der Reaktionsansatz bei 37°C für 30 min inkubiert.

3.2.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Dabei synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase ausgehend von Oligonukleotid-

Primern, welche den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren einen neuen DNA-Strang. Durch die Wahl gegenläufig orientierter Primerpaare ist es möglich, gezielt DNA-Sequenzen zwischen beiden Primern zu vervielfältigen. Die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte führt zu einer exponentiellen Amplifikation der Matrize. Folgender Reaktionsansatz wurde pipetiert:

1 μ l cDNA
2 μ l dNTP Mix (10 mM)
0,5 μ l DTT (0,1M)
0,5 μ l Primer For/Rev
13,3 μ l DEPC H₂O₂
2 μ l PCR Puffer (1x)
0,2 μ Taq Polymerase

Zu Beginn der PCR-Reaktion wurde die Doppelstrang-DNA bei 94°C denaturiert. An die so aufgeschmolzene Einzelstrang-DNA konnten die Oligonukleotid-Primer bei einer Temperatur von 67°C hybridisieren. Die Amplifikation der DNA-Sequenzen erfolgte bei 72°C mittels Taq-Polymerase. Es handelte sich dabei um eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*, welche die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen erlaubt, ohne bei hohen Temperaturen zu denaturieren. Nach 35 Zyklen wurde die Amplifikation gestoppt. Im Anschluß daran wurde die amplifizierten PCR-Produkte durch Elektrophorese aufgetrennt.

3.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren lassen sich aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphat-Reste in einem elektrischen Feld auftrennen. Native Agarosegele dienen dabei als Matrix. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente ist abhängig von der Agarosekonzentration, der Stromstärke und der Kettenlänge und Faltung der DNA. Zur Analyse wurden die PCR-Produkte mit Gelladepuffer versetzt und auf einem 1 % Agarosegel in TAE Puffer für 40 min bei 125 V aufgetrennt. Durch in dem Agarosegel enthaltenes Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, konnten die getrennten Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Grundcharakterisierung transgener Mauslinien

4.1.1 Etablierung transgener Mauslinien

Das in dieser Arbeit untersuchte transgene Mausmodell wurde im Heinrich-Pette-Institut generiert (Schulze-Garg et al., 2000) und basiert auf einem WAP-Promotor gekoppelten Transgenkonstrukt (Abb. 4.1). Es handelt sich dabei um die frühe Genregion des Simian Virus 40 (SV40). Diese Genregion kodiert für das große T-Antigen (LT), das kleine T-Antigen (st) und das 17kT Protein. Für das LT sind transformierende Eigenschaften nachgewiesen. Durch eine Komplexierung der Tumorsuppressor-Proteine TP53 und pRb kommt es zu einer funktionellen Inaktivierung. Ein Eintritt der Zelle in die S-Phase und eine gesteigerte Proliferationsrate sind die Folge. Durch eine konstitutive Aktivierung des wnt-Signalwegs über eine Inhibition der Phosphataseaktivität des pp2A trägt das st zu der Transformation der Zelle bei (Ali-Seyed et al., 2006; Chen et al., 2004). Die Kopplung des Transgens an den WAP-Promotor sollte zu einer induktionsabhängigen, gewebespezifischen Expression des Transgens nur in den Brustdrüsen und nur nach Stimulation durch laktotrophe Hormone während der Schwangerschaft und der Laktation führen.

Durch Mikroinjektionen des DNA-Konstrukts in murine Oozyten wurden transgene Tiere in Mäusen des C57BL/6 Inzuchtstamms etabliert und anschließend in einen BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt. Der Balb/c Stamm trägt durch eine Prädisposition für Mammarkarzinome zur Tumorentstehung bei (Kuperwasser et al., 2000; Sherr, 2001). Zusätzlich wurden Linien erzeugt, bei welchen ein Nukleoprotein (NP)-Epitop (AS 118-126) des LCM-Virus in das Transgen eingefügt wurde. Die Insertionsstellen wurden hierbei so gewählt, daß keine für die Transformationseffizienz des LT wichtigen Domänen beeinträchtigt wurden. Zur Identifizierung transgener Tiere wurde DNA aus

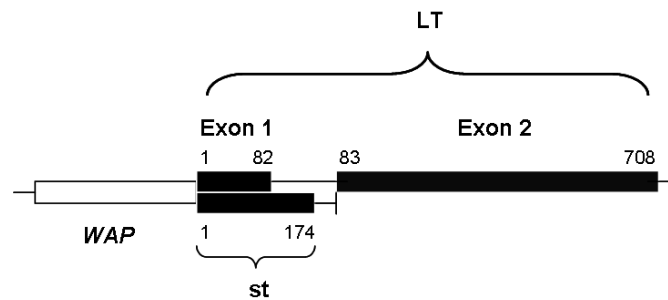


Abb. 4.1: **Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts.** Die frühe Genregion des SV40 steht unter der Kontrolle des exogenen WAP-Promoters. Die frühe Region des Simian virus 40 (SV40) kodiert für das große T-Antigen (LT), das kleine T-Antigen (st) und den 17kT Anteil. LT setzt sich aus zwei Exons zusammen (Erstes Exon: AS 1-82, zweites Exon: AS 83-708), während st von einem für ein 174 AS messendes Protein kodierendes Genfragment gebildet wird. Der 17kT Anteil entsteht durch alternatives Spleißen der st RNA.

Schwanzbiopsien gewonnen und mittels PCR analysiert. Aus 22 generierten Linien wurden zur weiteren Analyse drei Linien ausgewählt. Entsprechend ihrer Transgenexpression zum Zeitpunkt der Laktation handelte es sich dabei um eine niedrig-exprimierende Linie (WAP-T-NP6), eine mäßig-exprimierende Linie (WAP-NP8) sowie eine hoch-exprimierende Linie (WAP-T1).

4.1.2 Analyse der Transgenintegration

Alle Untersuchungen zur Analyse der Transgenintegration wurden von Christina Heinlein durchgeführt und im Rahmen ihrer Promotion bereits veröffentlicht (Heinlein, 2006). Die Stabilität der Transgenintegration wurde über mehrere Generationen hinweg (1999 und 2005) durch Southern Blot Hybridisierung untersucht. Dieses Verfahren ermöglicht neben dem Nachweis des Transgens auch die Detektion einer eventuellen Mehrfachintegration an verschiedenen Positionen des murinen Genoms, die durch unabhängige Weitergabe der einzelnen Integrationsloki zu phänotypischen Inhomogenitäten innerhalb der einzelnen Linien führen kann. Die Größe der so detektierten Fragmente ist unter anderem vom Integrationsort des Transgens abhängig und kann zur Analyse des Integrationsmusters genutzt werden.

Genomische DNA wurde isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *KpnI* geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiven, transgenspezifischen Sonde, welche die gesamte frühe Genregion des SV40 überspannte. Das WAP-T-Plasmid diente als Positivkontrolle und wurde mit *KpnI* geschnitten. Die Autoradiogramme (s. Abb.4.2) zeigen, daß die Linie WAP-T1 drei Integrationsorte sowie mehrere direkt hintereinander folgende Transgenintegrationen (4,3 kBp) besitzt. Diese Transgenintegration blieb über den analysierten Zeitraum von sechs Jahren konstant. Bei der Linie WAP-T-NP8 konnte ein partieller Transgenverlust nachgewiesen werden: während einige Tiere drei Integrationsorte aufwiesen, konnten bei anderen nur zwei Integrationsorte neben direkten Wiederholungen gesehen werden. Allerdings hatte der Transgenverlust keinen Einfluß auf die Expressionsstärke. Die Linie WAP-T-NP6 zeigte einen Integrationsort sowie direkte Wiederholungen des Transgens. Der Integrationsort blieb über die untersuchten Generationen unverändert. In Balb/c Tieren waren keine Signale erkennbar, was einer fehlenden Transgenintegration entsprach.

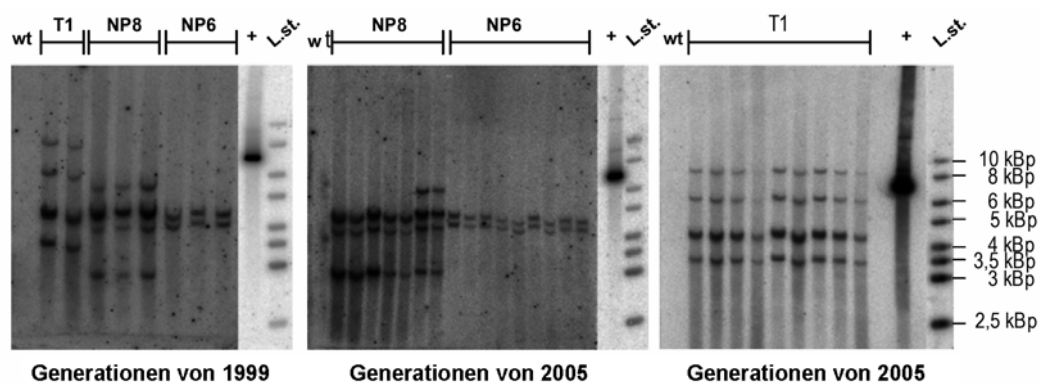


Abb. 4.2: **Southern Blot Analyse der Transgenintegration.** Die Analyse der Transgenintegration wurde über einen Zeitraum von sechs Jahren durchgeführt (1999-2005). Die Autoradiogramme zeigen ein 4,3 kBp großes Fragment, welches die direkt hintereinander integrierten Transgene anzeigt. Zusätzliche Banden stellen mehrere integrationsabhängige T-Ag Fragmente dar. Als Positivkontrolle diente WAP-T-DNA (7,1 kBp); 1 kb Längenstandard (L.st.).

Mit dieser Methode konnte die Anwesenheit des Transgens über einen Zeitraum von sechs Jahren in allen zur weiteren Analyse verwendeten Linien nachgewiesen werden. Die am stärksten exprimierende Linie WAP-T1 wies die meisten Integrationsorte auf,

während die am schwächsten exprimierende Linie WAP-T-NP6 nur einen Integrationsort zeigte. Weiterhin konnten, trotz eines fehlenden Referenzsignals deutliche Unterschiede in der Bandenintensität zwischen WAP-T1 und WAP-T-NP6 beobachtet werden.

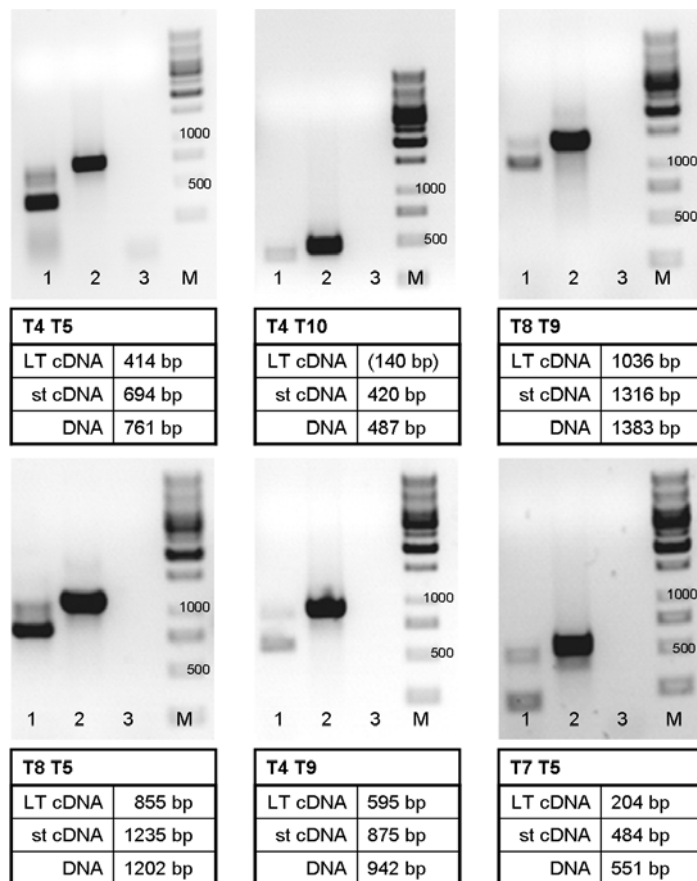


Abb. 4.3: **PCR-Optimierung.** Sechs Primerkombinationen wurden analysiert. Die unterschiedlichen PCR-Produkte für LT, st und genomische DNA sind angegeben. Positivkontrolle (1), genomische DNA (2) und Negativkontrolle (3); 1 kb Längenstandard (M).

4.1.3 Nachweis der Transgentranskription

Der Nachweis des Transgens auf RNA-Ebene wurde im Vorfeld optimiert, um eine spezifische Erfassung des Transgens zu gewährleisten. Im Anschluß an die Reverse Transkription wurde die PCR hierzu mit unterschiedlichen Primerpaaren und Paarkombina-

tionen durchgeführt. Alle Primer überspannten Intronbereiche der frühen SV40 Genregion, um eine Unterscheidung der PCR-Produkte von Verunreinigungen durch genomische DNA zu gewährleisten. Abb. 4.3 zeigt die jeweiligen Primerkombinationen mit entsprechenden PCR-Produkten. Als Positivkontrolle wurde cDNA einer bereits analysierten, bi-transgenen Maus der Linie WAP-T1-H22 eingesetzt. Nach Durchführung der PCR-Optimierung wurde die Primerkombination T4/T5 für weitere Analysen ausgewählt. Bei dieser Kombination war ein eindeutiger Nachweis der einzelnen Komponenten bei relativ kleiner Fragmentgröße (LT: 414 bp, st: 694 bp) gewährleistet.

4.2 Linienspezifische Entwicklung invasiver Adenokarzinome der Brustdrüse

Tiere der Linien WAP-T1, WAP-T-NP8 und WAP-T-NP6 wurden hinsichtlich der Entwicklung von Adenokarzinomen der Brustdrüsen nach einmaliger Induktion im Rahmen einer Langzeitstudie untersucht. Um einen direkten Vergleich zu gewährleisten, wurden in dieser Studie nur Tiere analysiert, die in der achten Woche verpaart wurden und deren erster Wurf, und damit die Induktion des Transgens zwischen der 11. und 16. Woche erfolgte. Nicht-transgene Balb/c-Mäuse dienten als Kontrolltiere. Als Endzeitpunkt wurde die Detektion palpabler Tumore oder ein sehr schlechter Allgemeinzustand der Tiere gewählt. Bei unauffälligem Befund wurden die Tiere im Alter von 19 (+/- 3) Monaten präpariert. Die Brustdrüsen wurden sowohl makroskopisch als auch nach weiterer Aufarbeitung histopathologisch beurteilt.

68 der untersuchten 71 Tiere der Linien WAP-T-NP8 (96 %) und 39 von 42 Tieren der Linie WAP-T1 (93 %) entwickelten nach einmaliger Verpaarung invasive Adenokarzinome der Brustdrüsen. Im Gegensatz dazu wurden bei nur 7 von 26 Tieren der Linie WAP-T-NP6 (27 %) invasive Mammakarzinome detektiert. Alle Adenokarzinome wiesen nach einer immunhistochemischer Markierung eine ausgeprägte LT-Expression auf. Eines der 23 Balb/c-Kontrolltiere (4 %) erkrankte an einem spontanen, transgenunabhängigen Brustdrüsentumor. Die Inzidenz der induzierten Adenokarzinome war demnach bei den Linien WAP-T-NP8 und WAP-T1 mit 96 % bzw. 93 % vergleichbar, während Tiere der Linien WAP-T-NP6 weit seltener Adenokarzinome der Brustdrüsen entwickelten. Insgesamt unterschied sich die Erkrankungshäufigkeit der Linien WAP-T1 und WAP-T-

NP8 ($p < 0.001$) sowie der Linie WAP-T-NP6 ($p < 0.05$) damit signifikant von der Inzidenz spontaner, d.h. nicht transgen-induzierter Tumore der Balb/c Wildtypiere.

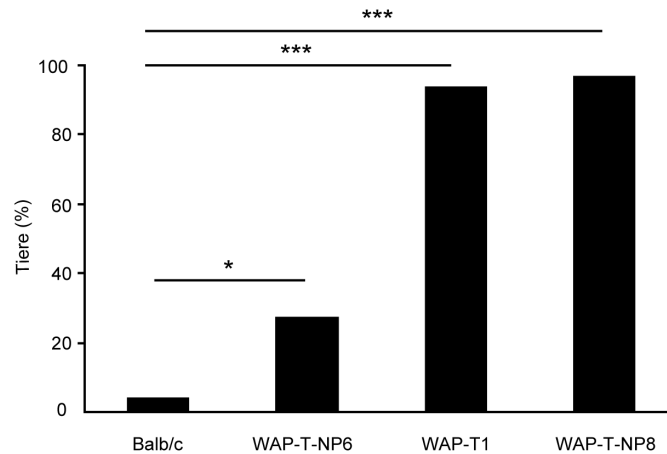


Abb. 4.4: **Linien-spezifische Entwicklung invasiver Adenokarzinome der Brustdrüse.** Tiere der Linie WAP-T1 und WAP-T-NP8 entwickelten mit 93 % bzw. 96 % signifikant häufiger invasive Adenokarzinome ($p < 0.001$) als Balb/c Kontrollmäuse, die in nur 4 % an einem sporadischen, transgenunabhängigem Adenokarzinom erkrankten. Mäuse der Linie WAP-T-NP6 wiesen mit einer Tumorentstehung in nur 27 % der Fälle ebenfalls eine signifikante Erkrankungshäufigkeit auf ($p < 0.05$).

Der Einfluß der unterschiedlich hohen LT-Expression auf die Latenzzeit bis zur Entwicklung invasiver Adenokarzinome wurde anhand von Überlebenszeitkurven untersucht. Dabei stellte sich die Frage, ob Mäuse der „hoch-exprimierenden“ Linie WAP-T1 zu einem früheren Zeitpunkt Adenokarzinome entwickelten als Tiere der übrigen Linien bzw. ob die „niedrig-exprimierende“ Linie WAP-T-NP6 eine längere Latenzzeit bis zum Auftreten invasiver Adenokarzinome aufwies. Nur die Präparation aufgrund eines detektierten Adenokarzinoms wurde als Ereignis gewertet. Die Latenzzeit von der Induktion des Transgens bis zum Auftreten der Karzinome erwies sich als linienspezifisch. Während Tiere der Linie WAP-T-NP8 nach einer mittleren Latenzzeit von 9 Monaten ein invasives Adenokarzinom der Brustdrüse entwickelten, erkrankten Tiere der Linie WAP-T1 durchschnittlich bereits einen Monat früher. WAP-T-NP6 Mäuse wiesen mit einer mittleren Latenzzeit von 16 Monaten bis zum Auftreten von Mammakarzinomen eine mit Balb/c Kontrolltieren (18 Monate) vergleichbare Dauer auf (s. Abb. 4.5).

Linie	Induktion	Anzahl Tiere (n)	Tiere mit invas. Adenokarzinom	mittl. Latenzzeit (Monate)
WAP-T1	0	6	0	-
WAP-T-NP8	0	19	2	12
WAP-T-NP6	0	27	0	-
WAP-T1	1	42	39	8
WAP-T-NP8	1	71	68	9
WAP-T-NP6	1	26	7	16
Balb/c	1	23	1	18

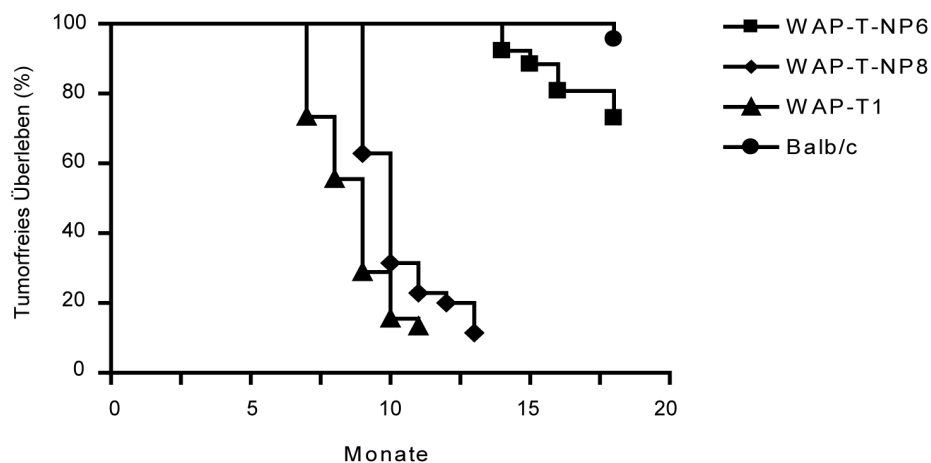


Abb. 4.5: **Latenzzeit bis zum Auftreten invasiver Adenokarzinome der Brustdrüse nach einmaliger Induktion.** Während Mäuse der Linie WAP-T-NP8 nach einer mittleren Latenzzeit von 9 Monaten ein invasives Adenokarzinom der Brustdrüse entwickelten, erkrankten Tiere der Linie WAP-T1 durchschnittlich einen Monat früher. Mit einer Latenzzeit von 16 Monaten wiesen WAP-T-NP6 Mäuse eine der Kontrollgruppe (18 Monate) vergleichbare Dauer auf.

In einer weiteren Langzeitstudie wurden unverpaarte Tiere der Linien WAP-T1, WAP-T-NP8 und WAP-T-NP6 sowie Balb/c Kontrolltiere untersucht. Als Endzeitpunkt wurde auch hier die Detektion palpabler Tumore oder ein sehr schlechter Allgemeinzustand der Tiere gewählt. Während bei keinem der untersuchten Tiere der Linien WAP-T1 (n=6) und WAP-T-NP6 (n=27) Adenokarzinome detektiert werden konnten, entwickelten zwei Mäuse der Linie WAP-T-NP8 (n=19) im Alter von 12 Monaten Tumore. Alle Karzinome wiesen nach immunhistochemischer Markierung eine ausgeprägte LT-Positivität

auf. Keines der untersuchten 30 Balb/c Wildtypiere erkrankte an einem Adenokarzinom.

4.3 Analyse der Transgentranskription und -expression in WAP-T-transgenen Mauslinien

Um eine Erklärung für die unterschiedliche Inzidenz und Latenzzeit invasiver Adenokarzinome zu finden, war eine genaue Analyse der Transgenexpression grundlegend. Von besonderem Interesse war hierbei neben dem Nachweis der Gewebespezifität, der Nachweis der Induktionsabhängigkeit der Transgenexpression. Weiterhin stellte sich die Frage, ob es nach Ende der Laktation aufgrund ausbleibender Stimulation des WAP-Promoters durch laktotrophe Hormone tatsächlich zur Beendigung der Transgenexpression kommt. Der weitere Expressionsverlauf nach Abschluß der Laktation und bis zur Entstehung erster Adenokarzinome wurde anhand einer Zeitpunktstudie an Tag 30, 60 und 120 nach Absetzen der Jungtiere (*post weaning*, pw) durchgeführt. Für jedes Entwicklungsstadium einschließlich dem der Laktation wurden mindestens fünf Tieren der Linien WAP-T-NP6, WAP-T-NP8 und WAP-T1 histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Die RT-PCR basierten Transkriptionsanalysen wurden mit jeweils drei Tieren der transgenen Mauslinien durchgeführt.

4.3.1 Gewebespezifität der Transgentranskription und -expression

Die Untersuchung der gewebespezifischen Transgentranskription wurde am fünften Tag der Laktation, und damit zum Zeitpunkt ausgeprägter Transgenexpression durchgeführt. Je Tier wurde RNA aus dem Brustdrüsengewebe zweier thorakaler und einer abdominalen Mamma sowie aus Leber, Milz, Lungen, Nieren und Uterus isoliert. Nach reverser Transkription erfolgte die Analyse der cDNA mittels PCR unter Verwendung der Primer T4 und T5. Diese amplifizierten wie beschrieben ein spezifisches LT-Fragment von 414 bp sowie ein 694 bp großes st-Fragment. Zur Kontrolle der reversen Transkription wurde ein Fragment des ubiquitär exprimierten murinen *p53* amplifiziert.

Abbildung 4.6 zeigt, daß in Tieren aller drei Linien Transkripte ausschließlich im Brustdrüsengewebe der thorakalen und abdominalen Mammae nachgewiesen werden konn-

ten. Da es sich bei der RT-PCR um eine semiquantitative Methode handelt, konnte darüber hinaus eine geringere Transkription in den Brustdrüsen der Linie WAP-T-NP6 verglichen mit Tieren der Linien WAP-T-1 und WAP-T-NP8 aufgrund verminderter Bandenintensität angenommen werden. Die Transgenexpression auf Proteinebene wurde

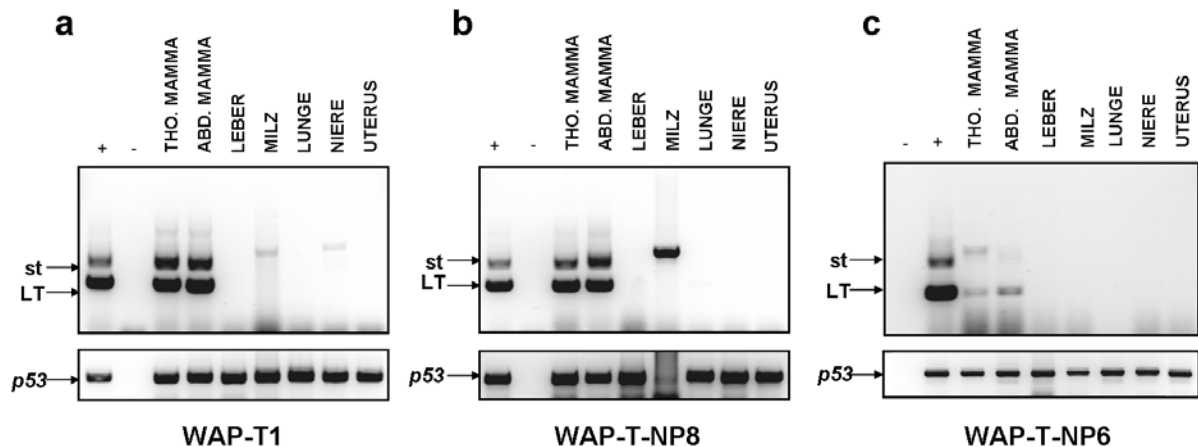


Abb. 4.6: **Gewebespezifische Transgentranskription.** Bei Tieren der Linien WAP-T-1 (a), WAP-T-NP8 (b) und WAP-T-NP6 (c) ließ sich das Transgen am fünften Tag der Laktation mittels semiquantitativer RT-PCR ausschließlich in thorakalen und abdominalen Brustdrüsen nachweisen. Als Kontrolle der reversen Transkription wurde ein Fragment des ubiquitär exprimierten, murinen *p53* amplifiziert.

anhand immunhistochemischer Färbungen beurteilt. Zum Zeitpunkt der Laktation wurden je Tier eine zervikale, zwei thorakale, eine abdominale und eine inguinale Mamma untersucht. Zudem wurden Färbungen des Leber-, Milz-, Lungen-, Nieren- und Uterusgewebes durchgeführt. Bis auf einzelne Brustdrüsen der Linie WAP-T-NP6 wiesen alle untersuchten Mammae LT-positive Epithelzellen auf. Die Anzahl positiver Zellen zeigte hierbei eine linienspezifische Verteilung (s. Abschnitt 4.3.3). In einem Fall konnte eine fokale Positivität im Speicheldrüsengewebe einer nahe der zervikalen Brustdrüse miterfassten Glandula sublingualis nachgewiesen werden. Diese war mit keinen morphologischen Veränderungen assoziiert. Alle übrigen Organe stellten sich in der LT-Färbung negativ dar. Entsprechend der Ergebnisse der RT-PCR und der immunhistochemischen Analyse handelte es sich demnach um eine nahezu ausschließlich gewebespezifische

Transkription und Translation des Transgens.

4.3.2 Induktionsabhängigkeit der Transgentranskription und -expression

Um eine Transgenexpression nur nach Induktion durch Laktation zu gewährleisten, wurde die frühe Region des SV40 Gens an den WAP-Promotor gekoppelt. Da der WAP-Promoter allerdings nicht ausschließlich der Kontrolle laktotropher Hormone untersteht, sondern in seltenen Fällen auch durch Insulin oder gonadotrope Hormone während des Östrus aktiviert werden kann, wurden nicht-induzierte Tiere hinsichtlich einer möglichen Transgenexpression untersucht. Alle unverpaarten Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 60 Tage alt und die Entwicklung des Brustdrüsengewebes somit abgeschlossen. Es wurden jeweils zwei Brustdrüsen von fünf Tiere der Linien WAP-T-NP6, WAP-T-NP8 und WAP-T1 immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich wurde bei jeweils drei Tieren der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP6 bzw. zwei Tieren der Linie WAP-T-NP8 eine RT-PCR der thorakalen und abdominalen Brustdrüsen durchgeführt, um auch kleinste Transgenexpressionen möglichst sensitiv zu erfassen.

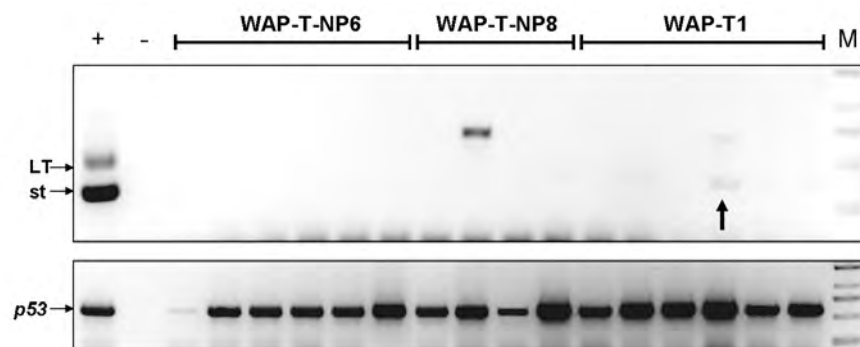


Abb. 4.7: **Semquantitative RT-PCR der Brustdrüsengewebe nulliparer Tiere.** In einer Brustdrüse eines Tieres der Linie WAP-T1 konnten geringe Mengen des Transgentranskripts mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Pfeil).

