

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Pathologie
Institutsdirektor Prof. Dr. med. Guido Sauter
Arbeit unter der Anleitung von PD Dr. Simon

**Klinische Relevanz einer PPF1A1 Amplifikation im
humanen Mammakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Laura Wuth
aus Hamburg

Hamburg, 2012

Angenommen von
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.11.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. S. Mahner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Das Mammakarzinom.....	5
1.2 Tumorgenese.....	6
1.3 PPFA1 und Region 11q13.....	9
1.4 Funktion von Liprin- α 1.....	10
1.5 Ziel der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Patientengewebe	14
2.2 pBac-E.coli-Klon-Kultivierung	15
2.2.1 Geräte	15
2.2.2 Reagenzien	15
2.2.3 Durchführung	15
2.3 DNA-Extraktion.....	16
2.3.1 Geräte	16
2.3.2 Reagenzien	16
2.3.3 Durchführung	16
2.4 DNA-Sonden Herstellung.....	17
2.4.1 Geräte	18
2.4.2 Reagenzien	18
2.4.3 Durchführung	18
2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	19
2.5.1 Geräte	19
2.5.2 Reagenzien	20
2.5.2.1 Puffer und Lösungen.....	20
2.5.3 Durchführung	21
2.5.3.1 Entparaffinierung und Vorbehandlung.....	21
2.5.3.2 Hybridisierung	21
2.5.3.3 Detektion.....	22

2.6	FISH Analyse.....	23
2.7	Statistik	25
3	Ergebnisse	26
3.1	PPFIA1-Amplifikation und Co-Amplifikation mit CCND1	26
3.2	Prognostische Relevanz	28
3.3	Einfluss einer 11q13 Amplifikation auf das Ansprechen einer Tamoxifen Therapie	30
4	Diskussion.....	32
5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis.....	46
7	Danksagung	54
8	Lebenslauf.....	55
9	Eidesstattliche Versicherung.....	56

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Krebs ist einer der zehn führenden Todesursachen der Welt (WHO 2008). Es wird geschätzt, dass 7,4 Millionen Menschen allein im Jahre 2004 an einer Krebserkrankung starben und voraussichtlich 83,2 Millionen Menschen bis 2015 an Krebs sterben werden. Bei Erwachsenen Frauen ist der Brustkrebs mit 16% die häufigste Todesursache der Krebserkrankungen (WHO 2008). Mehr als die Hälfte der an Brustkrebs erkrankten Frauen leben in industrialisierten Ländern und machen in Europa 27.3% (361.000) aller Krebserkrankungen der Frauen aus, in Nord Amerika sogar 31.3% (230.000), wo die Inzidenz 99.4 von 100.000 beträgt (Jemal, Clegg et al. 2004). In Osteuropa, Südamerika, Südafrika und Westasien ist die Inzidenz moderater, doch stellt Brustkrebs auch dort noch immer die am weitesten verbreitete Krebserkrankung der Frauen in diesen Regionen dar. In den Industrienationen sind weiterhin steigende Zahlen zu verzeichnen. Seit den Schätzungen von 1990 gibt es eine gesamte Steigerungsrate der Inzidenz von 0.5% jährlich. Krebsregister in China verzeichnen einen jährlichen Anstieg von sogar 3% bis 4% (Parkin, Bray et al. 2005). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 63 Jahre und liegt damit 6 Jahre unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Allein in der Bundesrepublik Deutschland (BRD) erkranken jährlich derzeit über 57.000 Frauen an Brustkrebs. Das heißt, etwa jede zehnte Frau ist im Laufe ihres Lebens in der BRD von Brustkrebs betroffen (Robert_Koch_Institut 2008). Aber Brustkrebs verursacht nicht nur großes persönliches Leid, sondern auch erhebliche Kosten. Es lassen sich dabei die direkten Kosten, verursacht durch z.B. ambulante und stationäre Versorgung, von den indirekten Kosten, wie zum Beispiel Verlust von Lebensjahren, Frühberentung oder dem krankheitsbedingten Arbeitsausfall, unterscheiden. Im Jahr 2006 wurden allein in der BRD insgesamt 1,9 Milliarden Euro für die Behandlung von Brustkrebs bei Frauen aufgewendet (nur Angabe der direkten Kosten) (Statistisches_Bundesamt 2008).