Immunhistochemisch fand sich in jeweils einer Brustdrüse zweier WAP-T-NP8 Tiere eine LT-Expression. Eines der beiden Tiere hatte zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits ein *in situ* Karzinom entwickelt. Bei dem zweiten waren nur einzelne, mit Wahrung der azinären Strukturen in Clustern gelagerte Zellen betroffen. In der RT-PCR konnte in einer der insgesamt 16 untersuchten Brustdrüsen geringe Mengen des Transgens

nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um ein Tier der Linie WAP-T1. Sowohl in der immunhistochemischen Analyse als auch in der weit sensitiveren RT-PCR konnten demnach einzelne LT-positive Brustdrüsen detektiert werden. Zusammenfassend handelte es sich allerdings bei nur zwei von 30 immunhistochemisch untersuchten Brustdrüsen (7 %) bzw. einer von 18 mittels RT-PCR analysierten Mammae (6 %) um seltene Fälle induktionsunabhängiger Transgenexpression aufgrund Östrusbeeinflusster Promoteraktivierung.

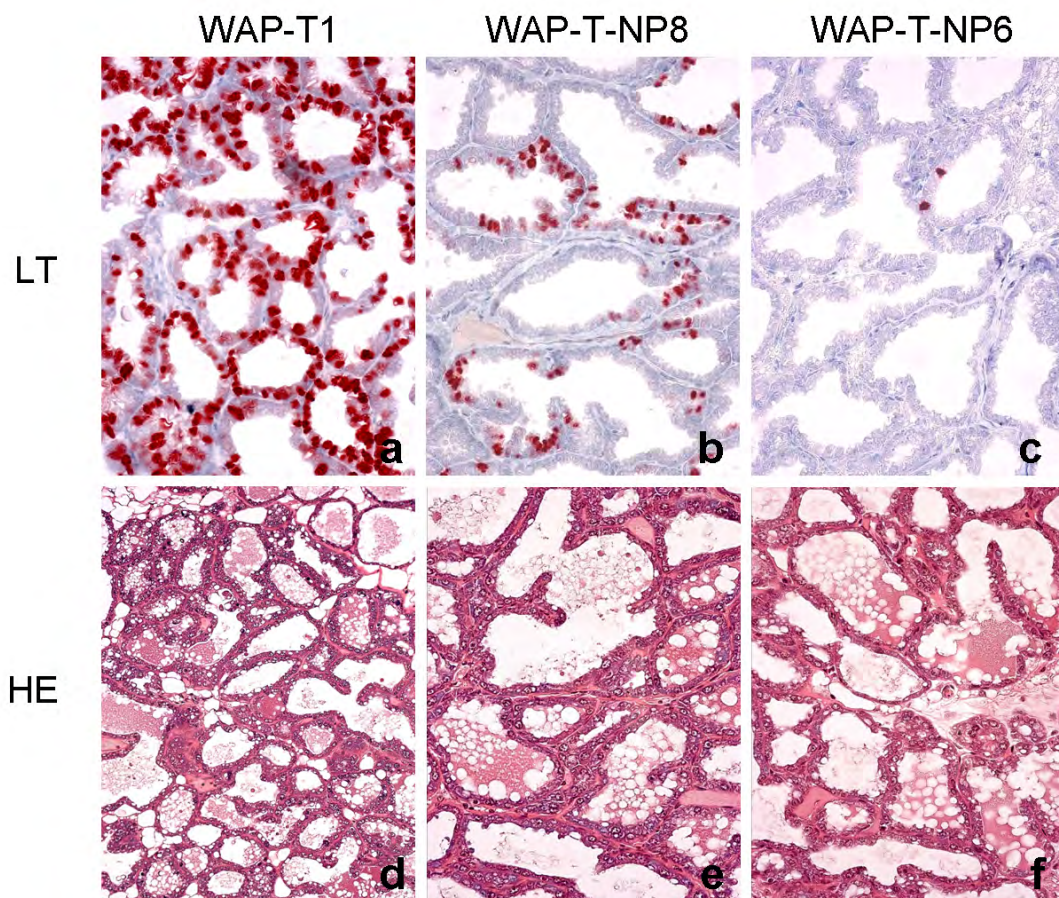


Abb. 4.8: **LT-Expression am 5. Tag der Laktation.** Linienspezifische LT-Expression zum Zeitpunkt der Promoteraktivierung durch laktotrophe Hormone. WAP-T1 wies eine globale Transgenexpression auf (a), während in Tieren der Linien WAP-T-NP8 und WAP-T-NP6 ein multifokales (b) bzw. mono- bis paucifokales (c) Expressionsmuster beobachtet wurde. HE Färbung (d-f)

4.3.3 Transgenexpression während der Laktation

Die Aktivierung des endogenen WAP-Promoters ist ab dem 15. Tag der Schwangerschaft nachweisbar (Pittius et al., 1988) und erreicht mit der Laktation ihren Höhepunkt. Analog ist zu diesem Zeitpunkt die Expressionsstärke des an den exogenen WAP-Promoter gekoppelten Transgens sehr hoch. Eine Quantifizierung der linienspezifisch unterschiedlichen Transgenexpression wurde mittels immunhistochemischer LT-Färbung durchgeführt. Hierbei wurden jeweils zwei repräsentative Brustdrüsen pro Tier ausgewertet. Bei den untersuchten Mauslinien war ein streng linienspezifisches Expressionsmuster zu beobachten (s. Abb. 4.8). Tiere der Linie WAP-T1 wiesen zum Zeitpunkt der Laktation die höchste Transgenexpression auf. 89 % aller Epithelzellen zeigten eine starke Expression für LT. Das Expressionsmuster erwies sich als global im Gegensatz zu der Verteilung LT-positiver Zellen in Mäusen der Linien WAP-T-NP8. Bei diesen Tieren exprimierten 46 % aller epithelialen Zellen das Transgen und wiesen dabei ein multifokales Expressionsmuster auf. LT-positive Zellen traten gruppiert auf und stets waren mehrere Zellen desselben Läppches betroffen. In Brustdrüsengewebe der Linie WAP-T-NP6 exprimierten insgesamt nur 3 % aller Epithelzellen LT, drei der untersuchten 10 Brustdrüsen erwiesen sich als vollständig negativ. Allerdings fiel gerade bei dieser geringen Anzahl die gruppierte Konfiguration positiver Zellen ins Auge. Es handelte sich um ein mono- bzw. paucifokales Expressionsmuster. In allen Linien fand die Transgenexpression vorwiegend in alveolären Epithelzellen und nur zu einem geringeren Anteil in duktalem Epithelzellen statt.

4.3.4 Transgenexpression nach abgeschlossener Involution

Wie in der Analyse der Induktionsabhängigkeit der Transgenexpression nachgewiesen (s. Abschnitt 4.3.2), war die Transgenexpression bis auf wenige Ausnahmefälle auf die Stimulation des exogenen, transgengekoppelten WAP-Promoters durch laktotrophe Hormone angewiesen. Erwartungsgemäß würde diese Annahme eine Beendigung der Transgenexpression nach der Phase der Laktation bedeuten. Allerdings zeigten alle transgeninduzierten invasiven Mammakarzinome nach immunhistochemischer Analyse eine ausgeprägte LT-Expression. Es stellte sich demnach die Frage, ob es in invasiven Mammakarzinomen aufgrund der Zelltransformation und unbekannter *Re-*

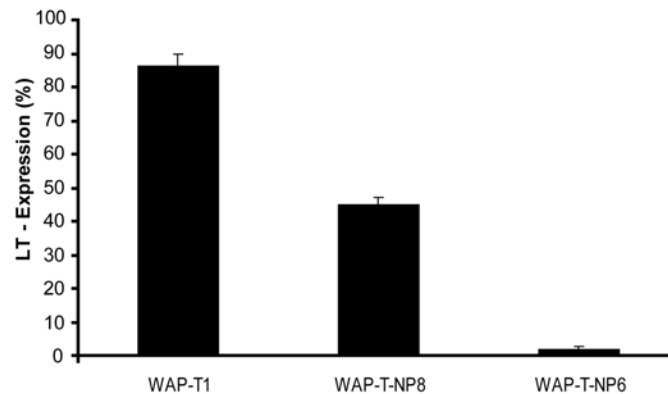


Abb. 4.9: **LT-Expression am 5. Tag der Laktation.** 89 % bzw. 46 % aller Epithelzellen transgener Tiere der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 wiesen eine LT-Expression auf. Im Gegensatz dazu exprimierten nur 3 % der Epithelzellen in Brustdrüsen WAP-T-NP6 transgener Mäuse das Transgen.

modelling-Prozesse zu einer *de novo* Synthese des Transgens kommt oder ob, trotz fehlender Stimulation durch laktotrophe Hormone der WAP-Promoter konstitutiv aktiviert ist. Es wurde hierzu eine Zeitstudie an drei Zeitpunkten nach abgeschlossener Involution durchgeführt. Die Transgenexpression wurde anhand immunhistochemischer LT-Färbungen untersucht und wie zum Zeitpunkt der Laktation quantifiziert.

4.3.4.1 WAP-T1 und WAP-T-NP8

Tiere der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 wiesen bezüglich der Transgenexpression nach abgeschlossener Involution auffällige Übereinstimmungen auf. Bei Tieren beider Linien fanden sich an Tag 30 pw und damit nach Abschluß der Involution im Vergleich zur Laktation eine reduzierte Anzahl LT-positiver Zellen (s. Abb. 4.11). Man sah jedoch weiterhin in allen untersuchten Brustdrüsen einzelne lobulo-alveoläre (LA)-Einheiten mit starker LT-Expression. Bei der Linie WAP-T1 machten diese Foki durchschnittlich 48 %, bei der Linie WAP-T-NP8 35 % aller verbliebenen Epithelzellen aus. Transgenexprimierenden Azini bestanden wie ihr LT-negatives Pendant aus bis zu fünf Epithelzellen und fanden sich zum großen Teil wie zum Zeitpunkt der Laktation in Clustern. Dazwischen liegende LT-negative Zellen fehlten jetzt allerdings vollständig.

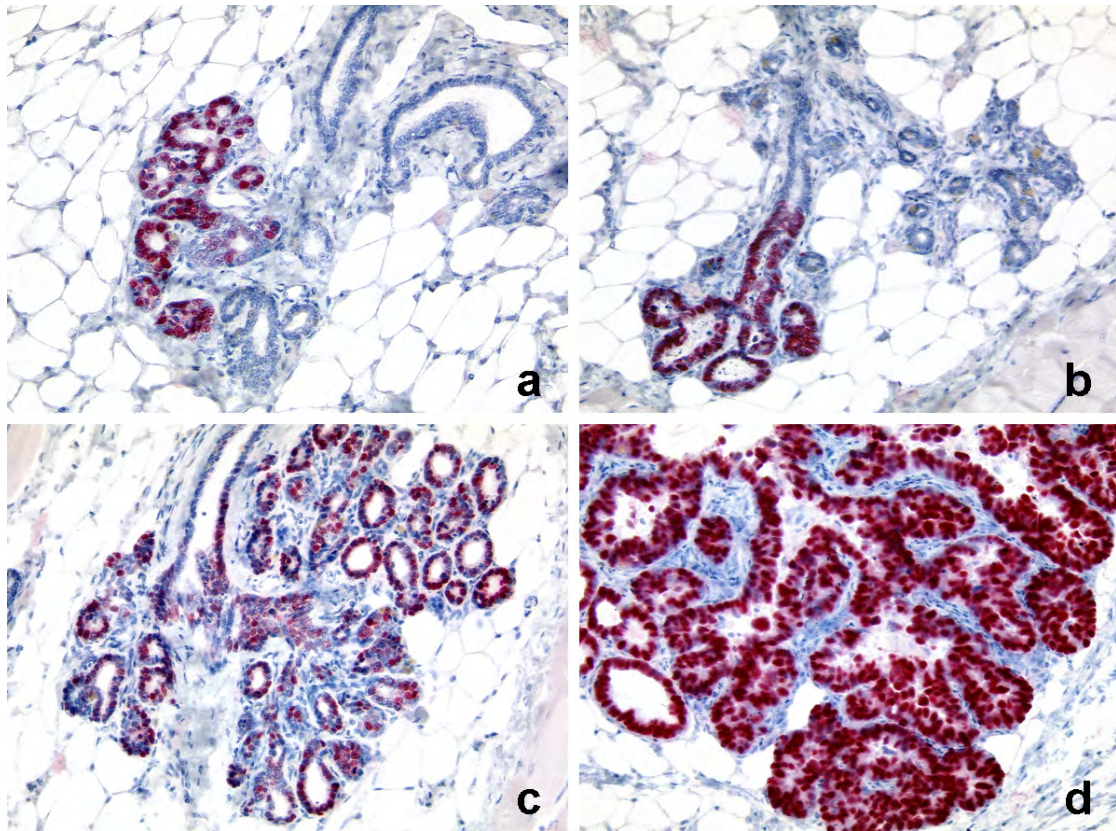


Abb. 4.10: Proliferation LT-positiver Drüsenendstücke in Form funktioneller Einheiten. Die Zellproliferate ahmen das Wachstumsmuster unauffälliger LA-Einheiten nach und breiten sich kontinuierlich von peripheren, lobulären Epithelzellen ausgehend auf zentralere Duktabschnitte aus (a-c). Erst später bewirkt der anhaltende Wachstumsdruck eine Protrusion der Zellen in das Lumen (d).

30 Tage später hatten sich diese transgenexprimierenden Einheiten vergrößert, während ihre Anzahl weitestgehend gleich geblieben war. Die Anzahl LT-positiver Zellen stieg auf 66 % in WAP-T1 bzw. 37 % in WAP-T-NP8 Tieren. Ferner war zu beobachten, daß die Zellproliferate sich kontinuierlich von peripheren, lobulären Epithelzellen ausgehend auf zentralere Duktabschnitte ausbreiteten und dabei das Wachstumsmuster unauffälliger LA-Einheiten nachahmten (s. Abb. 4.10). Die offensichtlich klonale Expansion führte zur Auskleidung ganzer Drüsenendstücke durch LT-exprimierende Epithelzellen unter Beibehaltung der morphologisch vorgegebenen Strukturen. Bei anhalten-

dem Proliferationsdruck füllten die Zellen nach und nach die Lumina der LA-Einheiten aus. Am 120. Tag nach Absetzen der Jungtiere hatten die LT-positiven Zellen sich soweit vermehrt, daß sie schließlich 77 % aller Epithelzellen in Tieren der Linie WAP-T1 und 76 % in Tieren der Linie WAP-T-NP8 darstellten. Während bei der Linie WAP-T1 nach abgeschlossener Involution ein steter Anstieg LT-positiver Zellen zu verzeichnen war, blieb die Anzahl Transgen-exprimierender Zellen in Tieren der Linie WAP-T-NP8 bis zum 60. Tag pw relativ konstant. Zwischen Tag 60 pw und Tag 120 pw kam es zu einer ausgeprägten Proliferation LT-positiver Epithelzellen, so daß gegen Ende der Zeitstudie in Brustdrüsen WAP-T1 und WAP-T-NP8-transgener Mäuse nahezu gleich viele LT-positive Epithelzellen gefunden werden konnten. Dabei ging das Wachstum von umschriebenen Arealen etwa gleichbleibender Anzahl aus. Die Herde positiver Zellen vermehrten sich erst im späteren Verlauf. Zusätzlich war 120 Tage pw die Aufhebung vorgegebener lobulo-alveolärer Strukturen und somit struktureller Integrität zu erkennen.

4.3.4.2 WAP-T-NP6

Für Tiere der Linie WAP-T-NP6 ergab sich nach der Laktation ein völlig anderes Bild. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt fanden sich nur in jeweils einem von fünf untersuchten Tieren (25 %) LT-positive LA-Einheiten. Diese Azini wiesen eine ähnliche Architektur wie bei WAP-T1- und WAP-T-NP8-Mäusen auf. Auch kam es im Verlauf zu einer Proliferation der einzelnen Herde. Allerdings erreichte der Anteil der LT-positiven Epithelzellen aufgrund der wenigen betroffenen Azini im Verhältnis nur 4 % (Tag 30 pw), 10 % (Tag 60 pw) und 7 % (Tag 120 pw). Fraglich war demnach ob tatsächlich nur einzelne Tiere eine LT-Expression aufwiesen oder aber die LT-Expression der übrigen LT-negativen Tiere lediglich unterhalb der immunhistochemischen Detektionsgrenze lag.

Transgennachweis auf RNA-Ebene bei Tieren der Linie WAP-T-NP6 Jeweils zwei Brustdrüsen von fünf Tieren an Tag 30 pw und vier Tieren an Tag 60 pw wurden mittels RT-PCR auf eine Transgenexpression nach abgeschlossener Involution untersucht. Diese Methode bot neben erhöhter Sensitivität den Vorteil, daß eine Transkription des Transgens auch bei eventuell fehlerhafter Translation überprüft werden konnte. Das Ergebnis der RT-PCR bestätigte die immunhistochemischen Beobachtungen. Bei nur

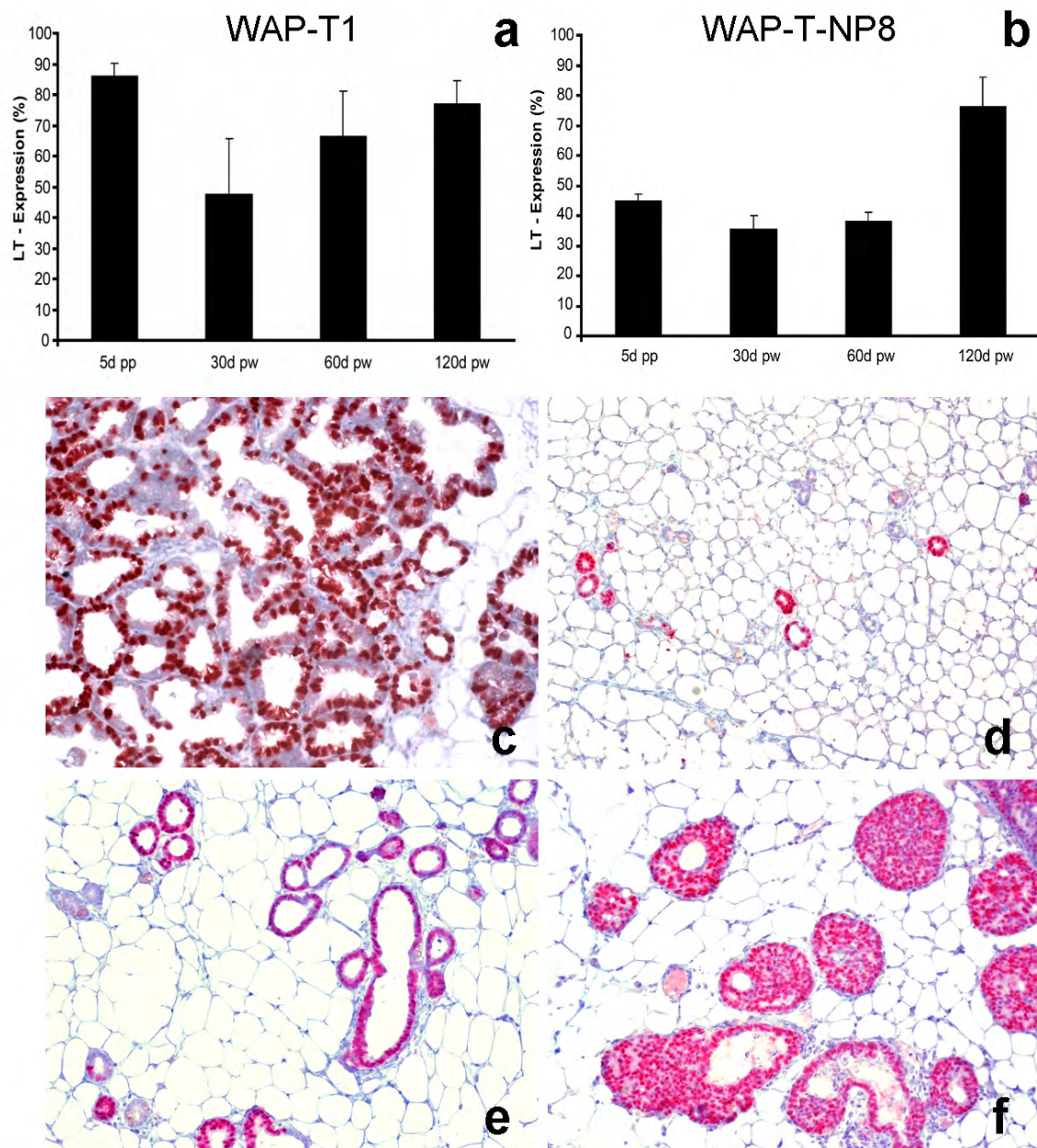


Abb. 4.11: Verlauf der LT-Expression in WAP-T1 und WAP-T-NP8 Tieren. Steter Anstieg LT-positiver Zellen bei der Linie WAP-T1 nach abgeschlossener Involution (a), während die Anzahl transgenexprimierender Zellen bei WAP-T-NP8 bis 60 Tage pw relativ konstant blieb und anschließend stark proliferierte (b). LT-Expression in Tieren der Linie WAP-T1 zur Zeit der Laktation (c), 30 Tage pw (d), 60 Tage pw (e) und 120 Tage pw (f).

einem Tier an Tag 30 pw der insgesamt neun untersuchten Tiere konnten geringe Mengen des Transgentranskripts nachgewiesen werden. Die übrigen Tiere wiesen keine Transgentranskription auf.

Zusammenfassend konnte in einer Zeitstudie bei Tieren der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 auch nach abgeschlossener Involution LT-positive Foki detektiert werden. Diese exprimierten im Verlauf nicht nur weiterhin das Transgen, sondern proliferierten, so daß gegen Ende der Zeitstudie sich die Anzahl positiver Zellen trotz fehlender Stimulation des WAP-Promoters durch laktotrophe Hormone vervielfacht hatte. Zusätzlich kam es zu einer Ausbreitung der Zellen über die Anzahl der anfänglich umschriebenen Herde hinaus. Diese Ausbreitung fand zum großen Teil unter Wahrung der azinären Architektur statt. Gegen Ende der Zeitstudie wiesen allerdings einige Areale strukturüberschreitendes Wachstum auf. Im Gegensatz dazu konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten in nur 25 % der WAPT-NP6 Tiere eine fokal begrenzte LT-Positivität nachgewiesen werden. Die LT-positiven Zellen proliferierten nur geringfügig und unter Beibehaltung der azinären Strukturen. Eine RT-PCR basierte Untersuchung bestätigte eine fehlende Transgentranskription in den Brustdrüsen der übrigen WAP-T-NP6 Mäuse.

4.4 Analyse der Brustdrüsenmorphologie WAP-T-transgener Mauslinien

Wie in Abschnitt 4.3.2 gezeigt, exprimierten alle WAP-T-transgenen Tiere die frühe Region des SV40 Gens nach Induktion durch Laktation in epithelialen Zellen des Brustdrüsegewebes. Um auch früheste morphologische Veränderungen als Folge der Transgenexpression zu erfassen, wurde die Brustdrüsenmorphologie vom nulliparen Stadium bis zum Auftreten erster invasiver Adenokarzinome nach Induktion analysiert. Die Beurteilung der groben Organarchitektur erfolgte hierbei mit Hilfe von *Wholemout*-Präparaten, während die feingewebliche Untersuchungen mittels HE-gefärbter Gewebsschnitte durchgeführt wurde. Für jedes Entwicklungsstadium wurden mindestens fünf Tiere untersucht.

4.4.1 Nullipares Stadium

Die Analyse der Brustdrüsenmorphologie wurde bei 30 und 60 Tage alten, nulliparen Balb/c-Kontrolltieren und 60 Tage alten, nulliparen WAP-T-transgenen Tieren durchgeführt. Das Brustdrüsengewebe transgener Tiere aller Linien zeigte hierbei im Vergleich zu den Kontrolltieren eine dem Entwicklungsstadium entsprechende, regelrechte Differenzierung. Mit Ausnahme eines WAP-T-NP8 Tieres, welches bereits nach 60 Tagen ein *in situ* Karzinom entwickelt hatte, konnten weder auf submakroskopischer Ebene noch mikroskopisch pathologische Veränderungen gesehen werden.

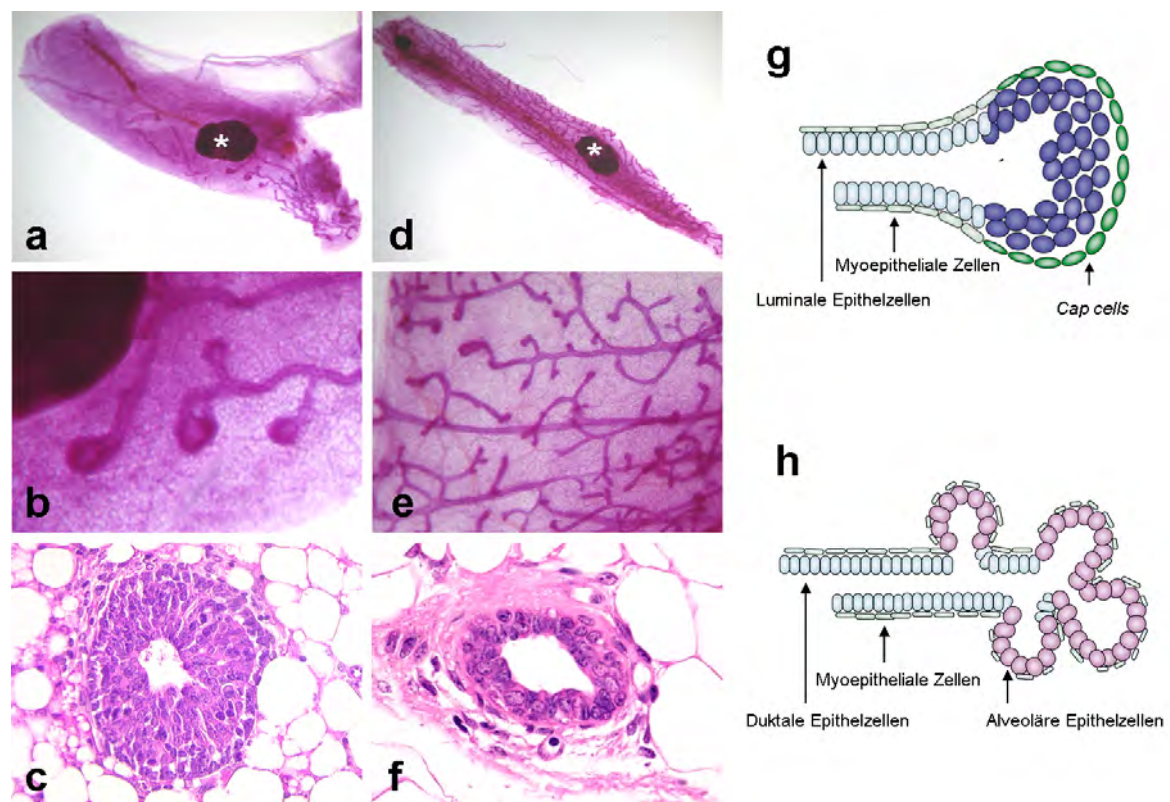


Abb. 4.12: **Brustdrüsenmorphologie nulliparer Tiere.** *Wholemout*-Präparat einer 30 Tage alten, nulliparen Balb/c-Maus mit rudimentärem Duktsystem (a). An distalen Enden primärer Dükte (b) finden sich TEBs mit mehrschichtigem Epithel (c). 60 Tage alte, nullipare WAP-T-NP8 Maus mit ausgereiftem Duktsystem (d+e) und Alveolarknospen mit einschichtigem Epithel und umgebenden Myoepithelien (f). Lymphknoten (Stern). Schematische Darstellung der TEBs (g) und Alveolarknospen (h), modifiziert nach Woodward et al., 2005.

Bei Mäusen im Alter von 30 Tagen bestehen die Brustdrüsen zu einem großen Teil aus univakuolärem Fettgewebe. In diesem Fettkörper war bei Balb/c Tieren ein rudimentäres Duktsystem bestehend aus unverzweigten Milchgängen erkennbar. An den distalen Enden der primären Dukte fanden sich terminale Knospen, die sog. *Terminal End Buds* (TEBs). Mikroskopisch bestanden diese aus multiplen, epithelialen Zellschichten (s. Abb. 4.12). Die Zellen der äußeren Zellschicht (*Cap cells*) besitzen Stammzellcharakter und differenzieren im weiteren Verlauf zu einschichtigem Epithel und umgebenden Myoepithel. Im Alter von acht Wochen hatte das Milchgangsystem in Brustdrüsen transgener Weibchen und in Kontrolltieren die Grenzen des Drüsenkörpers erreicht. Die Dukte hatten sich in sekundäre und tertiäre Gangstrukturen aufgezweigt und füllten den gesamten Fettkörper aus. Das Milchgangsepithel war einschichtig und zeigte keine atypischen Veränderungen. Die terminalen Endknospen hatten sich vollständig zurückgebildet. Stattdessen fanden sich an den distalen Enden terminaler Dukte rudimentäre Alveolen mit einschichtigem Epithel umgeben von myoepithelialen Zellen und einer Basalmembran. Zwischen transgenen Tieren und Kontrollweibchen bestanden keine Unterschiede im Grad der Milchgangverzweigungen und der Ausbildung alveolärer Knospen. Der Anteil des Brustdrüsenepithel war in beiden Gruppen ebenfalls vergleichbar.