1.2 Tumorgenese

Die Beobachtung von menschlichen Krebsgeweben und tierischen Modellen stimmt damit überein, dass die Tumorentwicklung, abgesehen von der Epigenetik, analog zur Evolutionstheorie Darwins verläuft, in welcher eine Reihe von genetischen Veränderungen einer Zelle ihr im Verbund einen Wachstumsvorteil verschaffen können und diese zur Tumorzelle transformieren. Die Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess, dessen Stufen die genetischen Veränderungen in einem Krebs darstellen und eine progressive Transformation von einer normalen Zelle in einen hoch malignen Abkömmling bewirken, wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen und das Immunsystem versagen. Dabei gibt jede Zelle, die sich teilt, ihren erworbenen DNA-Schaden an die Tochterzelle weiter, so dass die Veränderung genetisch fixiert ist (Wagener 1999). Weniger ist die bestimmte Reihenfolge in der Ausbildung genetischer Alterationen von Bedeutung, als vielmehr deren kritische Akkumulation, die der Zelle Eigenschaften verleiht, wie eine unkontrollierte Zellproliferation, gesteigerte Zellmotilität, das Vermögen die Basalmembran zu durchbrechen, in lokale Gewebe einzuwandern und in entfernte Gewebe zu metastasieren. Es gibt viele Möglichkeiten, wie ein DNA-Schaden entstehen kann. Umweltfaktoren, wie Sonnenstrahlung, chemische Noxen oder Viren können unter anderem zu DNA-Brüchen, Verlust von genetischem Material, aber auch zur Vervielfältigung von ganzen Genom-Abschnitten führen. Fehler, die sich im Laufe der Zeit häufen, sind zuweilen eine Erklärung, warum die Inzidenz von Krebserkrankungen im fortgeschrittenen Lebensalter ansteigt. Eine Mutation führt aber nicht zwangsläufig zu einem Krebs. Es hängt viel mehr vom Ort und Art der Mutation ab, von der das Genom betroffen ist. Entscheidend ist die Funktion oder Häufigkeit des betreffenden Genproduktes und ob es in Prozesse, die für eine Krebsentwicklung von Bedeutung sind, involviert ist. Dabei kann es sich um verstärkt wirkende Produkte von sogenannten Onkogenen¹ oder um Tumorsuppressorgene² handeln, die typischerweise in Ihrer Funktion eingeschränkt sind. In beiden Fällen wirkt sich eine Genmutation als kanzerogen aus. Aufgrund der unzähligen Möglichkeiten einer Mutation und der betroffenen Gene ist jeder Krebs, wie

¹An Proliferation und Differenzierung beteiligte Wachstumskontrollgene, deren aktivierende Mutation zu maligner Transformation führt.

²Gene, die mittels ihrer Genprodukte eine Hemmung des Zellzyklus bewirken u. damit die Entstehung unkontrolliert wachsender Tumorzellen verhindern.

auch der Brustkrebs, genetisch komplex und einzigartig, weshalb sich dessen Krankheitsbeginn, Verlauf und Schwere variabel gestalten. Das stellt höchste Ansprüche an die Therapie, die auf jeden Patienten individuell ausgerichtet sein sollte.

Eine der möglichen Mutationsarten ist die Amplifikation³. Sie ist in der Genetik eine gezielte Vermehrung von DNA-Sequenzen. Dabei liegt der DNA-Abschnitt in einer Zelle mehrmals nebeneinander vor. Die künstliche Amplifikation spielt als Verfahren in der Molekulargenetik eine bedeutende Rolle. Als Beispiel wird in der Polymerase Kettenreaktion (PCR)⁴ DNA *in vitro*⁵ vervielfältigt und kann so dem Nachweis einer Erbkrankheit, Virusinfektion oder dem Sequenzieren von DNA-Abschnitten dienen. Erstaunlicherweise ist die spezifische Vermehrung von Genom-Bereichen oder Genen in der Pflanzenwelt und sogar bei einigen niederen Tieren ein natürlich vorkommender Prozess. Sie wird genutzt um die Aktivität einzelner Gene bei Bedarf zu steigern. In menschlichen Zellen aber sind Amplifikationen nach dem heutigen Wissensstand pathologisch und finden sich überwiegend in tumorösen Geweben oder deren Vorstufen. In Metaphase-Chromosomen stellt sich eine intrachromosomale Amplifikation als sogenannte *homogeneous staining region (HSR)*⁶ dar, eine extrachromosomale Amplifikation wird als *double minutes*⁷ bezeichnet. *In situ*⁸ erscheint erstere nach Färbung als Cluster von Gensignalen, letztere ist scheinbar wahllos im Zellkern verteilt. Die Vermehrung eines ganzen Chromosoms (Polysomie) oder des ganzen Chromosomensatzes (Polyploidie) gilt nicht als Amplifikation im engeren Sinne. Eine Polyploidisierung oder -somierung ist auf Grund von unkontrollierter und schneller Zellteilung in Tumoren und deren Vorstufen nicht selten und muss deshalb differenziert werden. Um eine Polysomie/ploidie sicher von einer Amplifikation unterscheiden zu können werden die Zentromer- oder die Telomer-Regionen chromosomenspezifisch mit der Gen-Kopiezahl verglichen. Der genaue Mechanismus der Entstehung einer Amplifikation ist noch Gegenstand intensiver

³von lat. *amplificatio* Ausweitung, *amplus* weit.

⁴Molekularbiol. Verf. b. d. selektiv DNA-Abschnitte amplifiziert werden; Neusynthese von DNA-Sequenzen, die von 2 synthet. Oligonukleotiden (sog. Primer) flankiert werden.

⁵(lat.) im (Reagenz-)Glas, d.h. außerhalb des lebenden Organismus.

⁶(engl.) homogen gefärbte Region; Chromosomen-Anormalität, die in der Metaphase als homogen gefärbte Region erscheint. Normalerweise zeigen Metaphase-Chromosomen ein Bandenmuster.

⁷(engl.) doppelte Kleine; Bis zu einigen 100 kbp große Doppel-Chromatinstücke. Sie besitzen üblicherweise einen eigenen *origin of replication* und werden somit bei der Zellteilung mit repliziert.

⁸(lat.) am natürlichen Ort, in natürl. Lage, im Körper.

Forschung. Aber sicher ist, dass diese Art der Vervielfachung genomischer Abschnitte zu einer konsekutiven Überexpression vom Protein des jeweiligen Gens führen kann. Da ist es nicht verwunderlich, dass in Amplifikationen für gewöhnlich Onkogene enthalten sind, die so ihre Aktivität steigern können. Der Nachweis von amplifizierten Onkogenen ist deshalb in der Diagnostik von malignen Tumoren besonders interessant, da die Genprodukte zum Teil pharmakologisch beeinflussbar sind und somit ein therapeutisches Ziel darstellen. Gen-Amplifikationen könnten auch einen Surrogat-Parameter für die erhöhte genetische Instabilität eines Krebses und als solcher einen Indikator für eine schlechte Prognose des Patienten bieten. Besonders die deregulierten Gene, die sich hoch amplifiziert darstellen, sind mit einem schlechten Verlauf der Krebserkrankung assoziiert (Chin, DeVries et al. 2006). Ein gutes Beispiel ist das ERBB2 Gen. Es codiert für den Wachstumsfaktor-Rezeptor HER-2/neu, der im gesunden Gewebe, mit Ausnahme des Herzmuskels, nahezu nicht exprimiert wird. Das Gen ist in 15-20% der Brusttumoren in den westlichen Industrienationen amplifiziert sowie überexprimiert, und wie oben erwähnt, ist die Prognose der Patientinnen schlechter, wenn dessen Krebs positiv für HER-2/neu ist (Vogel, Cobleigh et al. 2002). HER-2/neu stellt das Ziel einer Therapie mit dem rekombinanten monoklonalen Antikörper Trastuzumab dar. Bereits als Standard in der interdisziplinären Behandlung des Mammakarzinoms aufgenommen (Deutsche_Krebsgesellschaft 2008), entscheidet eine Immunhistochemie⁹ (IHC) oder eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung (siehe Kapitel 2.5) über den Einsatz des potenten Therapeutikums gegen HER-2/neu. Wegen der relativen Stabilität von DNA im Vergleich zu mRNA oder Proteinen ist eine DNA-Amplifikation in der Diagnostik leichter zu handhaben. Nicht umsonst wird eine Amplifikationsanalyse mittels FISH mehr und mehr für die Diagnostik von Onkogen-Statüs im Gegensatz zur Immunhistochemie in klinischen Brustkrebsproben eingesetzt, denn die FISH wird als die zur Zeit präziseste Methode für die Detektion einer Amplifikation angesehen (Gray, Collins et al. 1994).

⁹Darstellung antigener Strukturen (z.B Tumorantigene) auf o. in Zellen bzw. Geweben mittels daran bindender Antikörper-Farbkomplexe in histol. Präparaten.