4.4.2 Laktation

Während der 19-21 Tage dauernden Schwangerschaft differenzieren die alveolären Knospen zu reifen Alveolen. Unter dem Einfluß von Progesteron kommt es initial zu einer ausgeprägten Proliferation der alveolären Knospen. Das Verhältnis epithelialer Zellen zu Adipozyten verschiebt sich zugunsten des Drüsenkörpers. Innerhalb der zweiten Schwangerschaftshälfte, der sogenannten lobulo-alveolären Phase, differenzieren die alveolären Knospen zu reifen Alveolen. Erst kurz vor der Geburt der Jungtiere beginnt innerhalb der alveolären Epithelzellen die Milchsynthese. Nach der Geburt der Jungtiere beginnt die Laktationsphase.

In der *Wholemout*-Präparation stellten sich die Brustdrüsen an Tag 5 *post partum* (pp) als dichtes Organ dar, in dem eine detaillierte Beurteilung einzelner Strukturen kaum noch möglich war. Erkennbar waren in allen untersuchten Brustdrüsen stark erweiterte und aufgrund intraluminaler Milchsekretion hyperdens erscheinende Alveolen.

Abbildung 4.13 gibt einen Überblick über die Morphologie der Brustdrüse in transgenen WAP-T-NP8 Mäusen sowie Kontrolltieren an Tag fünf pp. Übersicht und Detailansicht des Brustdrüsengewebes zeigen einen identischen Proliferationsgrad der alveolären Knospen.

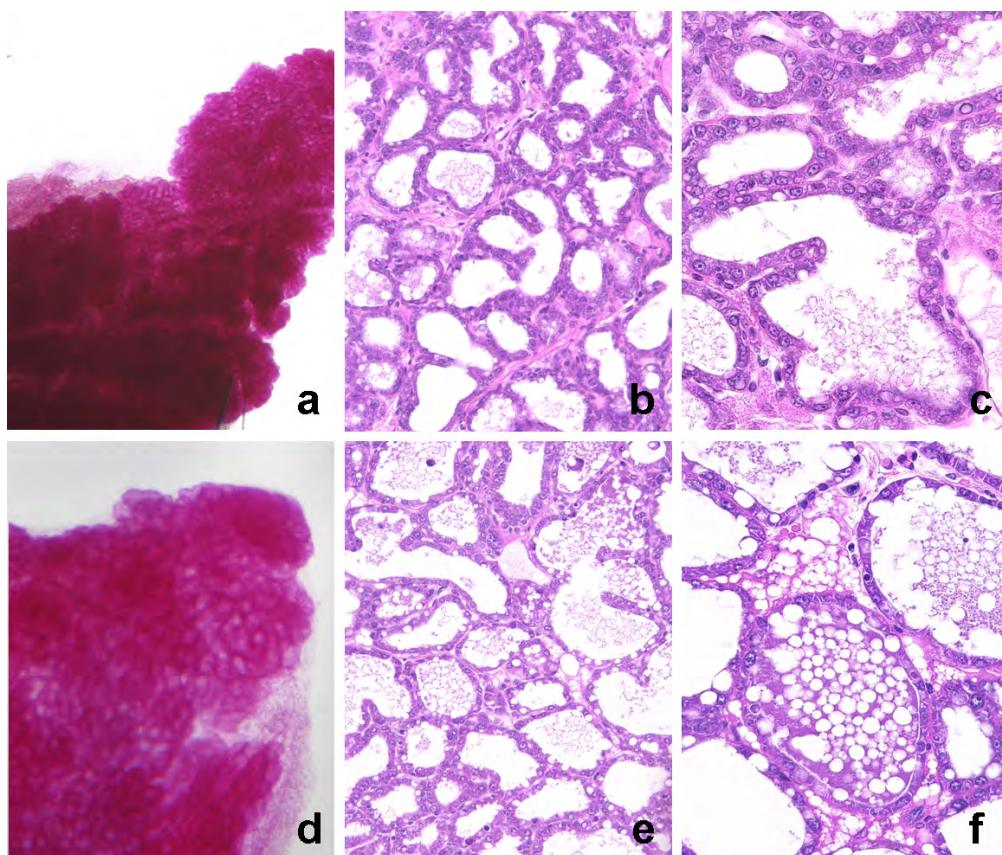


Abb. 4.13: **Brustdrüsenmorphologie lactierender Tiere.** Submakroskopische und mikroskopische Darstellung lactierender Brustdrüsen mit regelhaft erweiterten und aufgrund intraluminaler Milchsekretion hyperdens erscheinenden Alveolen in Balb/c-Kontrolltieren (a-c) und WAP-T-NP8 (d-f).

Eine detaillierte Analyse der Zellmorphologie in HE gefärbten Schnittpräparaten zeigte sowohl in transgenen Tieren als auch in Kontrollmäusen eine relative Zunahme des epithelialen Kompartiments mit regelrecht konfigurierten lobuloalveoläre Strukturen. Die Mammaepithelzellen hatten als Zeichen der zunehmenden Differenzierung mit der Li-

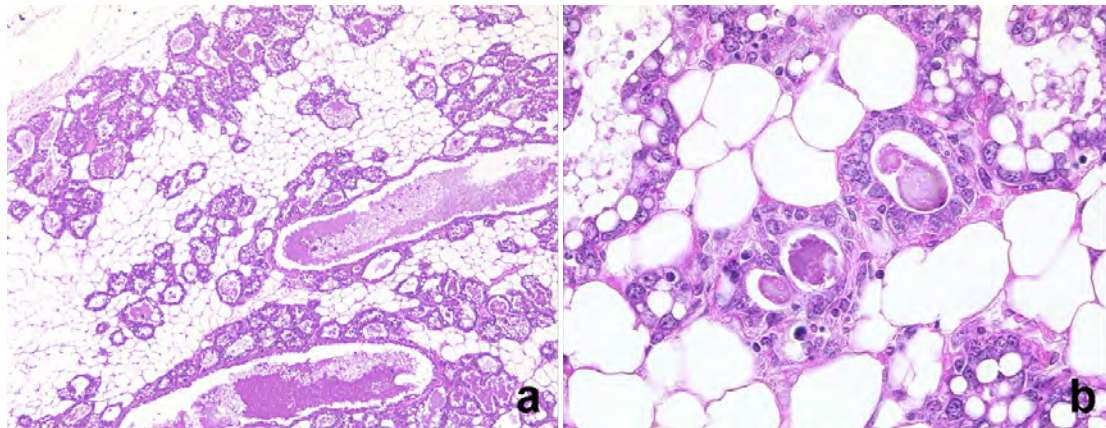


Abb. 4.14: **WAP-T1 an Tag 5 post partum.** Spärlich entwickeltes Laktationsgewebe in einzelnen Brustdrüsen WAP-T1-transgener Mäuse sowie im Gegenzug dazu einen erhöhten Adipozytenanteil (a). Vereinzelt Herde mit intraluminal akkumuliertem, eosinophilem und lamellär konfiguriertem Sekret und starr erscheinenden Azini (b).

pidsynthese begonnen und wiesen in ihren Zytoplasma große lipidhaltiger Vesikel auf. Weitestgehend unterschieden sich Anzahl, Größe und Verteilung dieser Vesikel zwischen transgenen Tieren und Kontrolltieren nicht. Allerdings zeigten einzelne Tiere der Linie WAP-T1 im Gegensatz zu den anderen transgenen Linien in wenigen Brustdrüsen spärlich entwickeltes Laktationsgewebe sowie im Gegenzug dazu einen erhöhten Adipozytenanteil (s. Abb. 4.14). Ferner ließen sich vereinzelt Herde mit intraluminal akkumuliertem, eosinophilem und lamellär konfiguriertem Sekret beobachten. Diese LA-Einheiten fielen zudem durch ihre dicht gedrängten Epithelzellen und dadurch „starr“ erscheinenden Azini auf. Zusammenfassend ergab die morphologische Analyse der Linien WAP-T-NP6 und WAP-T-NP8 damit keinen Hinweis auf einen Entwicklungsdefekt der Brustdrüse zum Zeitpunkt der Laktation während einzelne Tiere der Linie WAP-T1 beginnende dysplastische Veränderungen erkennen ließen.

4.4.3 Nach abgeschlossener Involution

Nach Abschluß der Laktation kommt es während der Involution durch massive Apoptose der alveolären Epithelzellen zur Zerstörung lobulo-alveolärer Strukturen. Im Gegenzug expandieren die verbliebenen Adipozyten und das umgebende Bindegewebe.

Durch diesen lipomatösen und bindegewebigen Umbau der Brustdrüse wird im Laufe der etwa 21 Tage dauernden Involution ein Zustand erreicht, der morphologisch der postpubertären virginen Brustdrüse ähnelt.

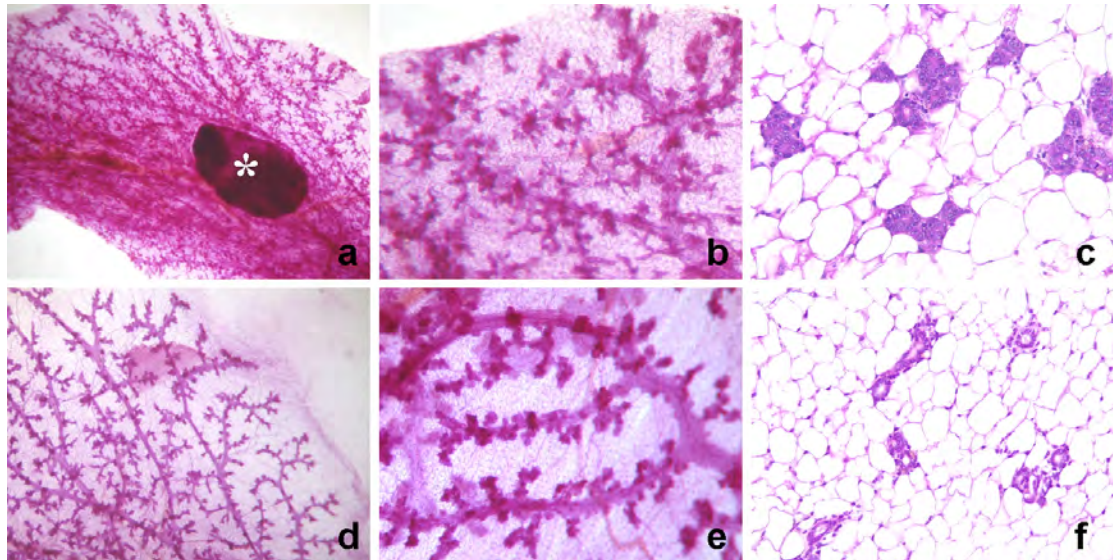


Abb. 4.15: **Brustdrüsenmorphologie nach abgeschlossener Involution.** Submakroskopische und mikroskopische Darstellung unauffälliger, ruhender Brustdrüsen nach abgeschlossener Involution in Balb/c-Kontrolltieren 60 Tage pw (a-c) und WAP-T-NP6 Mäusen 120 Tage pw (d-f). Lymphknoten (Stern).

Kontrolltiere und WAP-T-NP6 Mäuse wiesen vergleichbare Bilder nach abgeschlossener Involution auf. Bereits an Tag 30 pw bestand das Brustdrüsengewebe überwiegend aus reifzelligem Fettgewebe. Die LA-Einheiten ähnelten stark dem postpubertären Entwicklungsstand mit nur wenig verbliebenen Alveolen (s. Abb. 4.15). Im weiteren Verlauf schien es bei einigen Tieren bis zum 120. Tag pw trotz bereits abgeschlossener Involution zu einer weiteren Reduzierung der Alveolen zu kommen. Dieses Bild zeigte sich sowohl in Balb/c als auch in WAP-T-NP6 Mäusen. Lediglich in jeweils einem von fünf zu jedem Zeitpunkt eingesetzten WAP-T-NP6 Tieren (25 %) konnten monofokale, minimale noduläre LA-Veränderungen detektiert werden. Bei histologischer Begutachtung wiesen diese Herde dilatierte Azini mit einschichtigem Epithel und intraluminalen Sekretakkumulationen, ähnlich den bei WAP-T1 zum Zeitpunkt der Laktation beschriebenen Foki, auf. Stets waren maximal fünf Azini einer LA-Einheit betroffen.

Im Gegensatz dazu waren bei Tieren der Linie WAP-T-NP8 und WAP-T1 bereits submakroskopisch 30 Tage pw deutliche Veränderungen erkennbar. Im Bereich der distalen LA-Einheiten fanden sich vermehrt noduläre Auftreibungen, während die zuführenden, terminalen Duktuli sich als partiell ektatisch mit Wandverdickungen darstellten (s. Abb. 4.16). Histologisch handelte es sich auch hier um dilatierte Alveoli mit einreihiger, hypertropher Epithelauskleidung und gefüllt mit eosinophilem Sekret. Zusätzlich fanden sich allerdings Areale mit beginnender Mehrreihigkeit der epithelialen Auskleidung. Submakroskopisch wirkten diese Bereiche weit gewebstdichter als die umgebenden Strukturen (s. Abb. 4.16, d-e). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal stellte das Verteilungsmuster der beschriebenen Läsionen dar. Während WAP-T-NP6 Tiere in nur 25 % monofokale Veränderungen mit Beteiligung nur weniger LA-Einheiten aufwiesen, fanden sich diese bei Tieren der Linien WAP-T-NP8 und WAP-T1 mit multifokalem bzw. globalem Verteilungsmuster.

Zum Zeitpunkt 60 Tage pw konnten die beschriebenen submakroskopisch dichter erscheinenden Läsionen vermehrt in Brustdrüsen der WAP-T-NP8 Tiere bzw. überwiegend bei Tieren der Linie WAP-T1 detektiert werden. Histologisch waren die Azini nun fokal vollständig ausgefüllt von intraduktalen, atypischen Epithelproliferaten mit ausgeprägter Kernpleomorphie und zahlreichen atypischen Mitosen. Es fanden sich neben soliden, kribriformen und *clinging*-artigen Wachstumsmustern seltener auch papilläre Formationen. Die Läsionen selbst waren von größerer Ausdehnung und teils unter Einbezug gesamter Drüsenläppchen, immer jedoch scharf von dem umgebenden Gewebe abgrenzbar. Ein Tier der Linie WAP-T1 wies zwei invasive, tubuopapillär wachsende Tumore der cervikalen und thorakalen Brustdrüse auf.

120 Tage pw waren bei zwei WAP-T1 Mäusen und vier WAP-T-NP8 Tieren bereits nach Eröffnung des Situs makroskopisch maximal bis zu 1,4 cm messende Tumore erkennbar. Die beiden WAP-T1 Tiere waren an jeweils drei bzw. vier malignen Tumoren unterschiedlichster histologischer Differenzierung erkrankt. Ungeachtet ihres Wachstumsmusters wiesen die Tumorzellen eine deutliche Pleomorphie der Zellkerne und massiv vermehrte atypische Mitosen auf. Ein ausgeprägt schlecht differenziertes Karzinom zeigte fokal eine beginnende Angioinvasion. Bei den Tumoren der erkrankten WAP-T-NP8 Mäuse handelte es sich um zwei solitäre gut bis mäßig differenzierte Tumore. Zwei Tiere wiesen zwei bzw. drei gut bis mäßig differenzierte Tumore mit überwiegend tubulopapillärem Wachstumsmuster auf.

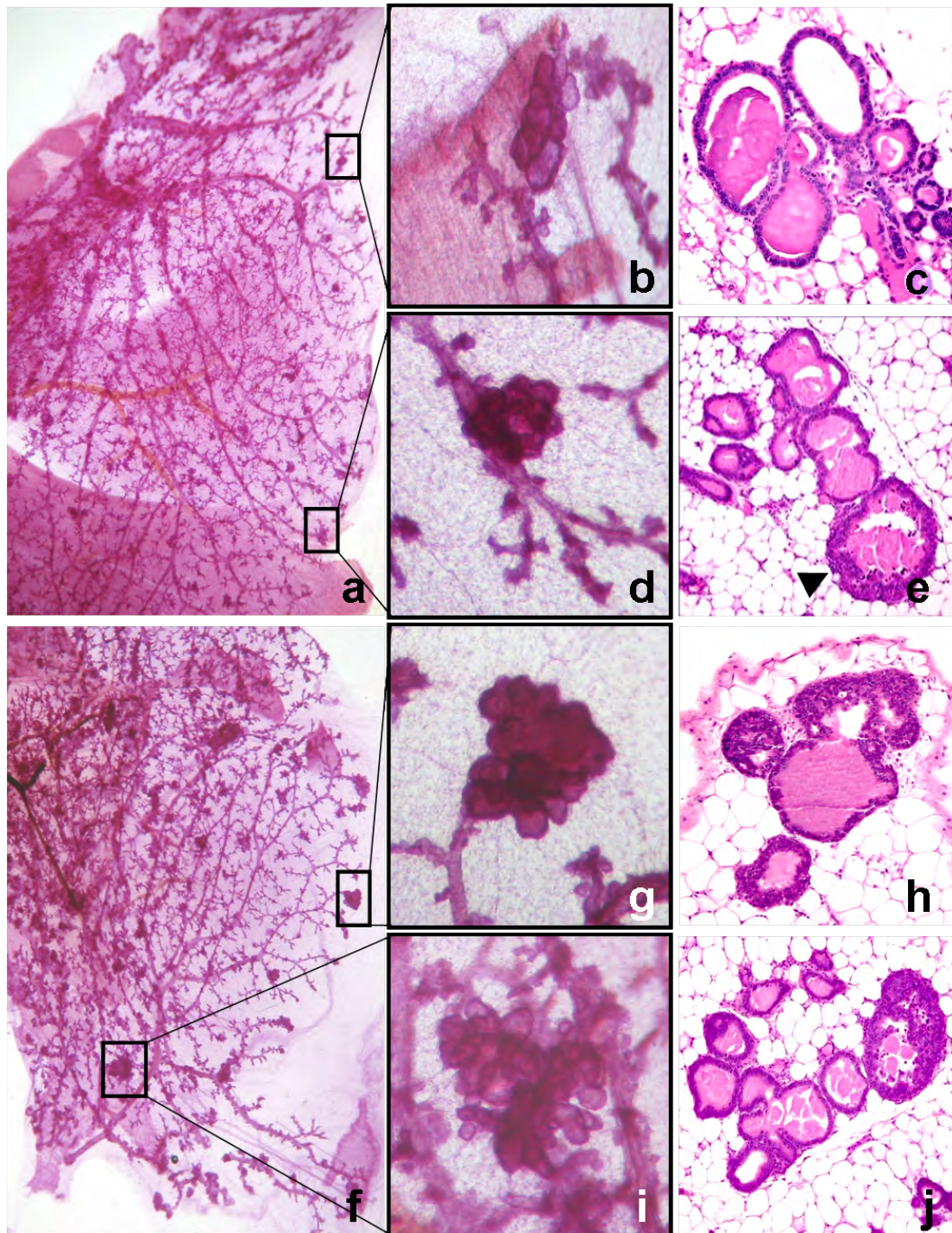


Abb. 4.16: **Neoplasien der Brustdrüse in Tieren der Linien WAP-T1 30 und 60 Tage pw.** Noduläre Verdichtungen distaler LA-Einheiten 30 Tage pw (a ,b ,d). Nach histologischer Aufarbeitung wiesen dieselben Herde dilatierte Alveoli mit intraluminalem, pathologischem Sekret auf (c, e). Fokal zeigte sich eine beginnende Mehrreihigkeit des Epithels (e, Pfeilspitze). 60 Tage pw erschienen die nodulären Auftreibungen größer und verdichtet (f, g, i). In der Histologie der entsprechenden Läsionen fanden sich atypische intraduktale Epithelzellproliferate (j).

4.4.4 Histopathologische Klassifikation muriner Neoplasien der Brustdrüse

Die nach abgeschlossener Involution entstehenden Läsionen wurden entsprechend den Vorschlägen des *Annapolis pathology panels*, einer Initiativgruppe des *National Institute of Health* (NIH) beurteilt (Cardiff et al., 2000). Es handelt sich dabei um eine alternative, rein morphologisch-deskriptive Klassifikation zur Beurteilung entstehender Brustdrüsenläsionen in transgenen Mausmodellen. Präinvasive Läsionen wurden unter der Kategorie *Mammary Intraepithelial Neoplasia* (MIN) zusammengefaßt. MINs sind definiert als unmittelbare Vorläuferläsionen invasiver Karzinome mit strikten morphologischen Kriterien, einschließlich nukleärer Atypien.

Duktale Dysplasie Bereits früheste Läsionen wiesen aufgrund LT-abhängiger Transformation Kernatypien auf. Diese fanden sich im Bereich distaler Endstücke der LA-Einheiten. Histologisch waren dilatierte, vermutlich durch lateralen Wachstumsdruck „starr“ erscheinende Azini zu erkennen. Sie waren aus hypertrophem, einreihigem Epithel aufgebaut und enthielten verglichen mit unauffälligen LA-Einheiten bereits eine 2-3fach erhöhte Anzahl von Epithelzellen. Die Kerne selbst zeigten trotz regelmäßiger, basaler Position eine mäßige Hyperchromasie. Vermehrt fanden sich atypische Mitosen. Intraluminal konnte immer wieder eine stark eosinophile Sekretretention gesehen werden. Während diese Läsionen noch als *low grade* Dysplasien zu beschreiben sind, zeigten sich an Tag 60 pw in WAP-T1 und WAP-T-NP8 Tieren überwiegend Läsionen im Sinne einer *high grade* Dysplasie mit ein- bis mehrreihigem Epithel und hoch pleomorphen oval bis länglichen und hochgestellten Kernen. Diese Läsionen wiesen deutlich erkennbare Nukleoli, granuliertes randständiges Chromatin und eine erhöhte Mitoserate auf. Ferner war nun eine deutliche intraluminale Sekretakkumulation nachweisbar. In Randbereichen der Läsionen fanden sich lymphoplasmazelluläre Infiltrate sowie eine Vermehrung des umgebenden Stromas.

Carcinoma *In situ* (CIS) Mit fortschreitender Proliferation traten neoplastisch veränderte Azini mit kribriformem, solidem, mikropapillärem oder überwiegend *clinging*-artigem Wachstumsmuster auf. Die Architektur der LA-Einheiten blieb jedoch stets erhalten. Ein Großteil der Herde wies gemischte Wachstumsmuster auf. Eine deutliche

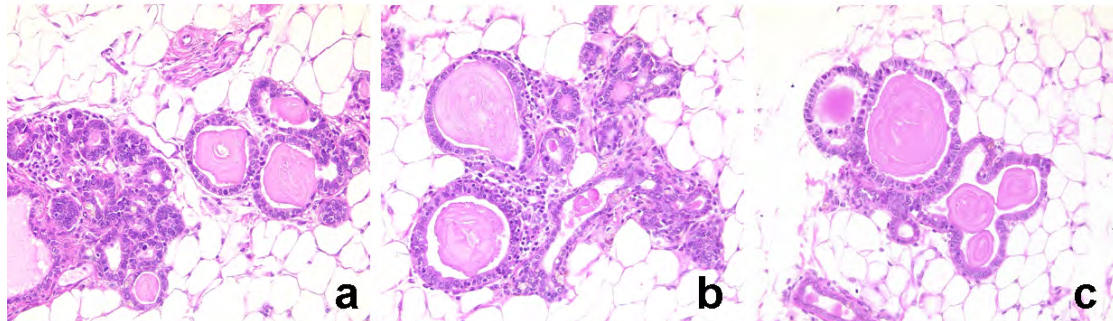
Vermehrung der Epithelzellen sowie der abnormen Drüsenazini war zu erkennen. Dabei war die topografische Verteilung ähnlich der LT-Expression zum Zeitpunkt der Laktation linienspezifisch. Während bei Tieren der Linie WAP-T1 atypische Epithelproliferate häufig den gesamten Drüsenbaum, im Sinne einer Läppchenkanzerisierung involvierten, herrschte bei Tieren der Linie WAP-T-NP8 ein multifokales Geschehen vor. Bei Tieren der Linie WAP-T-NP6 waren mono- bis paucifokale umschriebene Läsionen sichtbar. Innerhalb des vermehrten, dichten intra- und perilobulären Stromas fanden sich teils dichte lymphoplasmazellulären Infiltraten sowie Gefäßneubildungen im Sinne einer tumorassoziierten Neoangiogenese.

Minimal invasive Karzinome Minimal invasive Karzinome konnten in diesem Mausmodell nur anhand vereinzelt liegender Epithelzellen ohne Bezug zu Drüsenstrukturen befunden werden. Eine gut sichtbare Basalmembran schien im Verlauf der Entstehung von *low* und *high grade* Dysplasien verloren zu gehen (s. Abschnitt 4.6.4).

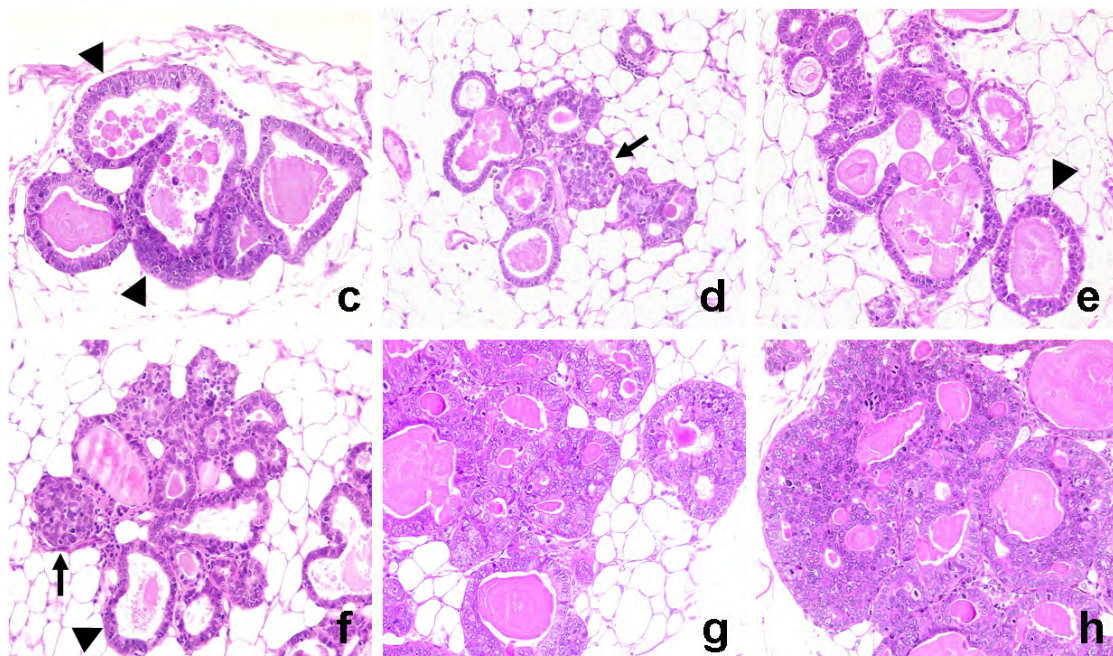
Invasives Adenokarzinom (IAC) Erste invasive Tumore traten in Tieren der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 bereits zwischen dem 60. und dem 120. Tag *pw* auf. Es konnten gut differenzierte IACs mit tubulären, papillären, tubulo-papillären und azinären/alveolären Wachstumsmustern (G1), mäßig bis schlecht differenzierte (G2-3) und undifferenzierte Karzinome (G4) unterschieden werden. Einige Tumore zeigten ausgedehnte zentrale Nekrosen. Karzinomzellen der Adenokarzinome wiesen Malignitätskriterien im Sinne verschobener Kern-Plasma-Relation, atypischer Mitosen und hoher Pleomorphie auf. Im Gegensatz zu humanen Mammakarzinomen traten innerhalb eines Tumors unterschiedliche Differenzierungsmuster nebeneinander auf. Diese Heterogenität beruhte mutmaßlich auf dem Wachstum mehrerer neoplastischer Foki nebeneinander. Murine IACs waren in den meisten Fällen von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, was zu einem eher verdrängenden als infiltrativem Tumorwachstum führte.

Bei der histopathologischen Beurteilung konnten immer wieder definierte frühe Stadien der Karzinogenese detektiert werden, die Übergänge in potentiell höher-maligne Stadien darstellten. So konnte die Progression von Dysplasien über *in situ* Karzinome in invasive Adenokarzinome verfolgt werden.

Dysplasie



CIS



IAC

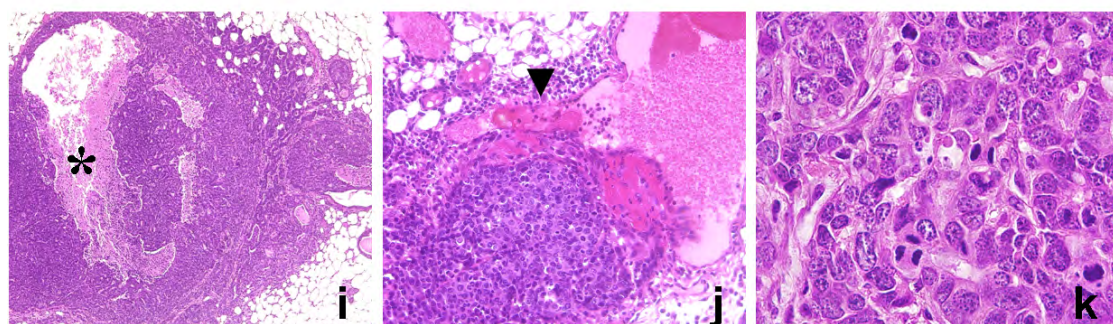


Abb. 4.17: **Histopathologische Charakteristika muriner Neoplasien.** Dysplasien (a-c): dilatierte, „starre“ Azini mit einreihigem, hypertrophem Epithel und pathologischer Sekretretention. CIS (d-h): mehrreihige Epithelzellformationen mit *clinging*-artigem (c,e,f, Pfeilspitzen), kribriformem (g,h) und partiell solidem (d,f, Pfeile) Wachstumsmuster. IAC (i-k): Zellverbände eines schlecht differenzierten, invasiven Karzinoms mit zentralen Nekrosen (i, Stern), beginnender Angioinvasion (j, Pfeilspitze) ausgeprägter Kernpleomorphie und zahlreichen Mitosen (k).

4.5 Transgenabhängigkeit muriner Neoplasien der Brustdrüse

Für alle detektierten MINs und invasiven Karzinome, konnte eine Transgenabhängigkeit mittels immunhistochemischer LT-Färbung nachgewiesen werden. Insbesondere frühe Stadien wiesen eine stark positive nukleäre Färbereaktion für LT auf, während invasive Tumore in zentralen Anteilen auch schwächere Färbeergebnisse zeigten (s. Abb. 4.18).

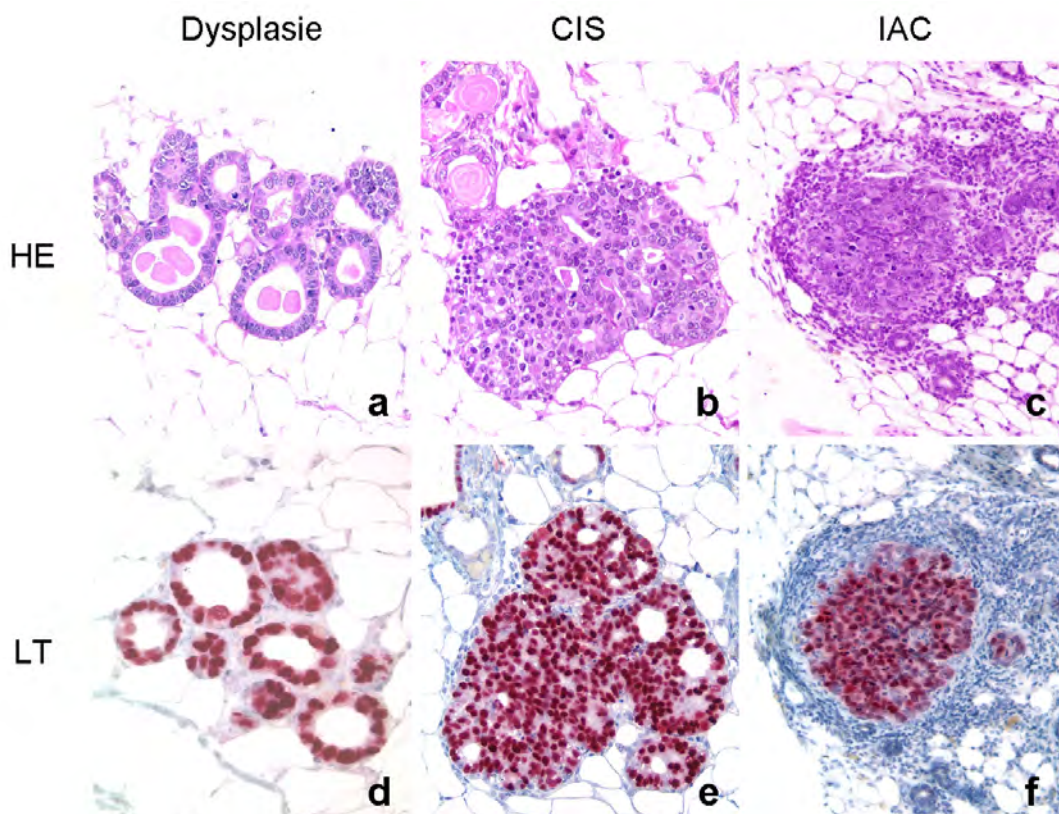


Abb. 4.18: **Trangenabhängigkeit muriner Neoplasien der Brustdrüse.** Murine Neoplasien mit nachweisbarer LT-Expression in der IHC. Dysplasien (a + d), CIS (b + e), IAC (c + f).

Interessanterweise schien bei der Entstehung muriner Neoplasien die Dosis des transformierenden Transgens eine Rolle zu spielen. Die Abbildungen 4.19, 4.20 und 4.21 geben die auftretenden Neoplasien in jedem untersuchten Tier in Relation zu der Anzahl LT-exprimierender Epithelzellen wieder. Bei der hoch-exprimierenden Linie WAP-

T1 zeigten zwei Tiere bereits während der Laktation, und damit maximal 11 Tage nach Beginn der Transgenexpression, Läsionen im Sinne einer Dysplasie. 30 Tage pw wiesen vier von fünf eingesetzten Tieren (80 %) zahlreiche Dysplasien auf. Weiterhin konnte bei einem Tier ein CIS detektiert werden. Nach weiteren 30 Tagen waren in allen untersuchten Brustdrüsen die Drüsenendstücke global dysplastisch transformiert und zeigten multiple Herde mit CIS-Formationen. Ein Tier wies histologisch bereits zwei invasive Tumore auf. Am 120. Tag pw zeigten zwei von fünf Mäusen IACs (40 %) (s. Abb. 4.19). Bei den beiden erkrankten Tieren konnten mikroskopisch jeweils drei IACs bzw. vier IACs im Bereich der cervikalen und thorakalen Brustdrüsen nachgewiesen werden.

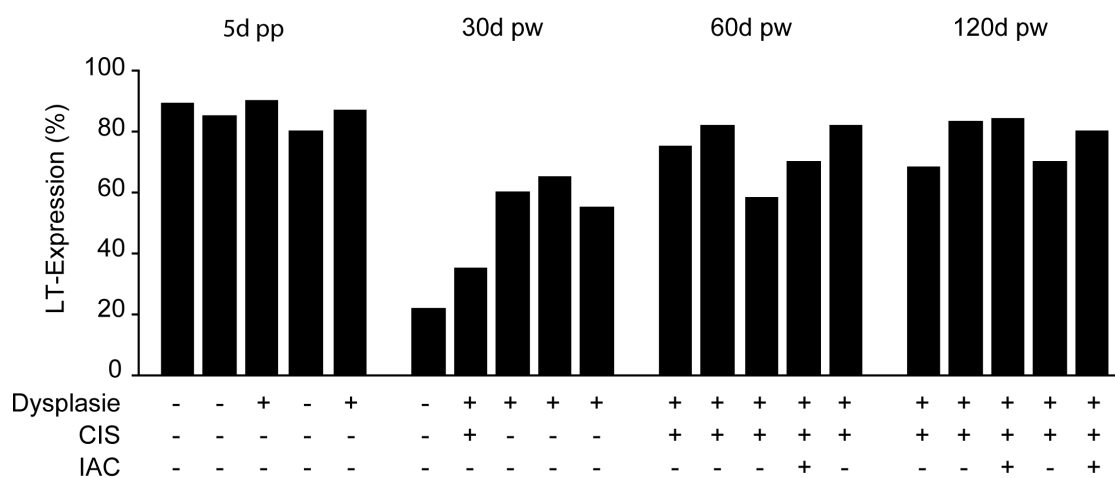


Abb. 4.19: **Transgenabhängige Entstehung muriner Neoplasien in Tieren der Linie WAP-T1.** Frühzeitige Entstehung von Dysplasien während der Laktation. Nach globaler, dysplastischer Transformation aller LA-Einheiten treten multiple CIS-Formationen und IACs auf. Mit der Progression zu höher-malignen Neoplasien steigt die Anzahl LT-positiver Epithelzellen.

Bei Tieren der Linie WAP-T-NP8 wurden die ersten Veränderungen etwas später detektiert. Während alle LA-Einheiten zum Zeitpunkt der Laktation morphologisch unauffällig waren, sah man 30 Tage pw in Brustdrüsen von vier der eingesetzten fünf Mäuse (80 %) multifokale dysplastische Veränderungen. Multiple CIS Herde zeigten sich 30 Tage später bei zwei von fünf Tieren (40 %). 120 Tage pw wiesen alle Tiere multifokale CIS-Formationen auf und vier der fünf Tiere waren an einem IAC erkrankt (80 %). Bei zwei dieser vier Mäuse handelte es sich um einen solitären Tumor, bei den anderen beiden um jeweils zwei bzw. drei IACs.

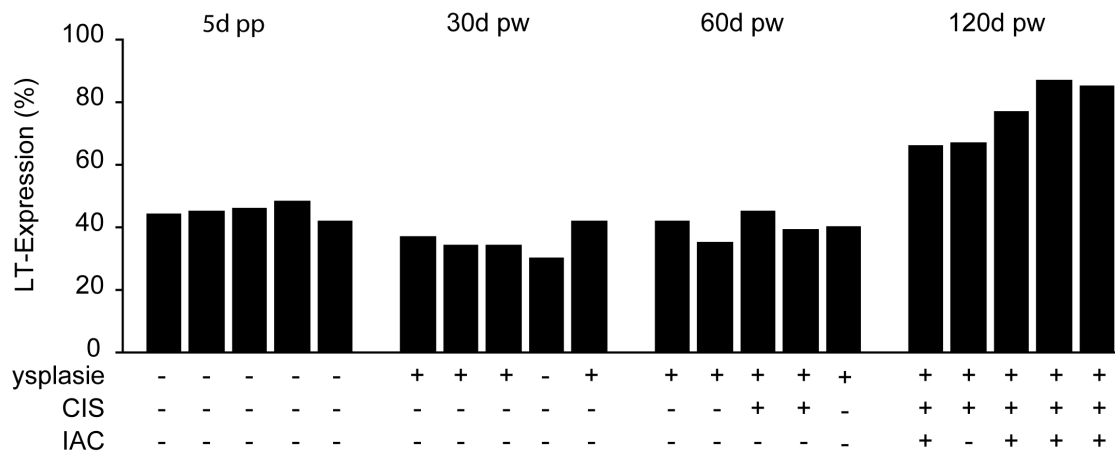


Abb. 4.20: **Transgenabhängige Entstehung muriner Neoplasien in Tieren der Linie WAP-T-NP8.** Multifokales Auftreten dysplastischer Herde an Tag 30 pw. An Tag 60 pw zusätzlich vereinzelte CIS-Formationen. Erst mit exzessivem Anstieg der LT-Expression entstehen ausge dehnte CIS-Herde und IACs.

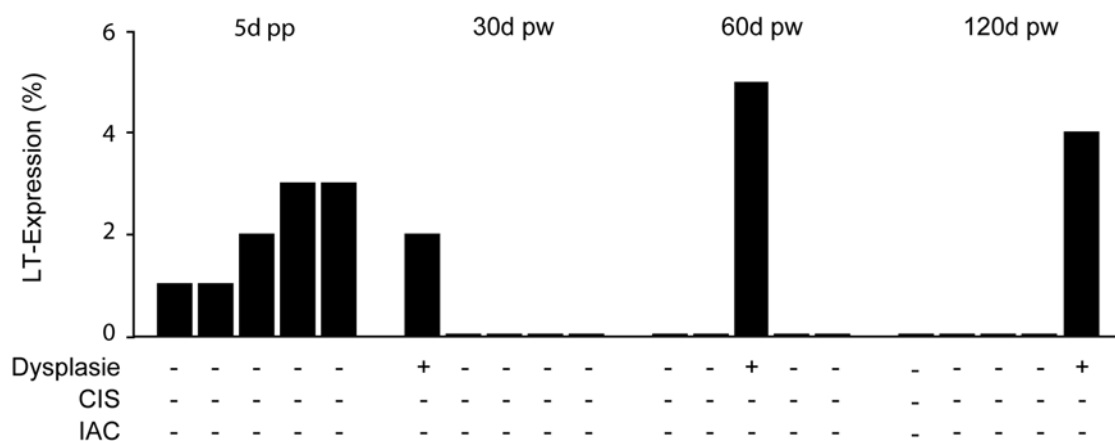


Abb. 4.21: **Transgenabhängige Entstehung muriner Neoplasien in Tieren der Linie WAP-T-NP6.** Nur jeweils ein Tier an Tag 30, 60 und 120 pw mit mono- bis paucifokalen, in der Immunhistochemie LT-positiven Dysplasien ohne erkennbare Progressionstendenz. Das immunhistochemisch LT-negative Brustdrüsengewebe war morphologisch unauffällig.

Bei der Betrachtung der LT-Expression zum Zeitpunkt des Auftretens erster Neoplasien konnten einige Regelmäßigkeiten beobachtet werden. Sowohl Tiere der Linien WAP-T1 als auch der Linie WAP-T-NP8 wiesen Dysplasie und erste CIS erst ab einer Anzahl von

30-40 % LT-exprimierender Epithelzellen auf. Invasive Tumore waren ab einer Anzahl von etwa 70 % LT-exprimierender Epithelzellen nachweisbar.

Bei Tieren der Linie WAP-T-NP6 waren in nur 25 % zu jedem untersuchten Zeitpunkt mono- bis paucifokale Brustdrüsenläsionen im Sinne einer Dysplasie zu detektieren. Die Foki wiesen keine Progressionstendenzen zu höher-malignen Neoplasien auf und stellten sich in allen Fällen als deckungsgleich mit den in der LT-Färbung als positiv gewerteten Herden heraus.

Zusammenfassend wies jede atypische Epithelveränderung in der LT-Färbung positive Signale auf und war somit nachweislich Transgen-assoziiert. Je mehr positive Zellen nachgewiesen werden konnten, umso häufiger konnten höher-maligne Läsionen bis hin zum invasiven Tumor detektiert werden. Bei Tieren der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 schienen sogar Schwellenwerte der LT-Expression für die Entstehung spezieller Neoplasien erkennbar zu sein. Allerdings muß in Betracht gezogen werden, dass die erhöhte Proliferationsaktivität während der Progression auch zu einer erhöhten Anzahl LT-positiver Zellen geführt haben könnte, ohne die histopathologische Wertigkeit der Läsion zu beeinflussen.

4.6 Immunhistochemische Charakterisierung transgeninduzierter Neoplasien

Prognostische und molekulare Marker nehmen bei der Beurteilung humaner invasiver Mammakarzinome und ihrer präneoplastischen Vorstufen eine besondere Stellung ein. Sie dienen dazu, das biologische Verhalten und molekulare Eigenschaften des Tumors einzuschätzen, die für die weitere Progression der Erkrankung insbesondere in Bezug auf mögliche therapeutische Optionen von Bedeutung sind. Um neben der Morphologie die Relevanz des WAP-T-transgenen Mausmodells als Modell für die Karzinogenese des humanen Mammakarzinoms zu untersuchen, war eine Analyse der in der humanen Situation angewandten prognostischen Marker unablässig. Entsprechend den Vorschlägen des *Anapolis Pathology Panels* (Cardiff et al., 2000) wurde eine immunhistochemische Charakterisierung muriner Neoplasien durchgeführt, bei der neben der Beurteilung der Transgenexpression folgende, in der humanen Diagnostik als prognostische Marker verwendete Parameter untersucht wurden: 1) Hormonrezeptoren (ER, PR), 2) c-erbB2 (Her2), 3) Apoptoseindex (TUNEL), 4) Proliferationsindex (Ki67) sowie 5) eine Analyse terminaler Differenzierungsmarker (CK6, CK14, CK18, SMA, Vimentin).

4.6.1 Hormonrezeptoren

Die Expression des Östrogenrezeptors (ER) und Progesteronrezeptors (PR) gehört zu den wichtigsten Prognosefaktoren bei der Beurteilung humaner Mammakarzinome. Ein Verlust der Hormonrezeptorexpression geht mit einer schlechten Prognose und einem aggressiven Krankheitsverlauf einher (Locker, 1998; Osborne, 1998). Die Auswertung des ER/PR-Status erfolgte nach dem immunoreaktiven (IRS) Score nach Remmele. Es handelt sich dabei um ein gängiges Bewertungssystem aus der humanen Mammakarzinomdiagnostik u.a. zur Beurteilung des Hormonrezeptorstatus (s. Abschnitt 3.2.3.5). LA-Einheiten und Ducte der Balb/c Kontrolltiere an Tag 30 und 60 pw zeigten ein einheitliches Verteilungsmuster ER- und PR-positiver Epithelzellen. 30-50 % aller Epithelien wiesen eine schwach bis mäßig positive, nukleäre Färbereaktion für ER auf (durchschnittlicher IRS 2.4 an Tag 30 pw bzw. 3.5 an Tag 60 pw). Bei 50-60 % der Zellen fand sich eine durchweg stark positive PR-Färbung (durchschnittlicher IRS 9.4 an Tag 30 pw bzw. 9.0 an Tag 60 pw). Das immunhistochemisch überwiegend LT-negative Brustdrü-

sengewebe WAP-T-NP6-transgener Mäuse ließ zu allen untersuchten Zeitpunkten ein vergleichbares ER/PR-Expressionsmuster erkennen (s. Abbs. 4.22, 4.23). Die regelmäßige Verteilung Hormonrezeptor-positiver Epithelzellen erstreckte sich dabei gleichermaßen auf proximale Dukte als auch auf terminal gelegene Duktuli und LA-Einheiten. Tiere der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 dagegen wiesen lediglich an Tag 30 pw äquivalente Expressionen für PR und an Tag 30 und 60 pw für ER auf. Im Anschluß daran war für beide Linien eine stark reduzierte ER/PR-Expression nachweisbar (s. Abbs. 4.22, 4.23).

Zeitpunkt	PR-Status (IRS Score)			
	WAP-T1	WAP-T-NP8	WAP-T-NP6	Balb/c Kontrolle
30d pw	7.2 (6.0-9.0)	8.4 (6.0-9.0)	8.4 (6.0-9.0)	9.4 (8.0-12.0)
60d pw	5.4 (4.0-9.0)	6.6 (6.0-9.0)	9.0 (9.0-9.0)	9.0 (9.0-9.0)
120d pw	4.0 (2.0-6.0)	4.4 (3.0-6.0)	9.0 (9.0-9.0)	

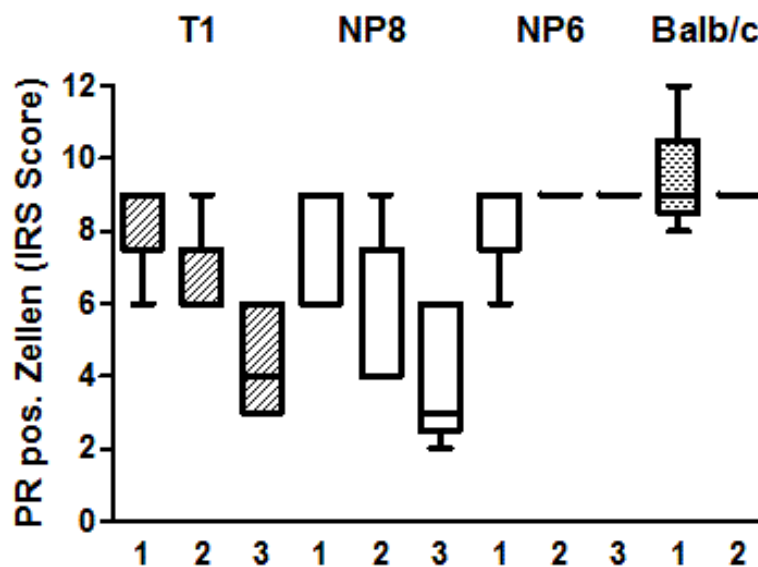


Abb. 4.22: **Progesteronrezeptor-Status.** Werte jeweils angegeben als Mittelwert (*range*). Reduzierte Nachweisbarkeit des PR bei WAP-T1 und WAP-T-NP8 Mäusen ab dem 60. Tag pw im Vergleich zu WAP-T-NP6- und Balb/c-Kontrolltieren. Darstellung des Immunreaktiven Scores (IRS Score) im Whisker-Plot. 30 Tage pw (1), 60 Tage pw (2) und 120 Tage pw (3).

Zeitpunkt	ER-Status (IRS Score)			
	WAP-T1	WAP-T-NP8	WAP-T-NP6	Balb/c Kontrolle
30d pw	2.2 (2.0-3.0)	2.0 (2.0-2.0)	2.8 (2.0-4.0)	2.4 (2.0-3.0)
60d pw	2.0 (2.0-2.0)	2.4 (2.0-4.0)	2.8 (2.0-4.0)	3.5 (2.0-4.0)
120d pw	1.4 (1.0-2.0)	1.6 (1.0-2.0)	2.8 (2.0-4.0)	

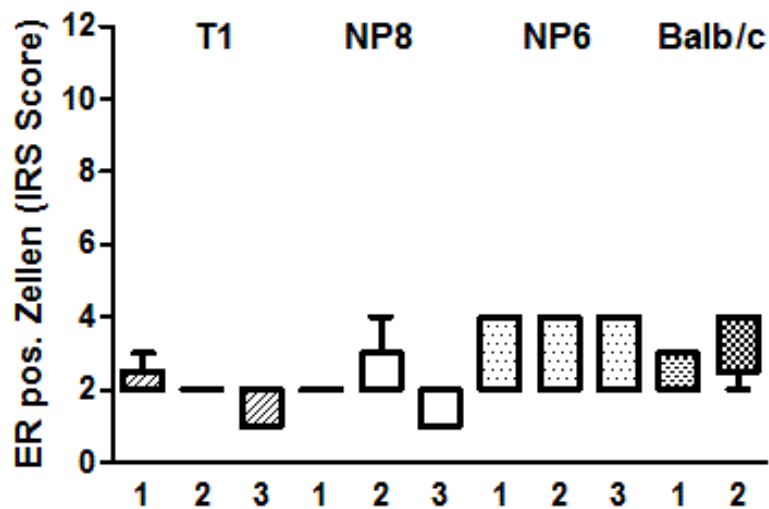


Abb. 4.23: **Östrogenrezeptor-Status.** Werte jeweils angegeben als Mittelwert (*range*). Verminderte Expression des Östrogenrezeptors analog zu dem frühen Verlust der Progesteronrezeptorexpression ab dem 60. Tag pw bei WAP-T1 bzw. ab dem 120. Tag pw bei WAP-T-NP8. 30 Tage pw (1), 60 Tage pw (2) und 120 Tage pw (3).

Bei der morphologischen Beurteilung des Verteilungsmusters der Hormonrezeptoren stellte sich heraus, daß bereits auf Ebene der Dysplasien die Anzahl ER/PR-positiver Zellen reduziert war (s. Abb. 4.24). Der ER-Rezeptor schien hierbei vor dem PR-Rezeptor verlorenzugehen, was allerdings auch auf die geringere Färbeintensität zurückzuführen sein könnte. CIS und IACs stellten sich als vollständig negativ für beide Hormonrezeptoren dar. Im Verlauf der Tumorprogression entwickelte sich demnach schon früh eine Hormonrezeptorunabhängigkeit, die Hinweis auf eine schlechte Differenzierung der Neoplasien sein könnte.

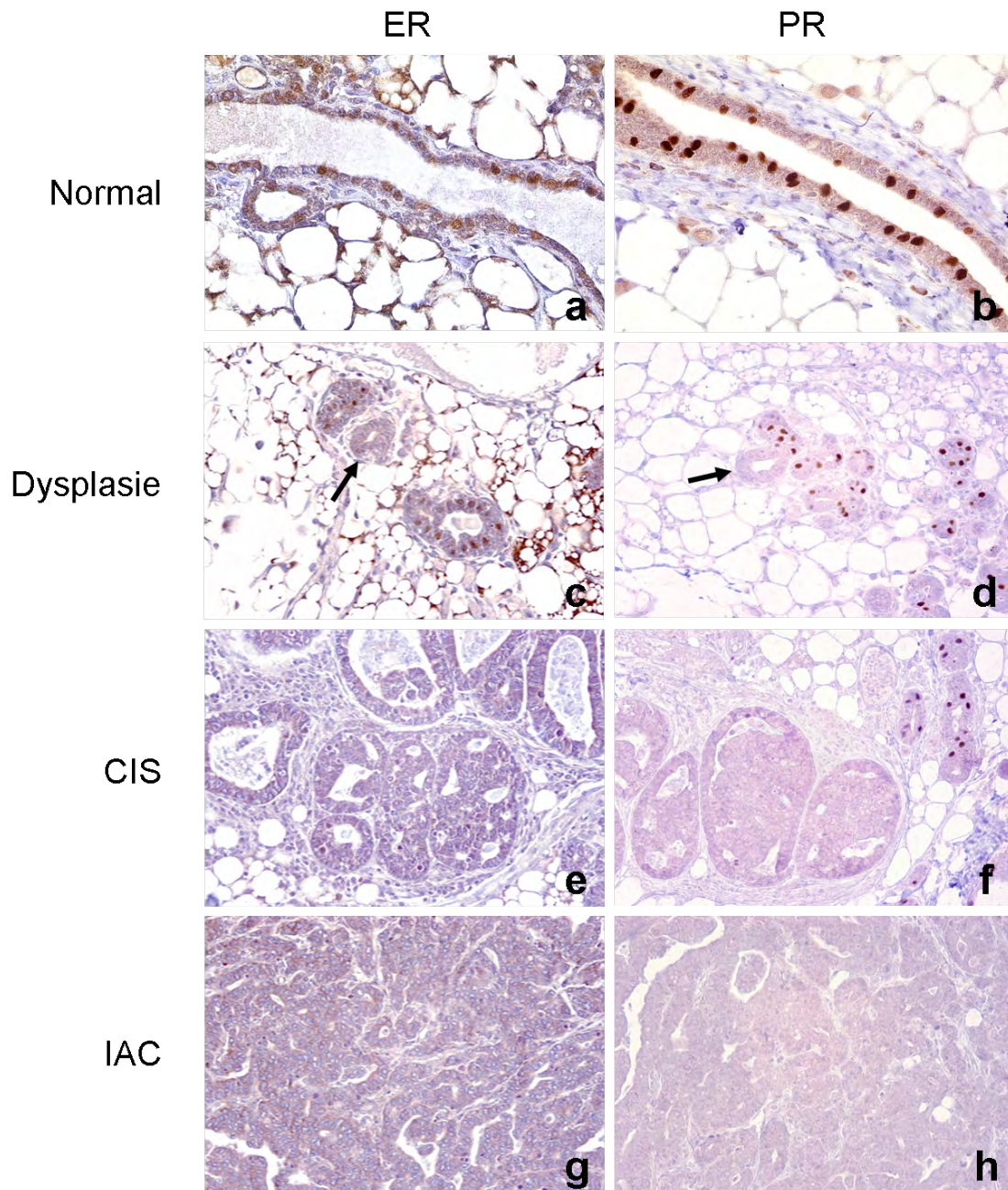


Abb. 4.24: **Hormonrezeptorverlust im Verlauf der Karzinogenese.** Unauffällige LA-Einheiten und Ducte mit schwach bis mäßiger positiver, nukleärer ER-Expression (a) und stark positiver, nukleärer PR-Expression (b). Dysplasien mit beginnendem Hormonrezeptorverlust (Pfeil, c+d). Durchweg ER und PR negative CIS (e+f) und IAC (g+h).

4.6.2 c-ErbB2 (Her2/neu)

Das Onkoprotein c-ErbB2 (HER2) ist ein transmembranöser Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ. Rund 20-30 % aller humanen invasiven Mammakarzinome weisen eine HER2-Überexpression auf und sind überdies durch eine schlechtere Differenzierung und einen schlechteren Verlauf gekennzeichnet (Kallioniemi et al., 1992). Bei der Begutachtung muriner Neoplasien in dem untersuchten WAP-T-transgenen Mausmodell wiesen alle Läsionen vom Auftreten erster Dysplasien bis zur Entwicklung invasiver Karzinome unabhängig vom histologischen Subtyp eine membranöse Färbung für c-ErbB2 auf. Einschränkend muß allerdings erwähnt werden, daß die Detektion des c-ErbB2 neben der membranösen auch eine mäßige zytosolische Anfärbung ergab, die in schwächerer Ausprägung auch von morphologisch unveränderten Epithelien aufgewiesen wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits bei der Analyse anderer muriner Mammakarzinom-Modelle beschrieben (Lin et al., 2003). Obwohl es sich im Gegensatz zu der membranösen Markierung hauptsächlich um eine unspezifische Färbereaktion zu handeln schien, konnte nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden, ob es sich hier um eine Überexpression des Wachstumsfaktors als Ausdruck einer Amplifikation handelte, wie sie auch in schlecht differenzierten prä-invasiven und invasiven Läsionen humaner Mammakarzinome beschrieben wird (Couturier et al., 2000; Jacobs et al., 1999; Lakhani, 1999).

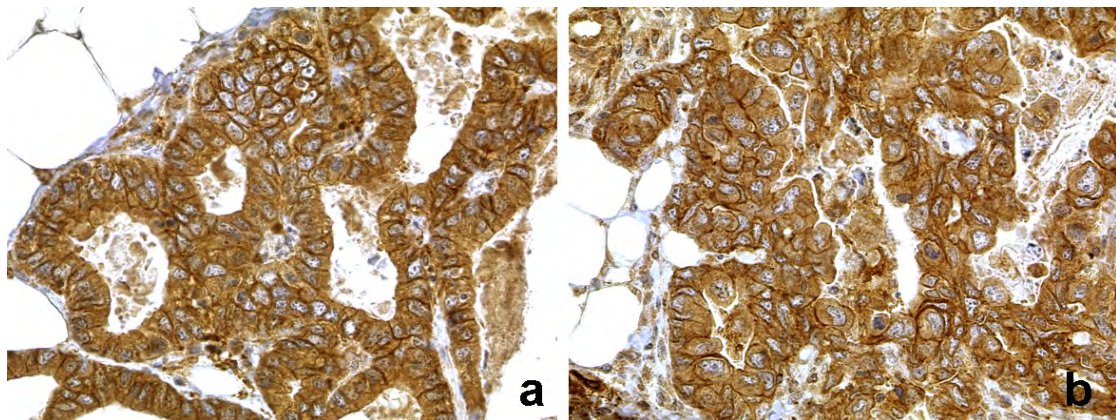


Abb. 4.25: **Expression des c-ErbB2 Rezeptors.** Membranöse und zytosolische c-ErbB2 (HER2) Expression in CIS (a) und IAC (b).

4.6.3 In vivo Zellkinetik

Ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose gilt als ein entscheidender Faktor bei der Tumorentstehung. Insbesondere der Ki67-Index als Maß der Proliferationsaktivität wurde mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer schlechteren Überlebensrate in Verbindung gebracht und als unabhängiger Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf des humanen Mammakarzinoms beschrieben (de Azambuja et al., 2007).

Zeitpunkt	Proliferationsrate (IRS Score)			
	WAP-T1	WAP-T-NP8	WAP-T-NP6	Balb/c Kontrolle
30d pw	6.3 (6.0-7.5)	6.6 (6.0-9.0)	3.9 (3.0-6.0)	3.8 (3.0-6.0)
60d pw	8.4 (7.5-10.5)	7.2 (6.0-9.0)	3.9 (3.0-6.0)	3.4(3.0-4.5)
120d pw	10.8 (9.0-12.0)	10.5 (9.0-12.0)	4.2 (3.0-6.0)	

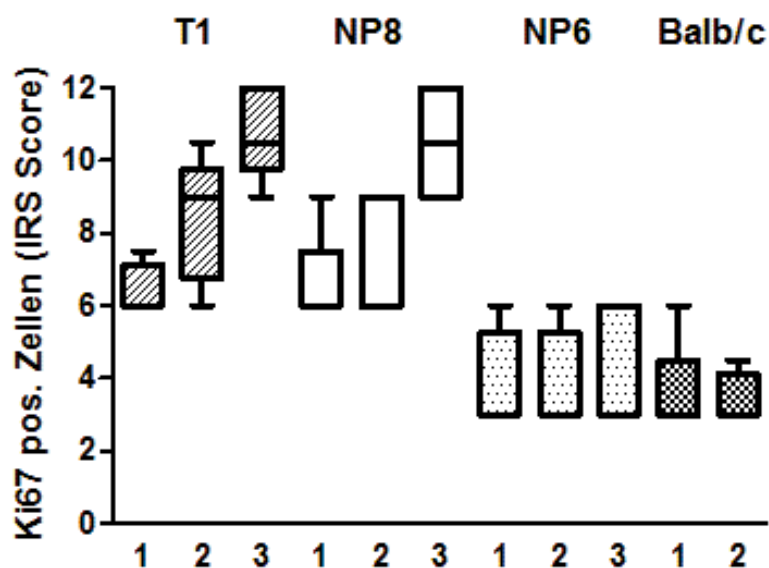


Abb. 4.26: **Ki67-Proliferationsrate.** Werte jeweils angegeben als Mittelwert (*range*). Steter Anstieg der Proliferationsrate bei Tieren der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 nach Beginn der Transgenexpression. Im Gegensatz dazu weisen Mäuse der Linie WAP-T-NP6 eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Proliferationsrate auf. Darstellung des Immunreaktiven Scores (IRS Score) im Whisker-Plot. 30 Tage pw (1), 60 Tage pw (2) und 120 Tage pw (3).

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde zu allen bisher untersuchten Zeitpunkten eine Ki67-Färbung der Brustdrüsengewebe durchgeführt. Bei Ki67 handelt sich um ein Zellproliferation-assoziiertes Antigen, welches in allen Phasen des Zellzyklus mit Ausnahme der G₀-Phase ruhender Zellen exprimiert wird. Die Beurteilung fand anhand des IRS-Scores statt. Es zeigte sich, daß alle positiven Signale mit einer sehr starken Färbeintensität (+3) vergesellschaftet waren (s. Abb. 4.27). Tiere der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 wiesen nach Beginn der Transgenexpression einen steten Anstieg der Proliferation mit einem IRS von durchschnittlich 6.3 bzw. 6.6 an Tag 30 pw bis zu 10.8 bzw. 10.5 an Tag 120 pw auf (s. Abb 4.26).

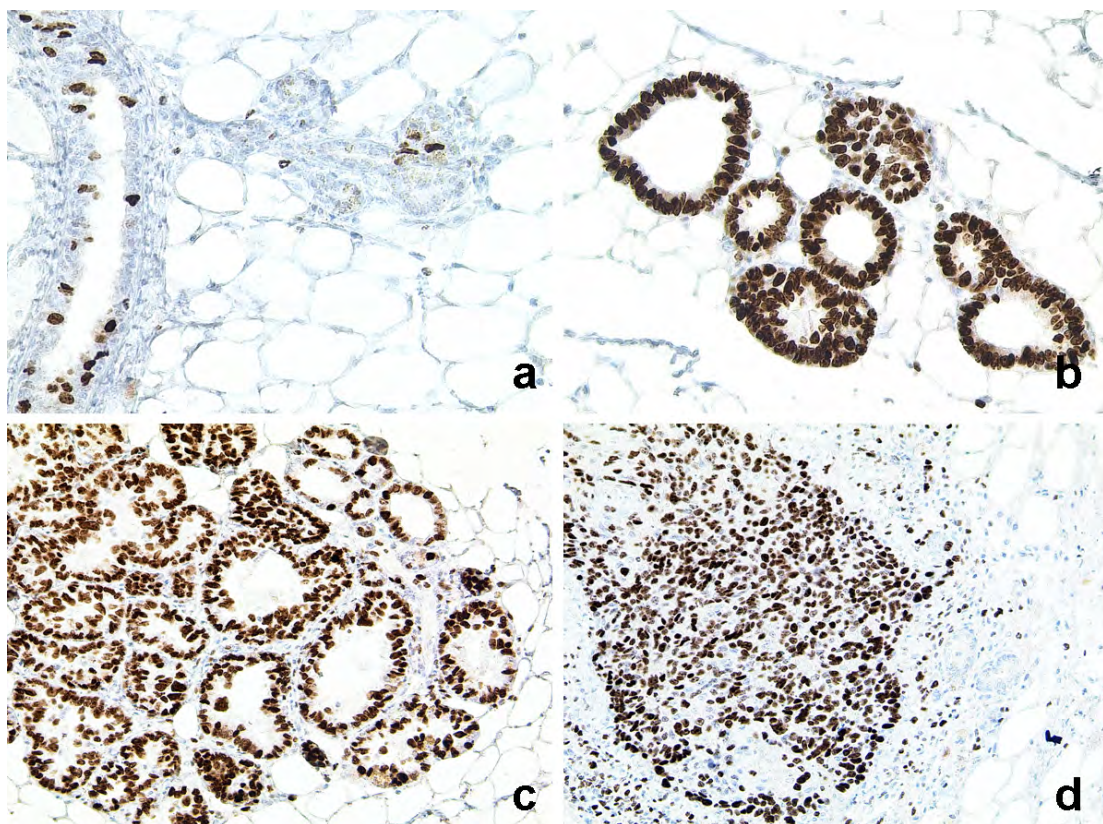


Abb. 4.27: **Expression des Proliferationsmarkers Ki67.** Unauffällige LA-Einheit mit Ki67-positiven Zellen überwiegend im Bereich des Dukttepithels (a). Umfassende und stark positive, nukleäre Ki67-Expression in Dysplasien (b), CIS (c) und IAC (d).

Dabei spiegelte sich analog zu den Ergebnissen der LT-Expression ein stärkerer Anstieg der Proliferation zwischen dem 30. und 60. Tag pw bei WAP-T1 Mäusen verglichen mit WAP-T-NP8 Mäusen wider. Tiere der Linie WAP-T-NP6 zeigten eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Proliferationsrate mit einem Score von durchschnittlich 3.9 bzw. 3.8 an Tag 30 pw und 3.9 bzw. 3.4 an Tag 60 pw.

Zeitpunkt	Apoptoserate (%)			
	WAP-T1	WAP-T-NP8	WAP-T-NP6	Balb/c Kontrolle
30d pw	1.38 (1.00-1.90)	0.94 (0.70-1.30)	0.32 (0.00-1.00)	0.13 (0.10-0.20)
60d pw	1.18 (0.60-1.70)	0.38 (0.20-0.70)	0.32 (0.00-1.00)	0.13 (0.10-0.20)
120d pw	1.28 (0.70-1.60)	1.00 (0.50-1.50)	0.38 (0.30-0.50)	

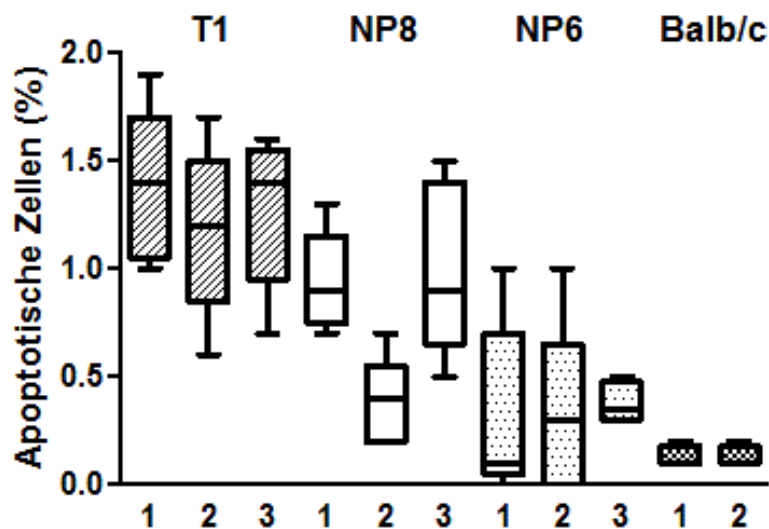


Abb. 4.28: **Apoptoserate.** Werte jeweils angegeben als Mittelwert (*range*). Die Markierung apoptotischer Zellen wurde nach Auswertung mittels IRS Score im Whisker-Plot dargestellt. 30 Tage pw (1), 60 Tage pw (2) und 120 Tage pw (3).

Die Apoptoserate stellte sich über den untersuchten Zeitraum als insgesamt sehr gering dar. Dennoch war eine erhöhte Apoptoserate in Tieren der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 zu allen drei Zeitpunkten nachweisbar. Dabei übertraf die Apoptoserate der Linie WAP-T1 mit bis zu 1.38 % aller Epithelzellen der Balb/c-Kontrollgruppe mit bis zu 0.13

% um das etwa zehnfache. Auffällig war zudem, daß bei den Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 im Gegensatz zu der Kontrollgruppe die Apoptoserate an Tag 60 pw abfiel, um anschließend bis zum Tag 120 pw wieder auf mit dem 30. Tag pw vergleichbare Werte anzusteigen.

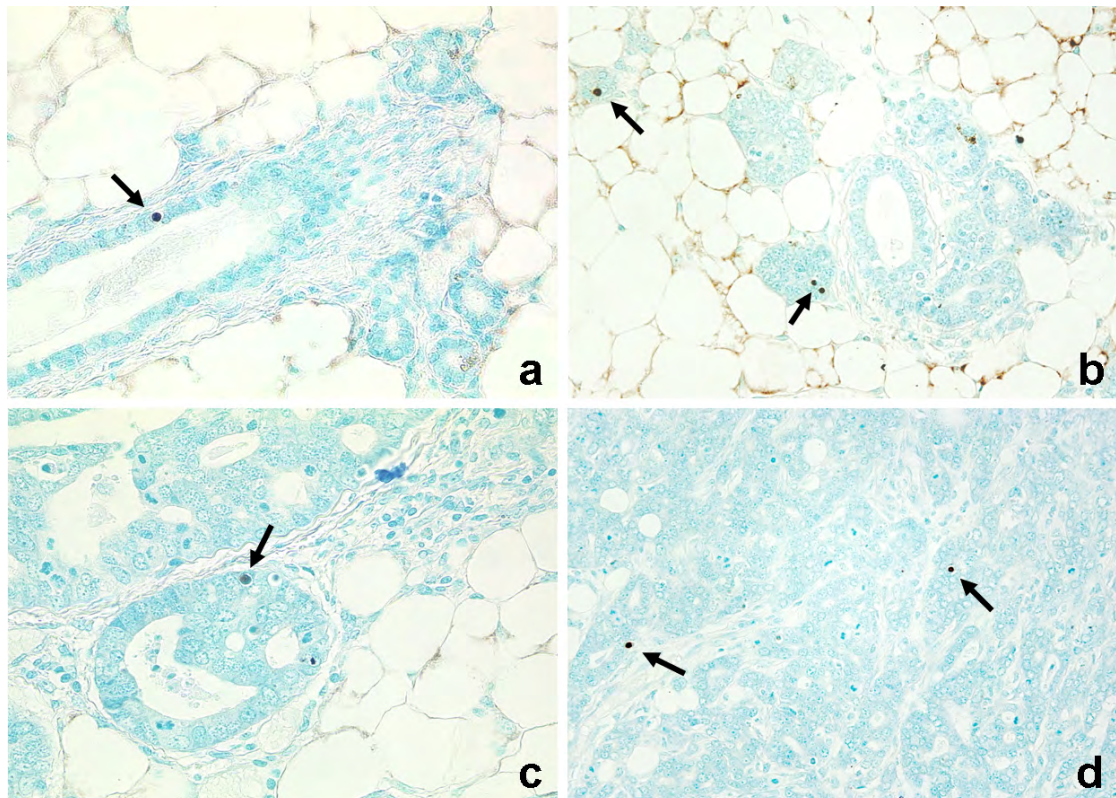


Abb. 4.29: **Markierung apoptotischer Zellkerne.** Apoptotische Zellkerne (Pfeile) in unauffälligen LA-Einheiten (a), Dysplasien (b), CIS (c) und IAC (d).

Um einen direkten Zusammenhang zwischen der Apoptose- und Proliferationsrate und der Tumorentstehung erkennen zu können, wurde der Proliferationsindex und der Apoptoseindex in Relation zu der histopathologischen Morphologie ausgewertet. Unauffällige Areale wurden dabei in Balb/c- Kontrolltieren und WAP-T-NP6 Mäusen beurteilt. Dysplasien, CIS und IACs wurden bis auf vereinzelt in WAP-T-NP6 Tieren vorkommende dysplastische Herde ausschließlich in WAP-T1 und WAP-T-NP8 Tieren ausgewertet. Das Verteilungsmuster Ki67-positiver Epithelzellen in unauffälligem Brustdrüsengewe-

be von Kontrolltieren wies regionäre Unterschiede auf. Während nur wenige Epithelien im Bereich der LA-Einheiten und terminalen Duktuli proliferierten, befanden sich die Ki67-positiven Zellen überwiegend im Epithel der zuführenden Dükte (s. Abb. 4.27, a). Durchschnittlich konnte bei 13 % aller Epithelien eine positive Ki67-Markierung gesehen werden. Tiere der Linie WAP-T-NP6 zeigten auch in diesem Fall mit Ausnahme der dysplastischen Foki ein den Kontrolltieren vergleichbares Verteilungsmuster. Mit dem Beginn dysplastischer Transformation zeigten die Läsionen ein umfassend positives Färbeergebnis für Ki67. Die Auswertung der Ki67-Färbung für Dysplasien ergab insgesamt eine Positivität von bis zu 77 % aller Zellen. Innerhalb der CIS-Herde wiesen bis zu 96 % der Epithelzellen Ki67-positive Signale auf. Lediglich in IACs reduzierte sich analog zur verringerten LT-Anfärbbarkeit die Anzahl Ki67-positiver Zellen auf etwa 86 %.

Diagnosen	n	Proliferationsindex (%)	n	Apoptoseindex (%)
Normales Epithel	17	13.2 (0.0-30.0)	20	3.2(0.0-6.0)
Dysplasie	13	76.9 (50.0-90.0)	17	6.1(4.0-8.0)
CIS	15	95.7 (90.0-100.0)	11	11.0(8.0-15.0)
IAC	8	86.3 (70.0-100.0)	2	14.0(12.0-16.0)
Total	53		50	

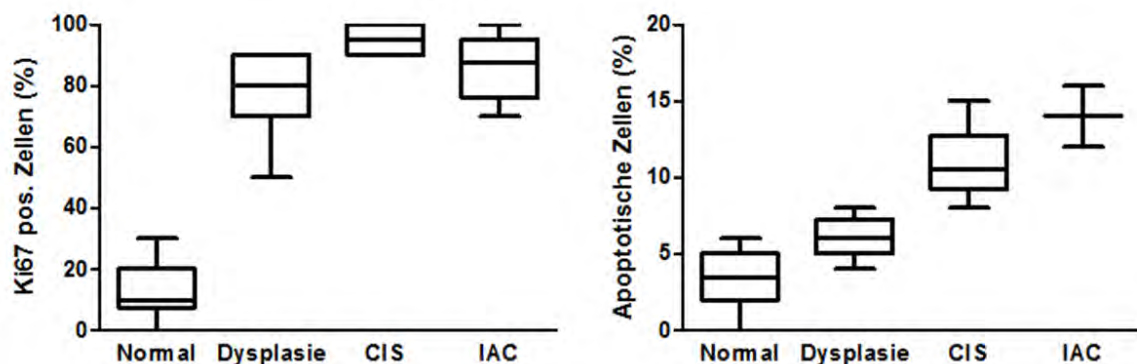


Abb. 4.30: **Proliferationsindex und Apoptoseindex muriner Neoplasien.** Werte angegeben als Mittelwert (range). Darstellung der Indices im Whisker-Plot mit einem exzessiven Anstieg der Proliferationsrate und analog einem linearen Anstieg der Apoptoserate im Verlauf der Karzinogenese.

Parallel fiel bei der Betrachtung der morphologischen Komponente ebenfalls ein Anstieg des Apoptoseindex ins Auge. Während in unauffälligem Brustdrüsengewebe 3 % aller Epithelzellen der Apoptose unterlagen, konnten in Dysplasien 6 % apoptotischer Zellkerne detektiert werden. CIS und IACs zeigten mit 11 % bzw. 14 % einen weiteren Anstieg der Apoptoserate.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, daß die Progression muriner Neoplasien von normalem Gewebe über Dysplasien und CIS bis hin zu IACs mit einem exzessiven Anstieg der Proliferationsrate und analog einem linearen Anstieg der Apoptoserate einherging. Diese Ergebnisse konnten bei näherer Betrachtung in direkten Zusammenhang mit der Morphologie gebracht werden. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß LT-exprimierende Zellen aufgrund einer funktionellen Inaktivierung des pRb nicht mehr in der Lage sind, in die G0-Phase einzutreten. Da Ki67 in allen Phasen des Zellzyklus mit Ausnahme der G0-Phase ruhender Zellen exprimiert wird (Gerdes et al., 1983), könnte es sich bei den vorliegenden Ergebnissen um einen direkten Effekt des Transgens selbst und nicht um einen eindeutigen Beleg proliferierender Zellen handeln. Weiterhin konnte Ki67 in nicht proliferierender Zellen als Folge eines Chromatin-*Remodelings* nachgewiesen werden (Bullwinkel et al., 2006).

4.6.4 Terminale Differenzierungsmarker

Zytokeratine gelten als Marker epithelialer Differenzierung. Sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität gesunder Zellen, sondern scheinen auch an einer Vielzahl von Signaltransduktionsvorgängen kausal beteiligt zu sein. Während der Differenzierung spezialisierter Gewebe können Zytokeratine zudem als Marker der terminalen Differenzierung dienen. So finden sie in der Diagnostik humaner Tumore Anwendung, da sie Hinweise auf die Herkunft entarteter Zellen geben können.

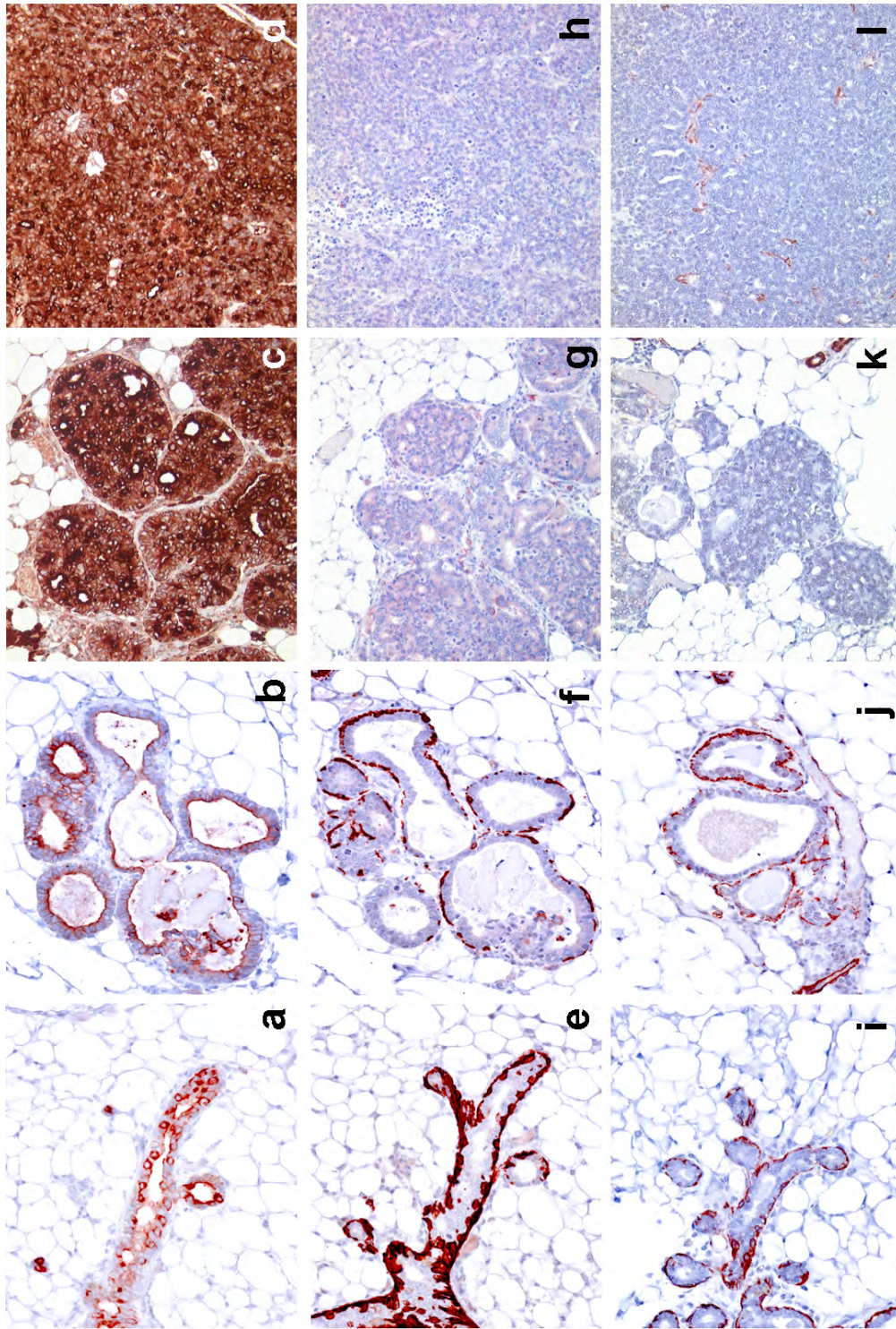
Die Brustdrüse weist ein charakteristisches Expressionsmuster terminaler Differenzierungsmarker auf. Sie besteht aus einem luminalen und basalen glandulären Epithel, welches von einem myoepithelialen Epithel umgeben wird. Die Expression diagnostischer Zytokeratine in normalem Mammagewebe umfasst luminale Zytokeratine (CK7, CK8, CK18 und CK19) sowie basal/myoepitheliale Zytokeratine (CK5/6, CK14 und CK17) als Marker der frühen glandulären und myoepithelialen Differenzierung. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, daß das Brust-

drüsenepithel CK5/14-positive „Progenitorzellen“ besitzt, die sich zu CK8/18-positiven glandulären oder *Smooth muscle actin* (SMA)-positiven myoepithelialen Zellen entwickeln können (Boecker and Buerger, 2003; Boecker et al., 2005). Bei der Analyse des murinen Brustdrüsengewebes WAP-T-transgener Tiere wurden CK6, CK14 und CK18 als Marker epithelialer Differenzierung eingesetzt. SMA diente als spezifischer Marker ausgereifter Myoepithelien. Zusätzlich wurde Vimentin zur Identifikation mesenchymaler Differenzierung eingesetzt. Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung terminaler Differenzierungsmarker sind am Ende dieses Kapitels in einer Tabelle zusammengefaßt.

Unauffälliges Brustdrüsengewebe Immunhistochemische Untersuchungen ruhender Kontrollbrustdrüsen zeigten eine selektive Expression von CK18 in luminalen Epithelzellen von LA-Einheiten und Duktal gleichermaßen (s. Abb. 4.31). Währenddessen zeigte sich ein eindeutig CK14-positives Färbeergebnis für Zellen des basal/myoepithelialen Kompartiments. SMA markierte Myoepithelzellen und Myofibrozyten. Interessanterweise bestätigte sich somit, daß SMA und CK14 keineswegs gleiche Zelltypen anfärben. Trotz häufig synonyme Verwendung dieser Marker in der Literatur, handelt es sich bei SMA um einen sehr spezifischen Marker für ausgereifte Myoepithelien und Myofibrozyten, während CK14 neben myoepithelialen Zellen basal gelegene, glanduläre Epithelien anfärbt.

Luminal differenzierte Neoplasien Der Großteil aller entstehenden Neoplasien wies ein luminales Zytokeratin-Expressionsmuster auf. Hierbei zeigten die Tumorzellen durchgehend eine starke Expression für CK18, während die Expression des basal/myoepithelialen Markers CK14 sowie des myoepithelialen Markers SMA im Verlauf der Karzinogenese verloren ging (s. Abb. 4.31).

Abb. 4.31 (*nächste Seite*): **Luminale Differenzierung muriner Neoplasien der Brustdrüse.** Unauffällige LA-Einheit mit luminaler CK18 Expression (a), basaler CK14 Expression (e) und myoepithelialer SMA Markierung (i). Der Großteil muriner Neoplasien zeigte eine ausgeprägte CK18-Expression (b-d). Die Expression von CK14 (f-h) und SMA (j-k) als Marker der basalen Epithelien bzw. Myoepithelien ging während der Tumorprogression verloren.



CK18

CK14

SMA

So konnte in unauffälligen Drüsenendstücken und frühen duktalem Dysplasien eine das luminaire Epithel umgebende, geschlossene basal/myoepitheliale Schicht nachgewiesen werden, welche auf Ebene der *high grade* Dysplasien zunehmend verringert erschien. CIS-Formationen wiesen nur noch vereinzelt SMA/CK14-positive Färbesignale auf, die keine Aussage über ein mögliches beginnend invasives Wachstum mehr zuließen. Innerhalb invasiver Tumore waren letztendlich lediglich SMA/CK14-positive intra- und peritumorale Gefäße nachweisbar. Es kam demnach anscheinend zu einem gleichzeitigen Verlust glandulär basaler Epithelzellen und myoepithelialer Zellen.

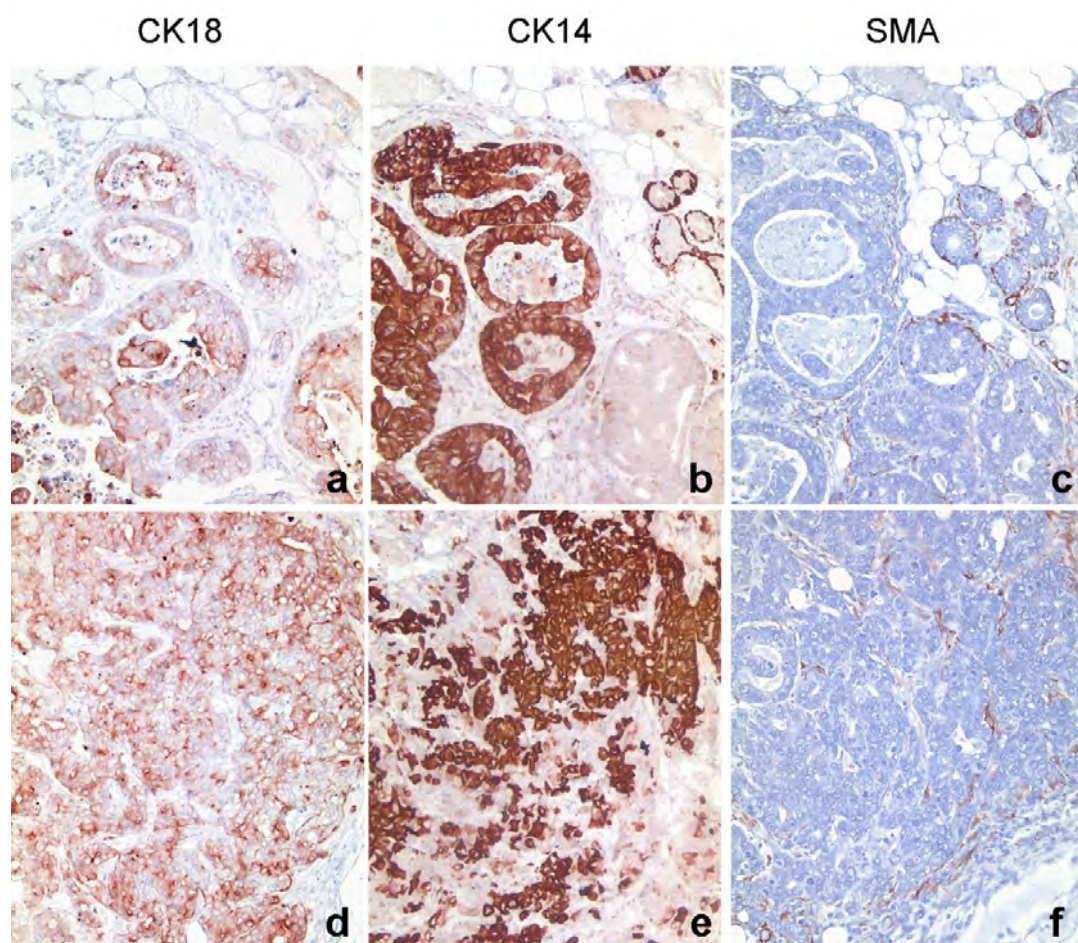


Abb. 4.32: **Kolokalisation luminaler und basaler Zytokeratine in murinen Neoplasien der Brustdrüse.** Kolokalisierte Expression von CK14 und CK18 in CIS (a-c) und IACs (d-f). SMA Markierung intra- und peritumorale Gefäße (c, f).

Basal differenzierte Neoplasien Immer wieder fanden sich bei der Analyse unseres Mausmodells murine Neoplasien, die eine Koexpression von CK18 und dem basalen Zytokeratin CK14 aufwiesen (s. Abb. 4.32). Bei den CK14/18-positiven Zellen handelte es sich eindeutig um Epithelzellen; reife Myoepithelzellen konnten nicht identifiziert werden. Eine myoepitheliale Differenzierung der Tumore konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da sich die Läsionen morphologisch nicht von den rein luminal differenzierten Neoplasien unterschieden und sie zudem CK18 als Marker ausgereifter glandulärer Differenzierung exprimierten. In allen detektierten Fällen basal/luminaler Differenzierung übertraf die Intensität der CK14-Färbung die Expressionsstärke der CK18-Färbung bei weitem.

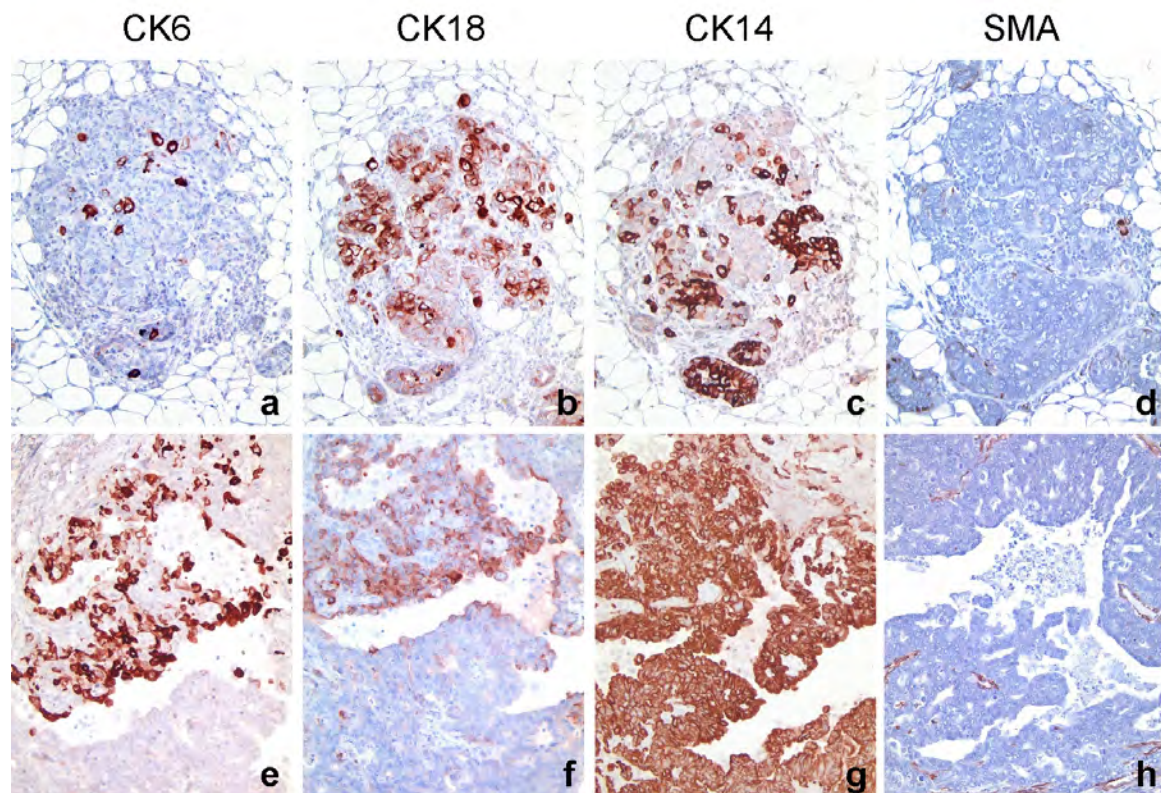


Abb. 4.33: **CK6 Expression in murinen Neoplasien basal/luminaler Differenzierung.** Kolo-kalisierte Expression von CK6, CK18 und CK14 in CIS (a-d) und IACs (e-h). SMA Markierung intra- und peritumoraler Gefäße (d, h).

CK6 Expression in Neoplasien basal/luminaler Differenzierung CK6 wurde in der Literatur als hyperproliferatives Zytokeratin beschrieben. Es wird während der Entwicklung der Brustdrüse vermehrt im Bereich der TEBs exprimiert (Sapino et al., 1993; Smith et al., 1990) und gehört zu den potentiellen Markern für Progenitorzellen (Grimm et al., 2002; Li et al., 2003). Bei der Analyse unauffälligen, reifen Brustdrüsengewebes zeigte sich in unserem Mausmodell eine spärlich positive Expression für CK6 in etwa

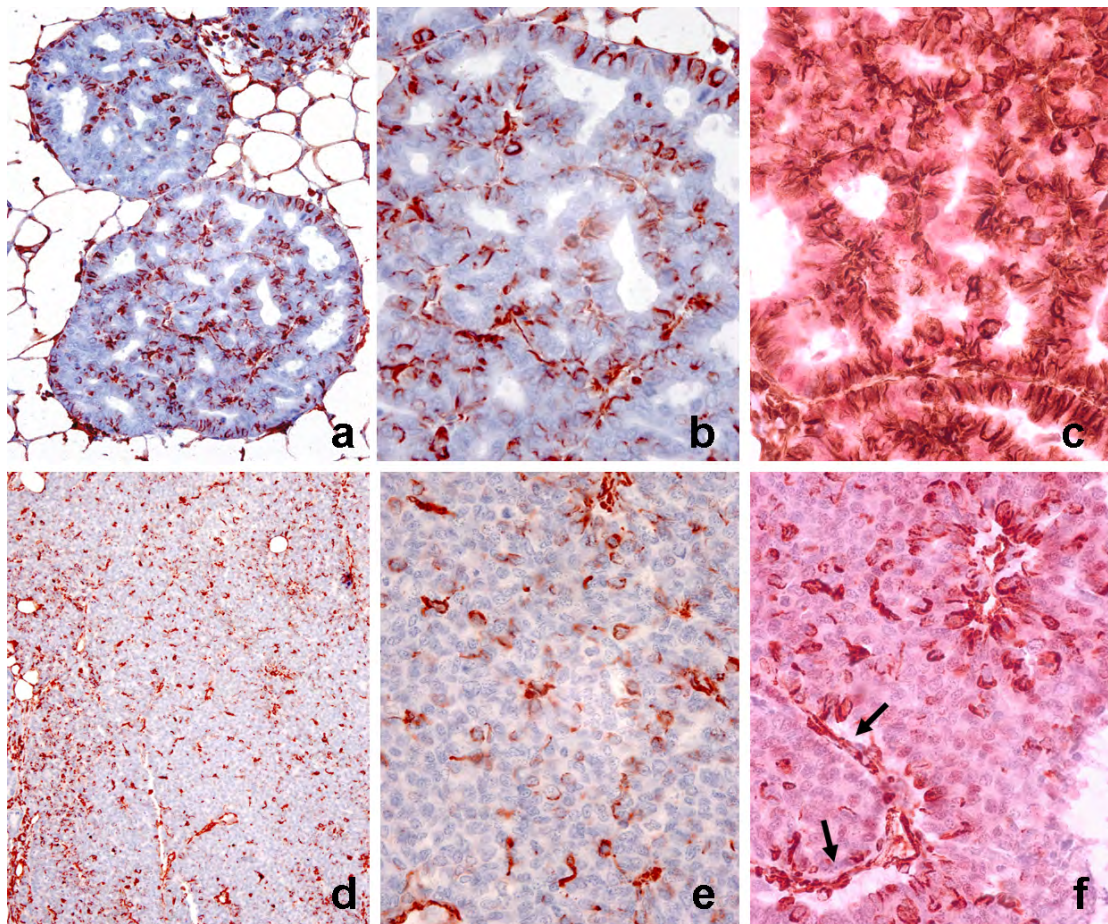


Abb. 4.34: **Mesenchymale Differenzierung muriner Neoplasien.** Vimentin-positive Epithelzellen in CIS-Herden (a-c) und IACs (d-f). Mittels LT-Vimentin-Doppelmarkierung konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den Vimentin-exprimierenden Zellen um Transgen-positive Epithelzellen handelte (c). Zusätzlich stellte sich das Endothel intratumoraler Gefäße als Vimentin-positiv dar (f, Pfeile).

10 % aller Epithelzellen. Das Verteilungsmuster zeigte dabei, daß es sich überwiegend um Zellen im Bereich terminaler Dükte handelte. Obwohl atypische Läsionen nur vereinzelt CK6-positiv waren, zeigte sich überraschenderweise bei diesen Neoplasien ausnahmslos eine zusätzliche Koexpression von CK14 und CK18 (s. Abb. 4.33). Es handelte sich demnach um basal/luminal differenzierte Neoplasien mit fokaler Koexpression von CK6. Weiterhin zeigte sich in jedem dieser Fälle eine ausgesprochen starke Expression von CK6 verglichen mit unauffälligem Drüsengewebe.

Mesenchymal differenzierte Neoplasien Bei Vimentin handelt es sich um einen Marker mesenchymaler Differenzierung. Typischerweise exprimieren neben Fibroblasten, Chondrozyten, Osteozyten und Endothelien auch Myoepithelien Vimentin. Bei der hier durchgeführte Analyse war ein Expressionsmuster ähnlich dem Färbeergebnis für SMA erkennbar. Interessanterweise exprimierten jedoch die Epithelzellen einiger Neoplasien ebenfalls fokal Vimentin (s. Abb 4.34). Um den Nachweis einer tatsächlich epithelialen Expression zu erbringen, wurde daher eine Vimentin-LT-Doppelmarkierung durchgeführt. Hier zeigte sich, daß es sich bei den Vimentin-exprimierenden Zellen eindeutig um glanduläre, LT-positive Epithelzellen handelte, die somit eine mesenchymale Differenzierung aufwiesen (s. Abb 4.34, c + f). Erwartungsgemäß fiel die LT-Markierung entsprechend vorangegangener Erfahrungen in zentralen Abschnitten großer IACs entsprechend schwächer aus.

Zeitpunkt	Linie	Histol. Nr.	Diagnose	CK6	CK14	CK18	SMA	Vimentin	
Tag 30 pw	WAP-T1	11 171	N	1	2	4	1	0	
	WAP-T1	11 216	D	1	2	4	2	0	
	WAP-T1	11 270	D	1	3	4	2	0	
	WAP-T1	11 279	D, CIS	1	2	4	2	0	
	WAP-T1	11 171	D	1	2	3	2	0	
Tag 60 pw	WAP-T1	11 123	D, CIS, IAC	1	2	3-4	1	0	
	WAP-T1	11 162	D, CIS	1	2	3	1	0	
	WAP-T1	11 170	D, CIS	1	2	3	1	0	
	WAP-T1	11 332	D, CIS	1	2	3	1	0	
	WAP-T1	11 353	D, CIS	1	1-2	3	1	1	
Tag 120 pw	WAP-T1	10 770	D, CIS	1	2	3-4	1	0	
	WAP-T1	10 771	D, CIS, IAC	1	2	4	1	0	
	WAP-T1	11 196	D, CIS	1	1-2	4	1	0	
	WAP-T1	11 269	D, CIS	1-2	1-2	4	1	0	
	WAP-T1	11 271	D, CIS, IAC	1	3	4	1	1	
Tag 30 pw	WAP-T-NP8	10 929	N	1	2	3	1-2	0	
	WAP-T-NP8	10 930	D	1	2	4	1	0	
	WAP-T-NP8	10 931	D	1	2	3	2	0	
	WAP-T-NP8	10 932	D	1	2	3	1-2	0	
	WAP-T-NP8	11 281	D	1-2	2	3	1-2	0	
	Tag 60 pw	WAP-T-NP8	10 764	D	1	2	3	1	0
		WAP-T-NP8	10 765	D	1-2	2	3	1	0
		WAP-T-NP8	11 326	D	1	2	3	1	0
		WAP-T-NP8	11 331	D, CIS	2	2	3	1	0
	Tag 120 pw	WAP-T-NP8	11 357	D, CIS	1-2	2	3	1	0
WAP-T-NP8		10 766	D, CIS, IAC	1	1-2	3	1	0	
WAP-T-NP8		10 767	D, CIS, IAC	1	1-2	3-4	1	0	
WAP-T-NP8		11 124	D, CIS, IAC	2	3	2-3	1	1	
WAP-T-NP8		11 125	D, CIS	1	1-2	3	1	0	
WAP-T-NP8	11 195	D, CIS, IAC	1	3-4	3-4	1	1		
Tag 30 pw	WAP-T-NP6	10 1000	D	1	2	3-4	1	0	
	WAP-T-NP6	10 1001	N	1	2	3	1	0	
	WAP-T-NP6	10 1002	N	1	2	3	1	0	
	WAP-T-NP6	10 1004	N	1	2-3	3	1	0	
	WAP-T-NP6	11 399	N	1	2	3	1	0	
	Tag 60 pw	WAP-T-NP6	10 912	N	1	2	3-4	1	0
		WAP-T-NP6	10 913	D	1-2	2	3	1	0
		WAP-T-NP6	10 914	N	1	2	3	1	0
		WAP-T-NP6	11 439	N	1	2	3	1	0
	Tag 120 pw	WAP-T-NP6	11 440	N	1	2	3	1	0
WAP-T-NP6		10 763	N	1	2	3	1	0	
WAP-T-NP6		11 272	N	1	2	3	1	0	
WAP-T-NP6		11 273	D	1	2	3	1	0	
WAP-T-NP6		11 657	N	1	2	3	1	0	
WAP-T-NP6	11 658	N	1	2	3	1	0		
Tag 30 pw	Balb/c	10 631	N	1	2	3	1	0	
	Balb/c	10 702	N	1	2-3	3	1	0	
	Balb/c	10 703	N	1	2	3	1	0	
	Balb/c	10 704	N	1	2	3-4	1	0	
	Balb/c	10 714	N	1	2	3	1	0	
	Tag 60 pw	Balb/c	10 926	N	1	2	4	1	0
		Balb/c	10 927	N	2	2	3-4	1	0
Balb/c		10 928	N	1	2	3	1	0	
Balb/c		10 999	N	1	2	3	1	0	

Tab. 4.1: **Semiquantitative Auswertung terminaler Differenzierungsmarker.** D, Dysplasie; CIS, Carcinoma *in situ*; IAC, invasives Adenokarzinom. Auswertung positiv angefarbter Epithelzellen: negativ (0), < 10 % (1), 11-50 % (2), 51-80 % (3) und 81-100 % (4).

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die SV40-abhängige Karzinogenese muriner Mammakarzinome in einem WAP-T-transgenen Mausmodell anhand histopathologischer und molekularbiologischer Methoden nachzuvollziehen und Einblicke in die Pathogenese zu gewinnen. Da es sich im Gegensatz zu vielen murinen Mammakarzinommodellen hierbei um ein induzierbares Mausmodell handelt, war eine Sicherung der gewebespezifischen Transgenexpression ausschließlich in Epithelzellen der Brustdrüsen und erst nach hormonabhängiger Promoteraktivierung grundlegend. In einer Zeitreihe wurde die Tumorigenese von initialen morphologischen Veränderungen unter dem Einfluß des Transgens bis zur Entstehung invasiver Karzinome analysiert. Der Phänotyp muriner Neoplasien wurde mittels immunhistochemischer Methoden charakterisiert und konnte erste Hinweise auf den zellulären Ursprung der Karzinogenese geben.

5.1 SV40 abhängige Transformation muriner Brustdrüsenepithelien in einem WAP-T-transgenen Mausmodell

Das hier untersuchte Mausmodell basiert auf einem WAP-Promotor gekoppelten Transgenkonstrukt. Es handelt sich dabei um die frühe Genregion des Polyomavirus SV40. Die transformierende Eigenschaft des SV40 beruht auf der Komplexbildung und Inaktivierung von pRb und TP53 durch LT (Sheng et al., 2000; Voorhoeve and Agami, 2003) sowie der Inhibierung der Phosphatase-Aktivität des pp2A durch st, was zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalweges führt (Ali-Seyed et al., 2006; Chen et al., 2004). Ein für die Tumorentstehung wichtiger Aspekt ist dabei die Endoreplikation, welche zuerst zu tetraploiden und anschließend zu aneuploiden Zellen führt (Ramel et al., 1995). Sind pRb und TP53 funktionell inhibiert kommt es zu einem Eintritt der Zelle

in die S-Phase und eine Steigerung der Proliferationsrate ist die Folge. Bei der Entstehung des humanen Mammakarzinoms wird vielfach eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene TP53 und Rb durch Mutation beobachtet. So finden sich in 25 % aller Brustkrebsfälle Mutationen des TP53-Gens, welche zu einem progressiven Krankheitsverlauf sowie einer reduzierten Überlebenszeit führen (Gasco et al., 2002). Zusätzlich korrelieren TP53-Mutationen in Mammakarzinomen mit einer schlechten Differenzierung, hohen Mitoseraten, negativem Hormonrezeptorstatus, aneuploidem DNA-Gehalt und einem hohen Proliferationsindex (Bhargava et al., 1994; Børresen-Dale, 2003). Eine verringerte Expression des pRb durch LOH ist über eine erhöhte Proliferationsrate und eine schlechtere Prognose hinaus mit dem basalen Subtyp des Mammakarzinoms assoziiert (Herschkowitz et al., 2008).

Im Unterschied zu murinen Mammakarzinommodellen mit konstitutiver Transgenexpression handelt es sich bei dem WAP-T-transgenen Mausmodell um ein System mit induzierbarer Expression des Transgens. Die Kopplung des Transgens an den WAP-Promoter führt zu einer Expression der frühen Region des SV40 während der späten Schwangerschaft und der Laktation (Pittius et al., 1988). Somit kommt es erst nach vollständiger Ausreifung der Brustdrüsen zu einer Transformation. Ähnlich der humanen Situation stellen zahlreiche *Remodelling*-Prozesse während der Schwangerschaft und der sich daran anschließenden Involution für das Mammagewebe eine vulnerable Phase dar. Zwar wurde die Schwangerschaft über viele Jahre als ein eher protektiver Faktor für die Entstehung des Mammakarzinoms gewertet (Henderson et al., 1974; Kelsey et al., 1993; MacMahon et al., 1970), es häufen sich allerdings Hinweise, daß durch die vermehrten Umwandlungsprozesse Zellen mit Mutationen wie z.B. TP53-Mutationen selektiert werden (Daling et al., 2002; Vousden and Prives, 2005). Sogenannte Schwangerschafts-assoziierte Mammakarzinome treten innerhalb der ersten Jahre nach einer Schwangerschaft auf, betreffen überwiegend jüngere Frauen und gehen mit einer schlechten histologischen Differenzierung und Prognose einher (Kroman and Mouridsen, 2003; Middleton et al., 2003; Reed et al., 2003).

Linien des in unserem Institut generierten Mausmodells entwickelten mit 93 % (WAP-T1), 96 % (WAP-T-NP8) und 27 % (WAP-T-NP6) signifikant häufiger Mammakarzinome als Balb/c- Wildtyp-Kontrollen, die in nur 4 % spontane, d.h. Transgen-unabhängige Mammakarzinome zeigten. Die transformierende Eigenschaft des SV40 konnte somit

in einem *in vivo* Modell belegt werden. Analog wurde in den untersuchten Mauslinien ein linienspezifisches Expressionsmuster des Transgens während der Laktation nachgewiesen. Neben der Linie WAP-T-NP6, die in nur 3 % aller Brustdrüsenepithelien eine mono- bis paucifokale Expression aufwies, zeigten die Linien WAP-T-NP8 und WAP-T1 mit 46 % bzw. 89 % eine vergleichsweise hohe Transgenexpression mit multifokalem bzw. globalem Expressionsmuster. Im Zusammenhang mit dem sehr hohen Expressionsniveau traten in Tieren der Linie WAP-T1 bereits zum Zeitpunkt der Laktation und damit maximal 11 Tage nach Beginn der Transgenexpression erste morphologische Veränderungen auf. Neben beginnenden Präneoplasien im Sinne einer Dysplasie fand sich in vereinzelt Brustdrüsen unvollständig ausgebildetes Laktationsgewebe mit einem erhöhten Adipozytenanteil und einem verringerten Anteil an Brustdrüsenepithelien. Diese Veränderungen sind am ehesten als Folge der Transgenexpression zu werten, da für LT bereits eine erhöhte Apoptoseinduktion während der späten Schwangerschaft beschrieben wurde, die zu einem unvollständig entwickelten Laktationsgewebe führte (Tzeng et al., 1996).

Die Beobachtung der linienspezifisch stark variierenden Transgenexpression korrespondierte mit der mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesenen Transgentranskription. Verglichen mit Tieren der Linien WAP-T1 und WAP-T-NP8 konnte in Brustdrüsen der Linie WAP-T-NP6 eine geringere Transkription aufgrund verminderter Bandenintensität angenommen werden. Die variable Transgentranskription und -translation läßt sich zum Teil mit der unterschiedlichen Anzahl der Integrationen des Transgens erklären. So ergab die Southern Blot-Analyse eine stabile Integration des Transgens für die Linie WAP-T1 an drei Integrationsorten. Bei der Linie WAP-T-NP8 dagegen war ein partieller Transgenverlust zu verzeichnen. Einige Tiere wiesen drei, andere zwei Integrationsorte auf, was allerdings keinen Einfluß auf die konstante Transgenexpression zu haben schien. Die Linie WAP-T-NP6 zeigte nur einen konstanten Integrationsort. Als weitere Erklärung muß der Positionseffekt als Resultat der ungerichteten Transgenintegration in das murine Genom angenommen werden. Da die Transgensequenz nach Mikroinjektion in Vorkerne fertilisierter Eizellen an zufälliger Position des Mausgenoms integriert wird, kann sie unter den Einfluss spezifischer Regulationselemente geraten, welche die Genexpression kontrollieren. Es handelt sich dabei um Elemente, die die Transkription eines Gens sowohl stimulieren (*Enhancer* Sequenzen) als auch inhibieren können (*Si-*

lencer Sequenzen). Die effektive Transgenexpression ist demnach in hohem Maße vom Integrationsort abhängig und kann zwischen verschiedenen transgenen Linien erheblich variieren (Palmiter and Brinster, 1986).

Anhand immunhistochemischer und molekularbiologischer Analysen konnte die Gewebespezifität der Transgentranskription und -expression in unserem Modell nachgewiesen werden. Mittels semiquantitativer RT-PCR und immunhistochemischer Färbungen wurde belegt, daß die Transkription und Translation des Transgen durch Kopplung an den WAP-Promoter nahezu ausschließlich erst nach Induktion und in epithelialen Zellen des Brustdrüsengewebes stattfand. Es zeigte sich eine für den WAP-Promoter bekannte mosaikartige Expression, bei der die transgenen Proteine nur in einer Auswahl von Mammaepithelzellen nachgewiesen werden konnten (Robinson et al., 1995). Als Ursachen für dieses Phänomen werden zellspezifische Transgeninaktivierungsmechanismen diskutiert, die im Zusammenhang mit dem Integrationsort, der Anzahl der an einem Ort integrierten Transgenkopien sowie zellspezifischen Methylierungsprozessen stehen (Dobie et al., 1997). Lediglich in einem Fall fanden sich in der immunhistochemischen Färbung wenige LT-positive Zellen außerhalb des Brustdrüsengewebes in einer sublingualen Speicheldrüse. Die bereits in der Literatur beschriebene minimale und nicht durch Laktation induzierbare Expression des WAP-Promoters im Gewebe der Speicheldrüsen läßt sich vermutlich auf die ontogenetische Verwandtschaft des Brust- und Speicheldrüsenorgans zurückführen (Pittius et al., 1988). Da es sich in diesem Fall um ein Tier zum Zeitpunkt der Laktation handelte, war keine Aussage zu einer späteren Transformation der transgenexprimierenden Epithelzellen zu treffen. Allerdings konnte in keinem untersuchten Tier der Langzeitstudie ein Speicheldrüsentumor nachgewiesen werden. Das Auftreten einer Transgenexpression in nur zwei von 30 immunhistochemisch untersuchten Brustdrüsen (7 %) bzw. einer von 18 mittels RT-PCR analysierten Mammas (6 %) bestätigte die überwiegend induktionsabhängige Transgenexpression. Seltene Fälle induktionsunabhängiger Expression sind am ehesten auf eine Östrus-beeinflußte Promoteraktivierung zurückzuführen (Pittius et al., 1988).

5.2 Schwangerschafts-assoziierte Progenitorzellen der Brustdrüse als Zielzellen der SV40 induzierten Karzinogenese

Überraschenderweise konnte die erwartete zeitliche Limitierung der Transgenexpression durch die Abhängigkeit des WAP-Promoters von laktotrophen Hormonen in unserem Modell nicht nachvollzogen werden. Nach abgeschlossener Involution fanden sich bei allen Tieren der Linien WAP-T-NP8 und WAP-T1 sowie bei 25 % der WAP-T-NP6 Mäuse im Bereich distaler Azini weiterhin transgenpositive Zellen. Obwohl ihre Anzahl durch die zuvor durchlaufene Involution stark reduziert war, machte sie in WAP-T1 Tieren noch immer durchschnittlich 48 % des Brustdrüsenepithels aus. Da alle detektierten präneoplastischen und invasiven Läsionen einer strikten Transgenabhängigkeit unterlagen, waren diese Zellen als Fokus einer potentiellen Karzinomentwicklung zu betrachten. Es stellte sich somit die Frage, warum trotz mangelnder Stimulation des endogenen und exogenen WAP-Promoters durch laktotrophe Hormone transgenpositive Epithelzellen nachweisbar waren, welche offensichtlich in der Lage waren der involutionsbedingten Apoptose zu entgehen.

Tiere der Linien WAP-T-NP8 und WAP-T1 zeigten bereits zum Zeitpunkt der Transgeninduktion eine weit höhere Anzahl transgenexprimierender Epithelzellen der Brustdrüse als Mäuse der Linie WAP-T-NP6. Analog entwickelten diese Linien weit häufiger invasive Adenokarzinome. Fraglich war demnach, ob es sich um ein stochastisches Ereignis handeln konnte und die Wahrscheinlichkeit einer transgenpositiven Zelle, die Involution zu überleben, mit der Gesamtzahl der transgenpositiven Epithelzellen steigt. Bei näherer Betrachtung der Linie WAP-T-NP6 scheint dieser Erklärungsansatz jedoch unwahrscheinlich. Trotz eines äußerst geringen Expressionsniveaus mit durchschnittlich 3 % aller Epithelzellen zum Zeitpunkt der Laktation, wiesen 25 % der Mäuse nach abgelaufener Involution weiterhin eine überwiegend monofokale Transgenexpression auf. 27 % der in einer Langzeitstudie untersuchten Tiere entwickelten ein invasives Karzinom. Es muß somit davon ausgegangen werden, daß die Expression des Transgens in WAP-T-NP6 Mäusen nach Ablauf der Involution und einer sehr langen Latenzzeit unweigerlich zur Entwicklung eines Mammakarzinoms führt. Folglich scheint die Anzahl

transgenexprimierender Epithelzellen nicht allein entscheidend für die SV40-abhängige Transformation zu sein.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, daß es sich bei den LT-positiven Epithelzellen nach Ablauf der Involution um eine Subpopulation von Zellen handelt, denen besondere Eigenschaften zuzuschreiben sind. Nicht nur ist es ihnen offenbar möglich, der involutionsbedingten Apoptose zu entgehen, auch weist die anschließende Proliferation im Rahmen der Karzinogenese überraschende Charakteristika auf. Anstatt unkontrolliert und strukturüberschreitend zu wachsen, imitieren die proliferierenden Zellen über einen langen Zeitraum das Wachstumsmuster unauffälliger, funktioneller LA-Einheiten mit Bildung neuer duktulo-lobulärer Strukturen. Das Wachstum schreitet dabei von distal nach zentral voran, da alle, die Involution überlebenden Zellen in distalen LA-Einheiten lokalisiert sind. Diese Eigenschaften in Kombination mit der Lokalisation sind in vorangegangenen Studien als charakteristisch für Stamm- oder Progenitorzellen beschrieben worden.

Zahlreiche experimentelle Studien belegen, daß die Brustdrüse neben terminal differenzierten luminalen und myoepithelialen Zellen weiterhin Zellen mit multipotentem Differenzierungspotential und Stammzellcharakteristika enthält (Kordon and Smith, 1998; Péchoux et al., 1999; Chepko and Smith, 1997). Neuere Konzepte gehen von einer zellulären Hierarchie aus, bei der aus multipotenten Stammzellen linienspezifische Vorläuferzellen (Progenitorzellen) entstehen, welche in weiteren Differenzierungsschritten zur Entwicklung terminal differenzierter somatischer Zellen führen (s. Abb. 5.1). Die gewebespezifischen Stammzellen der Brustdrüse werden dabei durch ihre Fähigkeit sich selbst zu erneuern und alle differenzierten duktafen und lobulären Komponenten des epithelialen Drüsenbaums zu bilden definiert. Progenitorzellen zeichnen sich durch ihre hohe Proliferationskapazität bei mehr oder weniger determiniertem Funktionsbereich aus.

Hinweise darauf, daß die Tumorigenese WAP-T-transgener Mammakarzinome von multipotenten Stammzellen oder linienspezifische Progenitorzellen der Brustdrüse ihren Ausgang nimmt, ergeben sich bei näherer Betrachtung der phänotypischen und immunhistochemischen Charakteristika entstehender Neoplasien. So handelt es sich bei den in unserem Modell entstehenden Tumoren durchweg um hormonrezeptornegative

Läsionen. Da bereits auf Ebene frühester Dysplasien Östrogen- und Progesteronrezeptoren verloren gingen, ist anzunehmen, daß der Rezeptorverlust nicht einer fortschreitenden Dedifferenzierung im Rahmen der Karzinogenese zuzuschreiben ist. Viel eher handelt es sich bei den proliferierenden, LT-positiven Zellen von vorne herein um hormonrezeptornegative Zellen. Entsprechend vorangegangener Untersuchungen exprimieren Stammzellen der murinen Brustdrüse keine Östrogenrezeptoren (Sleeman et al., 2007). Stattdessen wird ER bei etwa 40 % der luminalen Zellen nachgewiesen. Durchflußzytometrische Analysen belegen weiterhin, daß innerhalb des luminalen Zellkompartiments zwei Zelltypen unterschieden werden können: ein ER-positiver Subtyp und ein Milchprotein-anreichernder Subtyp (s. Abb. 5.1). Aus der Tatsache, daß Zellen mit Progenitorzeleigenschaften sich überwiegend unter den Milchprotein-anreichernden Epithelzellen fanden, wurde geschlossen, daß es sich um alveoläre Progenitorzellen handeln könnte. In von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Genexpressionanalysen konnte eine signifikant höhere Genexpression Laktations-assoziiierter Milchproteine (z.B. WAP, Caseine, Laktalbumin) in Brustdrüsen WAP-T-transgener Mäuse nach abgeschlossener Involution verglichen mit Balb/c Wildtypkontrollen nachgewiesen werden. Zudem fanden sich bei histopathologischer Begutachtung der entstehenden Läsionen immer wieder standardmorphologische Hinweise auf eine Milchproduktion (z.B. apikale Vesikel in luminalen Epithelzellen, intraluminales Sekret).

Wagner et al. demonstrierten in einem murinen Tiermodell die Existenz Schwangerschafts-assoziiierter, alveolärer und WAP-exprimierender Progenitorzellen. Diese waren in distalen LA-Einheiten lokalisiert, überlebten die der Laktation folgende Involution und führten bei einer weiteren Schwangerschaft zu einer klonalen Expansion des Drüsengewebes unter Ausbildung physiologischer duktulo-lobulärer Strukturen (Wagner et al., 2002). Zudem kam es im Verlauf folgender Schwangerschaften zu einer Anreicherung dieser Zellen. Die dargestellten Ergebnisse können in unserem Mausmodell nachvollzogen werden. So wurde bei Tieren der Linie WAP-T-NP6 mit einer erneuten Schwangerschaft eine erheblich höhere Tumorzinzidenz beobachtet. Entwickelten nach der ersten Induktion des Transgens nur 27 % (7/26) der Tiere ein invasives Adenokarzinom, waren es nach der zweiten Schwangerschaft bereits 81 % (21/26). Nur durch eine Schwangerschafts-induzierte Vermehrung des Progenitorzellkompartiments lassen sich diese Befunde hinreichend erklären.

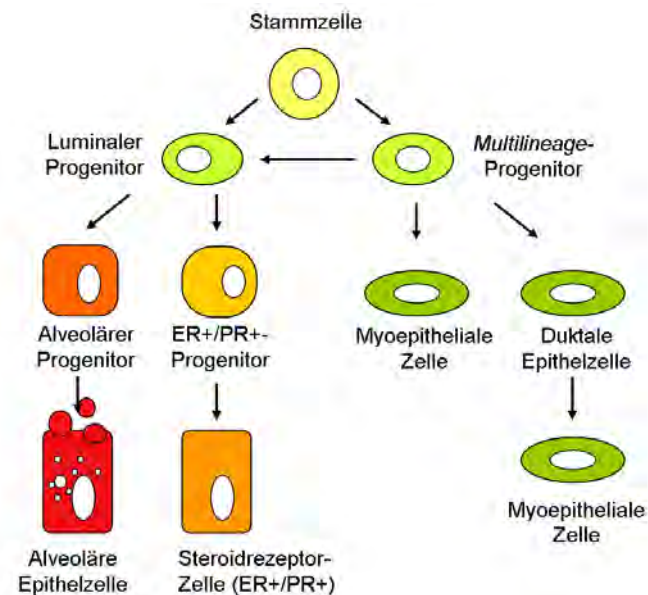


Abb. 5.1: **Schematische Darstellung der Stamm- und Progenitorzellhypothese.** Modifiziert nach Stingl und Caldas (Stingl and Caldas, 2007).

Zusätzliche Anhaltspunkte für eine von alveolären Progenitorzellen der Brustdrüse ausgehende Karzinogenese finden sich in bei der Betrachtung des Trangenkonstruktes selbst. Zum einen ist es sicherlich nicht überraschend, daß bei der Verwendung des WAP-Promoters Milchprotein-exprimierende Zellen betroffen sind. Zum anderen ist in vorangegangenen Studien die Empfänglichkeit von Zellen mit Progenitorzeleigenschaften gegenüber SV40-gesteuerter Transformation beschrieben worden. So konnte in Zellkulturversuchen gezeigt werden, daß humane Epithelzelllinien der Brustdrüse mit den Charakteristika luminaler Progenitorzellen bzw. Stammzellen für die Immortalisierung nach SV40 LT-Transfektion sehr viel empfänglicher sind als Zelllinien mit dem Phänotyp epithelialer Basalzellen (Sun et al., 1999). In *Knock-out* Mäusen führt der Verlust von TP53, p16^{INK4a} und p19^{ARF} zu einer erhöhten Anzahl multipotenter Progenitorzellen des hämatopoetischen Systems (Akala et al., 2008). Da diese Signalwege häufig bei der Entstehung von Tumorerkrankungen involviert sind, liegt die Vermutung nahe, daß Progenitorzellen auch hier als Zielzelle maligner Entartung anzusehen sind. Zwar konnte ein solcher Mechanismus für die Brustdrüse bislang nicht bestätigt werden, auffallend ist jedoch die Übereinstimmung der an der Karzinogenese in WAP-T-transgenen Mäusen beteiligten Gene. Durch das SV40 LT kommt es zu einer funktionellen Inaktivierung des TP53. Zudem wurden WAP-T-transgene Mäuse in einen Balb/c Hintergrund

zurückgekreuzt. Diese Mäuse wiederum tragen eine Punktmutation im *Cdkn2a*-Lokus, die sich auf zwei Gene mit überlagernden Leserastern auswirkt: p16^{INK4a} und p19^{ARF}.

Auch immunhistochemische Analysen des Zytokeratinexpressionsmusters weisen auf einen Ausgang der Karzinogenese von einer Subpopulation multipotenter Zellen hin. Ein Großteil der entstehenden Neoplasien in WAP-T-transgenen Mäusen aller drei Linien zeichnete sich durch ein streng luminales, CK18-positives Expressionsmuster aus. Zudem fanden sich jedoch immer wieder Neoplasien mit einer Koexpression von CK18 und dem basalen Zytokeratin CK14. Daß es sich bei diesen Läsionen um von myoepithelialen Zellen ausgehende oder myoepithelial differenzierte Neoplasien handelte, konnte ausgeschlossen werden. Zum einen unterschieden sich die Läsionen morphologisch nicht von rein luminal differenzierten Neoplasien, zum anderen exprimierten sie zudem CK18 als Marker ausgereifter glandulärer Differenzierung. Diese gemischten Expressionmuster traten in Dysplasien, *in situ* Karzinomen und invasiven Adenokarzinomen gleichermaßen auf, was einen Effekt zunehmender Dedifferenzierung im Laufe der Karzinogenese unwahrscheinlich macht. Frühe Progenitorzellen mit der Fähigkeit sich in myoepitheliale/basale sowie luminalen Zellen zu differenzieren bieten einen Erklärungsansatz für diese diverse Markerexpression. Für die humane Situation ist ein solches Modell als Folge immunhistochemischer Studien bereits beschrieben worden. Bei diesem sog. Progenitorzellkonzept wird von einem CK5/14-positiven Progenitorzellkompartiment ausgegangen, welches über glanduläre (CK5/14/18-positiv) und myoepitheliale (CK5/14/SMA-positiv) Intermediärzellen zur Entstehung terminal differenzierter, CK18-positiver luminaler Zellen und SMA-positiver myoepithelialer Zellen führt (Boecker et al., 2002; Bánkfalvi et al., 2004). Vermeintliche *Multilineage*-Progenitorzellen mit sowohl luminaler als auch basaler Markerexpression fanden sich zudem bei *in vitro* Versuchen. Hier wurden Zellen mit der Fähigkeit vollständige duktulo-lobuläre Strukturen mit intaktem Myoepithel und angrenzender Basalmembran zu bilden durch einen CK19⁺ CK14⁺ EpCAM^{high} CD49f⁺ MUC1⁻ SSEA-4^{high}-Phänotyp charakterisiert (Gudjonsson et al., 2002; Villadsen et al., 2007). Da CK19 und CK18 beide zu den luminalen Zytokeratinen zählen und in der Brustdrüse ein korrespondierendes Expressionsmuster aufweisen (Moll et al., 1982), ist davon auszugehen, daß es sich bei CK19/14-positiven und CK18/14-positiven Epithelzellen um den gleichen Phänotyp handelt.

Interessanterweise konnte in einigen Fällen sowohl in intraepithelialen Neoplasien als auch in invasiven Mammakarzinomen eine fokale Expression von CK6 beobachtet werden. In der Literatur ist CK6 als hyperproliferatives Zytokeratin beschrieben worden. Es wird während der Organogenese der Brustdrüse vermehrt im Bereich proliferierender TEBs nachgewiesen (Sapino et al., 1993; Smith et al., 1990) und gilt als potentieller Stamm-/Progenitorzellmarker (Grimm et al., 2002; Li et al., 2003; Stingl et al., 2006; Villadsen et al., 2007). Bei der Analyse unauffälligen, reifen Brustdrüsengewebes fand sich in unserem Mausmodell eine spärlich positive Expression für CK6 in weniger als 10 % aller Epithelzellen. Es handelte sich dabei überwiegend um Zellen im Bereich terminaler Ducte, passend zu dem für Progenitorzellen beschriebenen Verteilungsmuster. Obwohl atypische Läsionen nur vereinzelt CK6-positiv waren, zeigte sich überraschenderweise bei diesen Neoplasien ausnahmslos eine zusätzliche Koexpression von CK14 und CK18. Weiterhin war in jedem dieser Fälle anhand der Färbeintensität eine ausgesprochen starke Expression von CK6 im Vergleich zu unauffälligem Drüsengewebe nachweisbar.

Smith et al. trafen bei der Analyse muriner Brustdrüsen auf eine Population CK6/14-positiver luminaler Epithelzellen, die in der duktulolobulären Wachstumsphase während der frühen Schwangerschaft massiv proliferierten und sich im Bereich neu gebildeter, sekretorischer Azini befanden (Smith et al., 1990). Nach abgeschlossener Involution persistierte eine weit geringere Zahl dieser Zellpopulation, wie in unserem Modell, im Bereich terminaler Ducte. Der Nachweis dieses definierten Expressionsmusters in unserem Mausmodell zählt sicherlich zu den überzeugendsten Argumenten für die Beteiligung Schwangerschafts-assoziiierter Progenitorzellen an der SV40-vermittelten Karzinogenese.

Allerdings scheint die Expression des Transgens in Progenitorzellen nicht für die Induktion und Progression muriner Mammakarzinome auszureichen. So wiesen Tiere im Rahmen einer Langzeitstudie zum Zeitpunkt der Präparation in allen untersuchten Brustdrüsen ausgedehnte intraepitheliale Neoplasien auf, die immunhistochemisch durchweg LT-positiv waren. Überraschend war, daß trotz der Vielzahl potentiell zur Invasion befähigten Herde tatsächlich nur einzelne invasive Adenokarzinome entstanden. Ähnliche Phänomene sind für das humane DCIS bereits beschrieben worden. So berichteten Page et al., daß 28 % aller Patienten mit einem *low grade* DCIS nach durch-

schnittlich 6 Jahren, 40 % allerdings erst nach etwa 30 Jahren an einem invasiven Mammakarzinom erkrankten (Page et al., 1982). Weitere Studien zeigten, daß nach unvollständiger Exzision eines *high grade* DCIS etwa 60% der betroffenen Patienten nach durchschnittlich 5 Jahren ein invasives Mammakarzinom entwickelten (Silverstein et al., 1995). Diese Befunde weisen darauf hin, daß in Abhängigkeit von der jeweiligen Präneoplasie die Akkumulation weiterer Alterationen notwendig ist, um zu einer endgültigen malignen Transformation zu führen.

In Zellkulturversuchen konnte belegt werden, daß SV40-transfizierte humane Epithelzellen der Brustdrüse erst in Anwesenheit der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) zu einer vollständigen onkogenen Transformation fähig sind (Elenbaas et al., 2001). Dabei kommt es in einem ersten Schritt zu einer Umgehung des zellulären Alterungsprozesses (Seneszenz) durch LT-vermittelte Inaktivierung von TP53 und pRb. Die sich daran anschließende Immortalisierung wird durch hTERT vorangetrieben. hTERT ist die enzymatisch aktive Untereinheit der humanen Telomerase; ein Ribonukleoprotein, welches die Elongation der während der Replikation gekürzten Chromosomenenden (Telomere) gewährleistet. Durch eine Inhibierung der Phosphatase-Aktivität des pp2A und einer konsekutiven Aktivierung des Wnt-Signalweges trägt st zur Transformation der Zelle bei (Hahn et al., 2002). Für die endgültige Transformation ist schlußendlich die Einführung eines weiteren Onkogens notwendig. So wurde in den dargestellten Versuchen aktiviertes H-ras eingesetzt.

Eine Assoziation von TERT mit Stamm-/Progenitorzellen der Brustdrüse ist zwar bislang rein hypothetischer Natur, allerdings führte die Induktion von TERT in murinen Tiermodellen zu einer maßgeblichen Expansion multipotenter Stammzellen der Haut und Haarfollikeln (Flores et al., 2005; Sarin et al., 2005) und darüber hinaus zur Entstehung spontaner Mammakarzinome (Artandi et al., 2002). Bei der Untersuchung unseres Mausmodell konnte eine Aktivierung der Telomerase interessanterweise erst auf Ebene invasiver Mammakarzinome nachgewiesen werden, während sich Brustdrüsengewebe bis zum 90. Tag pw überwiegend als Telomerase-negativ darstellte. Da allerdings ein Großteil der intraepithelialen Neoplasien nicht zur endgültigen Transformation befähigt ist, kann davon ausgegangen werden, daß einzelne Läsionen mit einer Telomerase-Aktivierung potentielle Foki maligner Entartung darstellen.

In dem hier vorgestellten WAP-T-transgenen Mausmodell stagniert die Mehrzahl SV40-induzierter Läsionen der Brustdrüse offenbar auf Ebene intraepithelialer Neoplasien. Die linienspezifisch stark unterschiedlichen Latenzzeiten bis zum Auftreten invasiver Adenokarzinome scheint diese Hypothese zu stützen. Während Tiere der Linien WAP-T-NP8 und WAP-T1 mit durchschnittlich 8 bzw. 9 Monaten bis zum Auftreten muriner Mammakarzinome eine vergleichbar kurze Latenzzeit aufweisen, entwickeln WAP-T-NP6 Mäuse erst nach durchschnittlich 16 Monaten Tumore. Da WAP-T-NP6 Mäuse zumeist mono- bis paucifokale intrapitheliale Neoplasieherde aufweisen, könnte hier tatsächlich die geringe Wahrscheinlichkeit weitere genetische Alterationen zu akkumulieren zu einer verzögerten Karzinomentstehung führen. Vermutlich weisen Mäusen der Linie WAP-T-NP6 infolgedessen eine Latenzzeit auf, die mit der Zeitspanne bis zur Entstehung sporadischer, transgenunabhängiger Adenokarzinome in Balb/c Wildtyp-Kontrollen vergleichbar ist (durchschnittlich 16 Monate). In dieser Tatsache begründet sich zudem ein weiteres Argument für die Beteiligung von Progenitorzellen an der Karzinogenese in WAP-T-transgenen Mauslinien. Es wird angenommen, daß für die maligne Transformation einer humanen Zellen fünf und für die Entartung muriner Zellen drei Mutationsereignisse notwendig sind (Hahn et al., 1999; Hahn and Weinberg, 2002). Dementsprechend wären nur Zellen mit einer entsprechend langen Lebensdauer, vermutlich also Stamm- oder Progenitorzellen, in der Lage, ausreichend Mutationen zu akkumulieren.

Alle bisher dargestellten Ergebnisse lassen folgende hypothetische Schlussfolgerung zu: die Expression der frühen Genregion des SV40 führt in WAP-T-transgenen Mäusen zur Immortalisierung epithelialer Progenitorzellen der Brustdrüse. Aufgrund einer LT-vermittelten Proliferation entstehen anschließend intraepitheliale Neoplasien klonalen Ursprungs. Die SV40-induzierte Aneuploidie führt zur Akkumulation weiterer onkogener Alterationen wodurch es zur malignen Transformation und damit zur Entstehung invasiver Mammakarzinome kommt. Dabei scheint es sich überwiegend um eine Immortalisierung alveolärer, vermutlich Schwangerschafts-induzierter Progenitorzellen zu handeln, deren Transformation zu Neoplasien mit einem rein luminalen Phänotyp führt. Allerdings scheinen auch *Multilineage*-Progenitorzellen eine Rolle bei der Tumorigenese transgeninduzierter Mammakarzinome zu spielen, welche folglich eine luminal/basale Mischdifferenzierung aufweisen. Anzumerken bleibt, daß für *Multilineage*-

Progenitorzellen die Fähigkeit beschrieben ist, sich in alveoläre Progenitorzellen differenzieren zu können, so daß schlußendlich auch streng luminal differenzierte Neoplasien aus *Multilineage*-Progenitorzellen entstanden sein könnten. Daß die Anwesenheit von TERT in Zellkulturversuchen unabdingbar für die Immortalisierung SV40-transfizierter epithelialer Brustdrüsenzellen ist, legt die Vermutung nahe, daß nur Progenitorzellen mit nachweisbarer Telomeraseaktivität zu einer malignen Transformation befähigt sind.

5.3 WAP-T-transgene Mäuse als Progressionsmodell für den basalen Subtyp des Mammakarzinoms

Die Klassifikation des humanen Mammakarzinom ist seit einigen Jahren einem enormen Wandel unterlegen. Mit der Einführung der Genexpressionsanalysen wurden neue, prognostisch relevante Subgruppen identifiziert, welche zusätzliche Informationen zu der klassischen WHO-Klassifikation des Mammakarzinoms enthalten (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). Entsprechend ihres Genexpressionsprofils wurden lumbale, HER2-positive, basale und *normal breast-like* Subtypen unterschieden. Während lumbale Tumore, die sich durch die Expression lumbaler Keratine (CK7, CK8, CK18 und CK19) auszeichnen, neben einer hohen ER-Expression vor allem eine vergleichsweise gute Prognose aufweisen, sind der basale und der HER2-positive/ER-negative Subtyp mit einer ausgesprochen schlechten Prognose assoziiert (Sørlie et al., 2001). In weiteren Studien wurden lumbale Karzinome in stark ER-positive Luminal-A- und Luminal-B-Subtypen stratifiziert. Luminal-B Mammakarzinome waren mit einer nur gering- bis mäßiggradigen Expression lumbal-spezifischer Gene assoziiert und konnten zudem eine HER2-Expression aufweisen. Der basale Genotyp korreliert neben der Überexpression basaler Zytokeratine (CK5/6, CK14, CK15 und CK17) mit dem sogenannten „triple-negativen“ Phänotyp (ER-negativ, PR-negativ, HER2-negativ).

Die biologische Heterogenität humaner Mammakarzinome führt klinisch und prognostisch zu relevanten Unterschieden. Insbesondere die weitere Subtypisierung im Rahmen von Genexpressionsanalysen hat daher erneut die Frage aufgeworfen, ob diese Unterschiede Hinweis darauf geben, daß Mammakarzinome von verschiedenen Ur-

sprungszellen ihren Ausgang nehmen. Bereits in der Vergangenheit hatte die Weiterentwicklung molekularer Methoden zur Entwicklung eines komplexen Progressionsmodells geführt, bei welchem von der frühen Determinierung eines gut und eines schlecht differenzierten Entwicklungszweiges ausgegangen wird (Simpson et al., 2005). Gerade dieses allgemein akzeptierte Modell zur Entstehung des Mammakarzinoms läßt sich hervorragend mit der Existenz von Stamm-/Progenitorzellen als Zielzellen der Karzinogenese begründen.

Bei dem hier vorgestellten Mausmodell findet die Karzinogenese im Rahmen einer linearen, schrittweisen Entdifferenzierung definierter Vorstufen statt (s. Abb. 5.2). Bereits auf der Stufe früher intraepithelialer Neoplasien zeichnete sich ein hormonrezeptornegativer Phänotyp ab. Die Beurteilung des c-ErbB2-Rezeptors dagegen muß insgesamt als eingeschränkt betrachtet werden. Immunhistochemisch wiesen zwar alle Läsionen vom Auftreten erster Dysplasien bis zur Entwicklung invasiver Karzinome unabhängig vom histologischen Subtyp eine starke membranöse Färbung für c-ErbB2 (HER2) auf, allerdings fand sich zudem eine mäßige zytosolische Anfärbung, die in schwächerer Ausprägung auch von morphologisch unveränderten Epithelien aufgewiesen wurde. Weiterführende CGH- und Genexpressionsanalysen unserer Arbeitsgruppe zeigten weder eine Amplifikation des c-ErbB2 Gens noch eine Überexpression des Wachstumsrezeptors im Vergleich zum Normalgewebe. Somit ist prinzipiell davon auszugehen, daß es sich in unserem Modell um triple-negative Läsionen handelt.

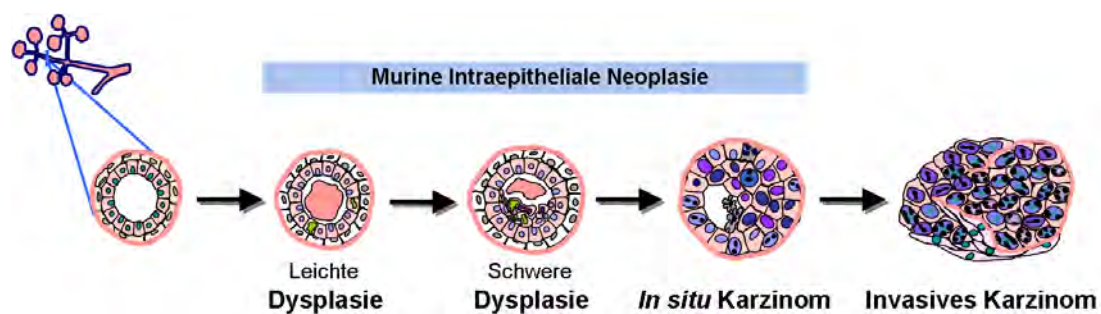


Abb. 5.2: **WAP-T-transgene Mäuse als lineares Progressionsmodell für die Karzinogenese des Mammakarzinoms.**

Bei den in unserem Modell entstehenden invasiven Mammakarzinomen handelte es sich zu etwa gleichen Anteilen um gut differenzierte (G1 und G2) sowie um schlecht differenzierte Tumore (G3 und G4). Korrespondierend hierzu fanden sich in vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe Hinweise auf die Existenz eines hoch malignen und eines besser differenzierten Entwicklungszweiges (Heinlein, 2006), ähnlich der humanen Situation.

CGH-Analysen der Linie WAP-T1 zeigten, daß zwischen differenzierten (G1 und G2) und undifferenzierten (G3 und G4) Mammakarzinomen keine übereinstimmenden Genamplifikationen nachweisbar waren (Heinlein, 2006). Dabei wiesen undifferenzierte Adenokarzinome im Gegensatz zu differenzierten Tumoren neben individuell unterschiedlichen Mutationen eine Anzahl gemeinsam amplifizierter Gene auf. So fand sich in fünf von sieben (71 %) untersuchten G3 und G4 differenzierten Tumoren eine Amplifikation des *mesenchymal-epithelial transition factor* (c-Met), welche mit einer 50- bis 100-fach erhöhten Transkription der c-Met mRNA korrelierte. Gut differenzierte G1 und G2 Tumore hingegen wiesen in nur 13 % (1/8 Tiere) und damit signifikant weniger häufig eine Amplifikation des c-Met Gens auf.

Das c-Met Onkogen kodiert für einen Tyrosinkinase Rezeptor, den *hepatocyte growth factor receptor* (HGFR), welcher eine Rolle spielt während der Morphogenese, Proliferation und Metastasierung (Birchmeier et al., 2003). c-Met ist ein wichtiger Regulator der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), bei der im Rahmen der Progression maligner Tumore epitheliale Zellen in einen motilen mesenchymalen Phänotyp transformiert werden. Infolgedessen sind sie in der Lage sich aus dem Zellverband zu lösen, zu migrieren und schließlich zu metastasieren. In 15-20 % aller humanen Mammakarzinome findet sich eine Überexpression des c-Met Proteins, welche zudem mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Ghoussoub et al., 1998; Kang et al., 2003; Lengyel et al., 2005). Weiterhin konnte in Mausmodellen mit einer Überexpression des HGFR oder einer c-Met Mutation innerhalb des Brustdrüsenepithels die Entstehung invasiver Tumore beobachtet werden (Gallego et al., 2003; Takayama et al., 1997).

Vimentin, als Indikator mesenchymaler Differenzierung, stellt einen verlässlichen Marker der EMT dar. Bei der immunhistochemischen Analyse unseres Tiermodells konnte in vereinzelt präneoplastischen und neoplastischen Läsionen eine fokale Vimen-

tin-Expression nachgewiesen werden. Anhand einer Immundoppelmarkierung ließ sich bestätigen, daß es sich um eine Vimentin-Expression in LT-positiven Epithelzellen handelte. Da die EMT als ein transientes Ereignis während der Karzinogenese beschrieben wird, könnte es sich trotz der in unserem Modell nur vereinzelt detektierbaren Vimentin-positiven Läsionen um einen möglichen Mechanismus zur malignen Transformation der SV40-induzierten Tumorigenese handeln. Entsprechend dieser Theorie würde in gering differenzierten, c-Met amplifizierten Tumoren die Karzinogenese mittels EMT vorangetrieben.

In humanen Mammakarzinomen wird die EMT als Mechanismus bei der Entstehung des basalen Subtyps diskutiert. Ausgehend von der Hypothese, daß Progenitorzellen mit bilinearem Differenzierungspotential die Eigenschaft zur EMT bewahrt haben, entstehen so epitheliale Tumoren mit basal/mesenchyalem Differenzierungsmuster (Sarrío et al., 2008) und der Fähigkeit zudem luminal-assoziierte Zytokeratine exprimieren zu können (Livasy et al., 2006). Die Induktion eines Stammzell-Phänotyps durch EMT in Epithelzellen der Brustdrüse konnte in Zellkulturversuchen bereits nachgewiesen werden (Mani et al., 2008). In einem transgenen Mausmodell resultierte die Expression eines onkogenen c-Met Rezeptors innerhalb muriner Brustdrüsenepithelien in Mammakarzinomen mit einem basalen Erscheinungsbild (Ponzo et al., 2009). Zusätzlich wiesen diese Tumore Marker der EMT und des Wnt-Signalweges auf und clusterten in Microarray Analysen mit dem basalen Subtyp des humanen Mammakarzinoms.

Bei der Betrachtung der SV40-induzierten Karzinogenese in WAP-T-transgenen Mäusen lassen sich entscheidende Parallelen zu dem beschriebenen Modell erkennen. Neben der Expression basaler Cytokeratine (CK6, CK14) sind die in unserem Modell entstehenden, schlecht differenzierten Tumore durch einen basaloiden Phänotyp charakterisiert. Ähnlich dem humanen basalen Subtyp weisen sie ein überwiegend solides, eher verdrängendes als infiltratives Wachstumsmuster mit ausgeprägter Kernpleomorphie, hohem mitotischem Index und ausgedehnten nekrotischen Arealen auf (Fadare and Tavassoli, 2007). Überdies liegt die Beteiligung ähnlicher Mechanismen bei der Tumorentstehung nahe, da eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges ebenfalls für die SV40-induzierte Karzinogenese beschrieben wurde (Ali-Seyed et al., 2006; Chen et al., 2004).

In unserem Mausmodell kommt es überwiegend zur Entwicklung luminal differenzierter Mammakarzinome. Ein Teil der entstehenden Präneoplasien und Neoplasien allerdings spiegelt die immunhistochemischen und phänotypischen Charakteristika basaler Mammakarzinome wider (z.B. Expression basaler/mesenchymaler Marker, basaloides Wachstumsmuster). Die hier vorgelegten Daten sprechen dafür, daß es sich bei dieser Subgruppe um schlecht differenzierte Läsionen handelt, die ihren Ursprung von Zellen mit einer c-Met Amplifikation/Überexpression und der Fähigkeit zur EMT nehmen. Einige Anhaltspunkte führen weiterhin zu der Annahme, daß es sich bei den Ursprungszellen der Karzinogenese um *Multilineage*-Progenitorzellen handeln könnte. Nicht nur ließe sich mit dieser Hypothese die vergleichsweise schlechte Prognose basaler Mammakarzinome anhand des EMT-abhängigen höheren Invasions- und Metastasierungspotentials erklären, auch böte sich potentiell die Möglichkeit einer gezielten Therapie für die Behandlung des basalen Mammakarzinoms (Harputluoglu et al., 2007).

Obwohl sich sicherlich nicht alle Aspekte der Entstehung des Mammakarzinoms, als einer heterogenen und komplexen Erkrankung, in unserem Modell abbilden lassen, bietet sich mit dem in dieser Arbeit vorgestellte WAP-T-transgenen Mausmodell die Möglichkeit, verschiedenste Mechanismen der Karzinogenese *in vivo* zu untersuchen. Die hier diskutierten Hypothesen bieten dabei Erklärungsansätze für beobachtete Veränderungen insbesondere während der frühen Tumorentstehung. Zweifelsohne werden sie jedoch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müssen.

6 Zusammenfassung

Brustkrebs gehört zu den häufigsten malignen Erkrankungen der westlichen Welt. Trotz zahlreicher bekannter Faktoren ist die Genese des Mammakarzinoms bislang weitestgehend ungeklärt. Insbesondere die Klassifikation und Therapie von Präneoplasien, die als Folge verbesserter diagnostischer Möglichkeiten immer häufiger identifiziert werden, ist somit in vielen Fällen erschwert. Es besteht daher ein dringender Bedarf an adäquaten Tiermodellen, um frühe Stadien der Brustkrebsentstehung und deren Progression untersuchen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die SV40-abhängige Entwicklung muriner Mammakarzinome in einem WAP-T-transgenen Mausmodell anhand histopathologischer und molekularbiologischer Methoden untersucht. Es handelt sich dabei um ein induzierbares Mausmodell, bei welchem die frühe Region des SV40 unter der Kontrolle des WAP-Promoters steht. Wie die hier vorgelegten Daten zeigen, fand eine gewebespezifische Transgenexpression in Epithelzellen der Brustdrüsen erst unter dem Einfluß laktotroper Hormone statt. Als Folge der Transgenexpression entwickelten sich präneoplastische Läsionen der Brustdrüsen. In einer Zeitreihe konnte die schrittweise Entdifferenzierung der Brustdrüsenepithelien im Rahmen der Karzinogenese von initialen morphologischen Veränderungen unter dem Einfluß des Transgens bis zur Entstehung invasiver Karzinome belegt werden. Die drei untersuchten Mauslinien erkrankten verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant häufiger an Adenokarzinomen der Brustdrüse und wiesen dabei eine linienspezifische Transgenexpression, Mammakarzinominzidenz und Latenzzeit bis zum Auftreten der Tumore auf. Da sich nicht alle Präneoplasien trotz konstanter Transgenexpression nach Induktion zu invasiven Karzinomen entwickelten, sondern auf Ebene von *in situ* Karzinomen vorerst zu einem Stillstand zu kommen schienen, konnte nachgewiesen werden, daß die Expression der frühen Region des SV40 alleine zur malignen Transformation nicht ausreicht. Vielmehr fanden sich zahlreiche histopathologische und immunhistochemische Hinweise darauf, daß

SV40 in WAP-T-transgenen Mäusen zu einer Immortalisierung epithelialer Progenitorzellen der Brustdrüse führte. Anhand LT-vermittelter Proliferation entwickelten sich anschließend intraepitheliale Neoplasien klonalen Ursprungs und erst nach Akkumulation weiterer onkogener Alterationen kam es zur Entstehung invasiver Mammakarzinome. Bei den entstehenden Tumoren handelte es sich um hormonrezeptornegative, überwiegend schlecht differenzierte Mammakarzinome, bei welchen ein luminal und ein basal differenzierter Phänotyp unterschieden werden konnte. Überdies ließ sich eine Beteiligung EMT-assoziiierter Faktoren an der Entstehung der basalen Mammakarzinome vermuten.

Das in dieser Arbeit beschriebene Mausmodell stellt somit nicht nur ein adäquates Modell für eine nachvollziehbare, schrittweise Karzinogenese des Mammakarzinoms dar, sondern gibt zudem erste Hinweise auf die Beteiligung von Stamm- bzw. Progenitorzellen bei der Entstehung maligner Brustdrüsentumore.

Literaturverzeichnis

- Adami, H. O. and Trichopoulos, D. (2003). Obesity and mortality from cancer. *N Engl J Med*, 348:1623–1624.
- Akala, O. O., Park, I. K., Qian, D., Pihalja, M., Becker, M. W., and Clarke, M. F. (2008). Long-term haematopoietic reconstitution by Trp53^{-/-}-p16Ink4a^{-/-}-p19Arf^{-/-} multipotent progenitors. *Nature*, 453:228–232.
- Ali-Seyed, M., Laycock, N., Karanam, S., Xiao, W., Blair, E. T., and Moreno, C. S. (2006). Cross-platform expression profiling demonstrates that SV40 small tumor antigen activates Notch, Hedgehog, and Wnt signaling in human cells. *BMC Cancer*, 6:54.
- Allred, D. C., O'Connell, P., and Fuqua, S. A. (1993). Biomarkers in early breast neoplasia. *J Cell Biochem Suppl*, 17G:125–131.
- American Joint Committee on Cancer, A. (2002). *Cancer Staging Manual*, 6. Auflage. PA:Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Andres, A. C. and Strange, R. (1999). Apoptosis in the estrous and menstrual cycles. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 4:221–228.
- Artandi, S. E., Alson, S., Tietze, M. K., Sharpless, N. E., Ye, S., Greenberg, R. A., Castrillon, D. H., Horner, J. W., Weiler, S. R., Carrasco, R. D., and DePinho, R. A. (2002). Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:8191–8196.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (1997). The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res*, 237:1–6.
- Bhargava, V., Thor, A., Deng, G., Ljung, B. M., Moore, D. H., Waldman, F., Benz, C., Goodson, W., Mayall, B., and Chew, K. (1994). The association of p53 immunopo-

- sitivity with tumor proliferation and other prognostic indicators in breast cancer. *Mod Pathol*, 7:361–368.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:915–925.
- Bishop, J. M. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science*, 235:305–311.
- Bloom, H. J. and Richardson, W. W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, 11:359–377.
- Bánkfalvi, A., Ludwig, A., De-Hesselle, B., Buerger, H., Buchwalow, I. B., and Boecker, W. (2004). Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod Pathol*, 17:1051–1061.
- Boecker, W. and Buerger, H. (2003). Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif*, 36 Suppl 1:73–84.
- Boecker, W., Buerger, H., Buchwalow, I. B., and Decker, T. (2005). Ck5-positive cells are precursor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human breast epithelium. A new cell concept as a basis for a better understanding of proliferative breast disease? *Verh Dtsch Ges Pathol*, 89:45–47.
- Boecker, W., Moll, R., Poremba, C., Holland, R., Van Diest, P. J., Dervan, P., Bürger, H., Wai, D., Ina Diallo, R., Brandt, B., Herbst, H., Schmidt, A., Lerch, M. M., and Buchwalow, I. B. (2002). Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest*, 82:737–746.
- Boyapati, A., Wilson, M., Yu, J., and Rundell, K. (2003). SV40 17KT antigen complements dnaj mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts. *Virology*, 315:148–158.
- Børresen-Dale, A. L. (2003). TP53 and breast cancer. *Hum Mutat*, 21:292–300.

- Buerger, H., Mommers, E. C., Littmann, R., Simon, R., Diallo, R., Poremba, C., Dockhorn-Dworniczak, B., van Diest, P. J., and Boecker, W. (2001). Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *J Pathol*, 194:165–170.
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Schaefer, K. L., Poremba, C., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B., and Boecker, W. (1999). Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol*, 189:521–526.
- Bullwinkel, J., Baron-Luehr, B., Luedemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol*, 206:624–635.
- Cardiff, R. D., Anver, M. R., Gusterson, B. A., Hennighausen, L., Jensen, R. A., Merino, M. J., Rehm, S., Russo, J., Tavassoli, F. A., Wakefield, L. M., Ward, J. M., and Green, J. E. (2000). The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene*, 19:968–988.
- Carter, C. L., Allen, C., and Henson, D. E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 63:181–187.
- Chen, W., Possemato, R., Campbell, K. T., Plattner, C. A., Pallas, D. C., and Hahn, W. C. (2004). Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell*, 5:127–136.
- Chepko, G. and Smith, G. H. (1997). Three division-competent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal. *Tissue Cell*, 29:239–253.
- Claus, E. B., Chu, P., Howe, C. L., Davison, T. L., Stern, D. F., Carter, D., and DiGiiovanna, M. P. (2001). Pathobiologic findings in DCIS of the breast: morphologic features, angiogenesis, HER-2/neu and hormone receptors. *Exp Mol Pathol*, 70:303–316.
- Couturier, J., Vincent-Salomon, A., Nicolas, A., Beuzeboc, P., Mouret, E., Zafrani, B., and Sastre-Garau, X. (2000). Strong correlation between results of fluorescent in

- situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/neu) gene status in breast carcinoma. *Mod Pathol*, 13:1238–1243.
- Crawford, Y. G., Gauthier, M. L., Joubel, A., Mantei, K., Kozakiewicz, K., Afshari, C. A., and Tlsty, T. D. (2004). Histologically normal human mammary epithelia with silenced p16(INK4a) overexpress COX-2, promoting a premalignant program. *Cancer Cell*, 5:263–273.
- Daling, J. R., Malone, K. E., Doody, D. R., Anderson, B. O., and Porter, P. L. (2002). The relation of reproductive factors to mortality from breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11:235–241.
- Daniel, C. W. and Silberstein, G. B. (1987). *Postnatal development of the rodent mammary gland*. In MC Neville and CW Daniel (eds.), *The Mammary Gland: Development, Regulation and Function*. Plenum Press, New York.
- de Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., Sotiriou, C., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M. J., and Paesmans, M. (2007). Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*, 96:1504–1513.
- Dobie, K., Mehtali, M., McClenaghan, M., and Lathe, R. (1997). Variegated gene expression in mice. *Trends Genet*, 13:127–130.
- Dupont, W. D. and Page, D. L. (1985). Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med*, 312:146–151.
- Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M. D., Zimonjic, D. B., Donaher, J. L., Popescu, N. C., Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*, 15:50–65.
- Ellis, I. O., Galea, M., Broughton, N., Locker, A., Blamey, R. W., and Elston, C. W. (1992). Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 20:479–489.

- Elston, C. W. and Ellis, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19:403–410.
- Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Weiss, R. A., and Liotta, L. A. (1996). Laser capture microdissection. *Science*, 274:998–1001.
- Epidemiologisches Krebsregister Deutschland, . (2008). *Krebs in Deutschland. 6. überarbeitete aktualisierte Auflage, 54-58*. Gesellschaft Epidemiologisches Krebsregister Deutschland.
- Fadare, O. and Tavassoli, F. A. (2007). The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol*, 14:358–373.
- Fadok, V. A. (1999). Clearance: the last and often forgotten stage of apoptosis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 4:203–211.
- Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759–767.
- Flores, I., Cayuela, M. L., and Blasco, M. A. (2005). Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science*, 309:1253–1256.
- Gallego, M. I., Bierie, B., and Hennighausen, L. (2003). Targeted expression of HGF/SF in mouse mammary epithelium leads to metastatic adenosquamous carcinomas through the activation of multiple signal transduction pathways. *Oncogene*, 22:8498–8508.
- Gasco, M., Shami, S., and Crook, T. (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 4:70–76.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31:13–20.

- Ghoussoub, R. A., Dillon, D. A., D'Aquila, T., Rimm, E. B., Fearon, E. R., and Rimm, D. L. (1998). Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer*, 82:1513–1520.
- Giordano, S. H., Cohen, D. S., Buzdar, A. U., Perkins, G., and Hortobagyi, G. N. (2004). Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer*, 101:51–57.
- Grimm, S. L., Seagroves, T. N., Kabotyanski, E. B., Hovey, R. C., Vonderhaar, B. K., Lydon, J. P., Miyoshi, K., Hennighausen, L., Ormandy, C. J., Lee, A. V., Stull, M. A., Wood, T. L., and Rosen, J. M. (2002). Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development. *Mol Endocrinol*, 16:2675–2691.
- Gudjonsson, T., Villadsen, R., Nielsen, H. L., Rønnov-Jessen, L., Bissell, M. J., and Petersen, O. W. (2002). Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev*, 16:693–706.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400:464–468.
- Hahn, W. C., Dessain, S. K., Brooks, M. W., King, J. E., Elenbaas, B., Sabatini, D. M., DeCaprio, J. A., and Weinberg, R. A. (2002). Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol*, 22:2111–2123.
- Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*, 347:1593–1603.
- Harputluoglu, H., Dizdar, O., and Altundag, K. (2007). Potential targeted therapy options in the management of basal cell subtype of breast carcinoma. *Hum Pathol*, 38:1869; author reply 1870.
- Heinlein, C. (2006). *Einfluß von mutiertem p53 auf die Entwicklung von Mammakarzinomen in einem transgenen Mausmodell [Mus musculus (Linneaus)]*. PhD thesis, Universität Hamburg.

- Henderson, B. E., Powell, D., Rosario, I., Keys, C., Hanisch, R., Young, M., Casagrande, J., Gerkins, V., and Pike, M. C. (1974). An epidemiologic study of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 53:609–614.
- Hennighausen, L. and Robinson, G. W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:715–725.
- Hermanek, P., Gospondarowicz, M. K., and Henson, D. E. (1995). *Prognostic factors in cancer*. Springer Verlag.
- Herschkowitz, J. I., He, X., Fan, C., and Perou, C. M. (2008). The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer Res*, 10:R75.
- Hilsenbeck, S. G., Ravdin, P. M., de Moor, C. A., Chamness, G. C., Osborne, C. K., and Clark, G. M. (1998). Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 52:227–237.
- Holmberg, L. and Anderson, H. (2004). HABITS (hormonal replacement therapy after breast cancer—is it safe?), a randomised comparison: trial stopped. *Lancet*, 363:453–455.
- Jacobs, T. W., Gown, A. M., Yaziji, H., Barnes, M. J., and Schnitt, S. J. (1999). Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol*, 17:1974–1982.
- Jensen, H. M., Rice, J. R., and Wellings, S. R. (1976). Preneoplastic lesions in the human breast. *Science*, 191:295–297.
- Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Kurisu, W., Thor, A., Chen, L. C., Smith, H. S., Waldman, F. M., Pinkel, D., and Gray, J. W. (1992). ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:5321–5325.
- Kang, J. Y., Dolled-Filhart, M., Ocal, I. T., Singh, B., Lin, C. Y., Dickson, R. B., Rimm, D. L., and Camp, R. L. (2003). Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte

- growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer Res*, 63:1101–1105.
- Kato, T., Kameoka, S., Kimura, T., Nishikawa, T., and Kobayashi, M. (2003). The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 88:1900–1908.
- Kelsey, J. L., Gammon, M. D., and John, E. M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*, 15:36–47.
- Kordon, E. C. and Smith, G. H. (1998). An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development*, 125:1921–1930.
- Kroman, N. and Mouridsen, H. T. (2003). Prognostic influence of pregnancy before, around, and after diagnosis of breast cancer. *Breast*, 12:516–521.
- Kuperwasser, C., Hurlbut, G. D., Kittrell, F. S., Dickinson, E. S., Laucirica, R., Medina, D., Naber, S. P., and Jerry, D. J. (2000). Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *Am J Pathol*, 157:2151–2159.
- Lage, J. M., Leamon, J. H., Pejovic, T., Hamann, S., Lacey, M., Dillon, D., Segraves, R., Vossbrinck, B., González, A., Pinkel, D., Albertson, D. G., Costa, J., and Lizardi, P. M. (2003). Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. *Genome Res*, 13:294–307.
- Lakhani, S. R. (1999). The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol*, 187:272–278.
- Leal, C. B., Schmitt, F. C., Bento, M. J., Maia, N. C., and Lopes, C. S. (1995). Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer*, 75:2123–2131.
- Lengyel, E., Prechtel, D., Resau, J. H., Gauger, K., Welk, A., Lindemann, K., Salanti, G., Richter, T., Knudsen, B., Vande Woude, G. F., and Harbeck, N. (2005). C-Met

- overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int J Cancer*, 113:678–682.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K. U., Young, W. S., Hennighausen, L., and Furth, P. A. (1997). Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:3425–3430.
- Li, Y., Welm, B., Podsypanina, K., Huang, S., Chamorro, M., Zhang, X., Rowlands, T., Egeblad, M., Cowin, P., Werb, Z., Tan, L. K., Rosen, J. M., and Varmus, H. E. (2003). Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:15853–15858.
- Lin, E. Y., Jones, J. G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K. D., Muller, W. J., and Pollard, J. W. (2003). Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol*, 163:2113–2126.
- Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T., and Perou, C. M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 19:264–271.
- Locker, G. Y. (1998). Hormonal therapy of breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 24:221–240.
- Ma, X. J., Salunga, R., Tuggle, J. T., Gaudet, J., Enright, E., McQuary, P., Payette, T., Pistone, M., Stecker, K., Zhang, B. M., Zhou, Y. X., Varnholt, H., Smith, B., Gadd, M., Chatfield, E., Kessler, J., Baer, T. M., Erlander, M. G., and Sgroi, D. C. (2003). Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:5974–5979.
- MacMahon, B., Cole, P., Lin, T. M., Lowe, C. R., Mirra, A. P., Ravnihar, B., Salber, E. J., Valaoras, V. G., and Yuasa, S. (1970). Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ*, 43:209–221.

- Madigan, M. P., Ziegler, R. G., Benichou, J., Byrne, C., and Hoover, R. N. (1995). Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. *J Natl Cancer Inst*, 87:1681–1685.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133:704–715.
- Mather, I. H. and Keenan, T. W. (1998). Origin and secretion of milk lipids. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3:259–273.
- Middleton, L. P., Amin, M., Gwyn, K., Theriault, R., and Sahin, A. (2003). Breast carcinoma in pregnant women: assessment of clinicopathologic and immunohistochemical features. *Cancer*, 98:1055–1060.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., and Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266:66–71.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., and Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31:11–24.
- Nandi, S. (1958). Endocrine control of mammary gland development and function in the C3H/He mouse. *J Natl Cancer Inst*, 21:1039–1063.
- O’Connell, P., Pekkel, V., Fuqua, S. A., Osborne, C. K., Clark, G. M., and Allred, D. C. (1998). Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst*, 90:697–703.
- Osborne, C. K. (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*, 51:227–238.
- Page, D. L., Dupont, W. D., Rogers, L. W., and Landenberger, M. (1982). Intraductal carcinoma of the breast: follow-up after biopsy only. *Cancer*, 49:751–758.

- Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1986). Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet*, 20:465–499.
- Péchoux, C., Gudjonsson, T., Ronnov-Jessen, L., Bissell, M. J., and Petersen, O. W. (1999). Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev Biol*, 206:88–99.
- Perou, C. M., Sørlie, 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., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747–752.
- Pittius, C. W., Hennighausen, L., Lee, E., Westphal, H., Nicols, E., Vitale, J., and Gordon, K. (1988). A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5874–5878.
- Ponzo, M. G., Lesurf, R., Petkiewicz, S., O'Malley, F. P., Pinnaduwaage, D., Andrulis, I. L., Bull, S. B., Chughtai, N., Zuo, D., Souleimanova, M., Germain, D., Omeroglu, A., Cardiff, R. D., Hallett, M., and Park, M. (2009). Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:12903–12908.
- Quarrie, L. H., Addey, C. V., and Wilde, C. J. (1996). Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *J Cell Physiol*, 168:559–569.
- Ramel, S., Sanchez, C. A., Schimke, M. K., Neshat, K., Cross, S. M., Raskind, W. H., and Reid, B. J. (1995). Inactivation of p53 and the development of tetraploidy in the elastase-SV40 T antigen transgenic mouse pancreas. *Pancreas*, 11:213–222.
- Reed, W., Sandstad, B., Holm, R., and Nesland, J. M. (2003). The prognostic impact of hormone receptors and c-erbB-2 in pregnancy-associated breast cancer and their correlation with BRCA1 and cell cycle modulators. *Int J Surg Pathol*, 11:65–74.

- Reis-Filho, J. S. and Lakhani, S. R. (2003). The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res*, 5:313–319.
- Remmele, W. and Stegner, H. E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8:138–140.
- Ries, L. A. G., Harkins, D., and Krapcho, M. e. a. (2006). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003*. Bethesda, MD: National Cancer Institute.
- Robinson, G. W., McKnight, R. A., Smith, G. H., and Hennighausen, L. (1995). Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation. *Development*, 121:2079–2090.
- Rosen, P. P., Braun, D. W., Lyngholm, B., Urban, J. A., and Kinne, D. W. (1981). Lobular carcinoma in situ of the breast: preliminary results of treatment by ipsilateral mastectomy and contralateral breast biopsy. *Cancer*, 47:813–819.
- Roylance, R., Gorman, P., Harris, W., Liebmann, R., Barnes, D., Hanby, A., and Sheer, D. (1999). Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res*, 59:1433–1436.
- Sapino, A., Macri, L., Gugliotta, P., Pacchioni, D., Liu, Y. J., Medina, D., and Bussolati, G. (1993). Immunophenotypic properties and estrogen dependency of budding cell structures in the developing mouse mammary gland. *Differentiation*, 55:13–18.
- Sarin, K. Y., Cheung, P., Gilson, D., Lee, E., Tennen, R. I., Wang, E., Artandi, M. K., Oro, A. E., and Artandi, S. E. (2005). Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature*, 436:1048–1052.
- Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res*, 68:989–997.

- Schoppmann, S. F., Bayer, G., Aumayr, K., Taucher, S., Geleff, S., Rudas, M., Kubista, E., Hausmaninger, H., Samonigg, H., Gnant, M., Jakesz, R., and Horvat, R. (2004). Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg*, 240:306–312.
- Schulze-Garg, C., Lohler, J., Gocht, A., and Deppert, W. (2000). A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. *Oncogene*, 19(8):1028–1037.
- Shackney, S. E. and Silverman, J. F. (2003). Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol*, 10:278–290.
- Sheng, Q., Love, T. M., and Schaffhausen, B. (2000). J domain-independent regulation of the Rb family by polyomavirus large T antigen. *J Virol*, 74:5280–5290.
- Sherr, C. J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:731–737.
- Silverstein, M. J. and Buchanan, C. (2003). Ductal carcinoma in situ: USC/Van Nuys Prognostic Index and the impact of margin status. *Breast*, 12:457–471.
- Silverstein, M. J., Poller, D. N., Waisman, J. R., Colburn, W. J., Barth, A., Gierson, E. D., Lewinsky, B., Gamagami, P., and Slamon, D. J. (1995). Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet*, 345:1154–1157.
- Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Gale, T., and Lakhani, S. R. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*, 205:248–254.
- Sleeman, K. E., Kendrick, H., Robertson, D., Isacke, C. M., Ashworth, A., and Smalley, M. J. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol*, 176:19–26.
- Smalley, M. and Ashworth, A. (2003). Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*, 3:832–844.
- Smith, G. H., Mehrel, T., and R., R. D. (1990). Differential keratin gene expression in developing, differentiating, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary epithelium. *Cell Growth Differ*, 1:161–70.

- Snell, G. D. (1941). *Biology of the Laboratory Mouse*. Philadelphia, Blakiston.
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Eystein Lønning, P., and Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:10869–10874.
- Stewart, B. W. and Kleihues, P. (2003). *World Cancer Report*. Lyon, France: IARC Press.
- Stingl, J. and Caldas, C. (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*, 7:791–799.
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H. I., and Eaves, C. J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, 439:993–997.
- Stoecklein, N. H., Erbersdobler, A., Schmidt-Kittler, O., Diebold, J., Schardt, J. A., Izbic, J. R., and Klein, C. A. (2002). SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol*, 161:43–51.
- Sun, W., Kang, K. S., Morita, I., Trosko, J. E., and Chang, C. C. (1999). High susceptibility of a human breast epithelial cell type with stem cell characteristics to telomerase activation and immortalization. *Cancer Res*, 59:6118–6123.
- Takayama, H., LaRochelle, W. J., Sharp, R., Otsuka, T., Kriebel, P., Anver, M., Aaronson, S. A., and Merlino, G. (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:701–706.
- Tavassoli, F. A. and Devilee, P. (2003). *WHO Classification of Tumours: Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. IARC Press.
- Tavassoli, F. A. and Norris, H. J. (1990). A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer*, 65:518–529.

- Telenius, H., Pelmear, A. H., Tunnacliffe, A., Carter, N. P., Behmel, A., Ferguson-Smith, M. A., Nordenskjöld, M., Pfragner, R., and Ponder, B. A. (1992). Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*, 4:257–263.
- Tzeng, Y. J., Gottlob, K., Santarelli, R., and Graessmann, A. (1996). The SV40 T-antigen induces premature apoptotic mammary gland involution during late pregnancy in transgenic mice. *FEBS Lett*, 380(3):215–218.
- Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108:171–182.
- Villadsen, R., Fridriksdottir, A. J., Rønnov-Jessen, L., Gudjonsson, T., Rank, F., LaBarge, M. A., Bissell, M. J., and Petersen, O. W. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J Cell Biol*, 177:87–101.
- 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., and Stewart, S. J. (2001). First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology*, 61 Suppl 2:37–42.
- Voorhoeve, P. M. and Agami, R. (2003). Knockdown stands up. *Trends Biotechnol*, 21:2–4.
- Vousden, K. H. and Prives, C. (2005). P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell*, 120:7–10.
- Wagner, K. U., Boulanger, C. A., Henry, M. D., Sgagias, M., Hennighausen, L., and Smith, G. H. (2002). An adjunct mammary epithelial cell population in parous females: its role in functional adaptation and tissue renewal. *Development*, 129:1377–1386.
- Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multi-step carcinogenesis. *Cancer Res.*, 49:3713–3721.
- Williams, J. M. and Daniel, C. W. (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol*, 97:274–290.

- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., and Averill, D. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265:2088–2090.
- Yager, J. D. and Davidson, N. E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*, 354:270–282.
- Yu, Y., Okayasu, R., Weil, M., Silver, A., McCarthy, M., Zabriskie, R., Long, S., Cox, R., Ullrich, R. L., and Ullrich, R. L. (2001). Elevated breast cancer risk in irradiated BALB/c mice associates with unique functional polymorphism of the Prkdc (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gene. *Cancer Res*, 61:1820–1824.
- Zhang, S., Ramsay, E. S., and Mock, B. A. (1998). Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:2429–2434.

Danksagung

Nachfolgend möchte ich mich bei allen bedanken, die die Entstehung dieser Arbeit unterstützt und die praktische Umsetzung der Ideen ermöglicht haben.

Insbesondere bei Herrn Prof. Wolfgang Deppert möchte ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit, dieses Thema in seiner Abteilung zu bearbeiten sowie für die Betreuung, die persönliche und fachliche Unterstützung und die zahlreichen spannenden Diskussionen bedanken.

Desweiteren danke ich der gesamten Abteilung Tumorvirologie für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen. Vor allen Dingen bei Frauke Krepulat, Christina Heinlein und Andrea Diesterbeck möchte ich mich ganz herzlich für die große Unterstützung und die schöne Zeit bedanken. Herrn Dr. Löhler danke ich ganz herzlich für die außerordentliche Betreuung und Weitergabe seines Wissens in allen pathologischen Fragestellungen. Nicht zuletzt bedanke ich mich für die sehr produktive Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre bei Silvia Wegerich und Gundula Pilniz-Stolze.

Vor allen Dingen aber gilt mein ganz besonderer Dank allen, die mich während der gesamten Zeit unterstützt, bestärkt und zu mir gehalten haben und ohne welche diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre: meinen Eltern, der kleinen „N“, Jenso, Oma, Pappa, Meike & Makro, Naddel, Marijke, Piemony, den „Be's“, Nosy, Stefan, Becks, der Familie Höchst, den „Shakespears sisters“, RTLnow, den Konvikts, meinen lieben Kollegen, und ganz besonders Basti!

Vielen Dank für Alles!

Tabellenverzeichnis

2.1	Van-Nuys-Prognose-Index	5
2.2	WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome	6
2.3	TNM-Klassifikation	8
2.4	Histologisches Grading nach Bloom-Richardson	9
3.1	Verwendete Antikörper	24
3.2	Verwendete Primer	27
4.1	Semiquantitative Auswertung terminaler Differenzierungsmarker	85

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der Topographie muriner Brustdrüsen	16
2.2	Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus der murinen Brustdrüse	17
2.3	Einfluß des SV40 T-Antigens auf den Zellzyklus	20
4.1	Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts	38
4.2	Southern Blot Analyse der Transgenintegration	39
4.3	PCR-Optimierung	40
4.4	Linien spezifische Entwicklung invasiver Adenokarzinome	42
4.5	Latenzzeit bis zum Auftreten invasiver Adenokarzinome nach einmaliger Induktion	43
4.6	Gewebespezifische Transgentranskription	45
4.7	Semquantitative RT-PCR des Brustdrüsengewebes nulliparer Tiere	46
4.8	LT-Expression am 5. Tag der Laktation	47
4.9	LT-Expression am 5. Tag der Laktation	49
4.10	Proliferation LT-positiver Drüsenendstücke in Form funktioneller Einheiten	50
4.11	Verlauf der LT-Expression in WAP-T1 und WAP-T-NP8 Tieren	52
4.12	Brustdrüsenmorphologie nulliparer Tiere	54
4.13	Brustdrüsenmorphologie laktierender Tiere	56
4.14	WAP-T1 an Tag 5 <i>post partum</i>	57
4.15	Brustdrüsenmorphologie nach abgeschlossener Involution	58
4.16	Neoplasien der Brustdrüse in Tieren der Linien WAP-T1 30 und 60 Tage pw	60
4.17	Histopathologische Charakteristika muriner Neoplasien	63
4.18	Trangenabhängigkeit muriner Neoplasien der Brustdrüse	64
4.19	Transgenabhängige Entstehung muriner Neoplasien der Brustdrüsen in Tieren der Linie WAP-T1	65

4.20	Transgenabhängige Entstehung muriner Neoplasien in Tieren der Linie WAP-T-NP8	66
4.21	Transgenabhängige Entstehung muriner Neoplasien in Tieren der Linie WAP-T-NP6	66
4.22	Progesteronrezeptor-Status.	69
4.23	Östrogenrezeptor-Status.	70
4.24	Hormonrezeptorverlust im Verlauf der Karzinogenese	71
4.25	Expression des c-ErbB2 Rezeptors	72
4.26	Proliferationsindex	73
4.27	Expression des Proliferationsmarkers Ki67	74
4.28	Apoptoserate	75
4.29	Markierung apoptotischer Zellkerne	76
4.30	Proliferationsindex und Apoptoseindex muriner Neoplasien	77
4.31	Luminale Differenzierung muriner Neoplasien der Brustdrüse	79
4.32	Kolokalisation luminaler und basaler Zytokeratine in murinen Neoplasien der Brustdrüse	81
4.33	CK6 Expression in murinen Neoplasien basal/luminaler Differenzierung .	82
4.34	Mesenchymale Differenzierung muriner Neoplasien	83
5.1	Schematische Darstellung der Stamm- und Progenitorzellhypothese . . .	93
5.2	WAP-T-transgene Mäuse als Progressionsmodell für die Karzinogenese des Mammakarzinoms	99

Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift:.....