1.3 PPFIA1 und Region 11q13

Wie bereits erwähnt gibt es viele Loci, die im Genom einer menschlichen Zelle pathologisch amplifiziert sind. Dazu zählt auch der q13-Abschnitt des Chromosoms 11, ein Locus mit vielen genetischen Veränderungen, die mit einer Häufigkeit von bis zu 37% in einer großen Anzahl von menschlichen Malignomen wie Kopf-Hals-Tumoren, Kaposi-Sarkomen, dem multiplen Myelom, Ösophagus-, Leber- und Pankreas-Karzinomen sowie Blasen-, Ovarial- und Brustkrebs beobachtet werden (Delli Bovi, Curatola et al. 1987; Gansauge, Gansauge et al. 1997; Janssen, Vaandrager et al. 2000; Bieche, Olivi et al. 2002; Janssen, Cuny et al. 2002; Zaharieva, Simon et al. 2003; Chuma, Sakamoto et al. 2004; Lambros, Fiegler et al. 2005; Freier, Sticht et al. 2006). Damit liegt das Gen in einer der meist amplifizierten Regionen des Genoms, die aktuell in bösartigen Tumoren bekannt sind. Viele Studien weisen einen schlechten klinischen Verlauf in Verbindung mit einer 11q13-Amplifikation auf (Michalides, Hageman et al. 1996; Seshadri, Lee et al. 1996; Bieche, Olivi et al. 2002; Ashman, Patmore et al. 2003; Wreesmann, Shi et al. 2004). In circa 20% der Fälle von Brustkrebs ist eine 11q13-Amplifikation zu beobachten (Karlseder, Zeillinger et al. 1994; Al-Kuraya, Schraml et al. 2004). Es wird angenommen, dass CCND1 das wichtigste treibende Gen der 11q13-Amplifikation ist, da es in der Regel in der Amplifikation enthalten (Karlseder, Zeillinger et al. 1994; Ormandy, Musgrove et al. 2003) und die Expression seines Proteins CyclinD1 in 11q13 amplifizierten Krebsarten stark hochreguliert ist (Bieche, Olivi et al. 2002). Außerdem hat CyclinD1 eine wichtige Funktion als Regulator im Fortschreiten des Zellzyklus der G1-Phase (Fu, Wang et al. 2004; Yang, Hitomi et al. 2006), weshalb es als Proto-Onkogen¹⁰ angesehen wird. Allerdings sind die amplifizierten Bereiche für gewöhnlich groß, umfassen bis zu mehreren Megabasen und beinhalten multiple Gene, von denen nicht nur eines bei dem Prozess der malignen Transformation mitwirken muss. Zum Beispiel ist das codierende Gen für die Topoisomerase-2 α (TOP-2 α) auf Chromosom 17q21 in 90% der Brustkrebs-Fälle, die am selben Locus HER-2/neu amplifiziert sind, ebenfalls amplifiziert (Jarvinen and Liu 2003). TOP-2 α ist das molekulare Angriffsziel für die Anthracyclin-Therapie und es gibt Hinweise, dass Patienten mit einer HER-2/TOP-2 α Coamplifikation von einer

¹⁰Potentiell Onkogen.

Kombinations-Therapie gegen beide Genprodukte profitieren (Coon, Marcus et al. 2002; Cardoso, Durbecq et al. 2004; Arriola, Rodriguez-Pinilla et al. 2007).

Eine 11q13-Amplifikation umfasst etwa 2-10 Megabasen (Huang, Gollin et al. 2002; Freier, Sticht et al. 2006; Jin, Jin et al. 2006; Gibcus, Menkema et al. 2007) und beinhaltet mehrere andere Gene wie MYEOV, ORAOV1, FGF19, FGF3, FGF4, TMEM16A, FADD, PPFIA1, CTTN oder SHANK2, die in der Nähe von CCND1 liegen (Katoh 2005). Es besteht der Verdacht, dass einige dieser Gene für die Entstehung des Brustkrebs und dessen Progression neben CCND1 wichtig sein könnten (Karlseder, Zeillinger et al. 1994; Serra-Pages, Medley et al. 1998). In drei aktuellen Array Comparative Genomic Hybridization¹¹ (CGH) -Studien wurde eine Amplifikation von PPFIA1 als ein rezidivierendes Ereignis in Zelllinien und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) identifiziert (Jarvinen, Autio et al. 2006; Gibcus, Menkema et al. 2007; Tan, Zhu et al. 2008), ein Tumortypus, der häufig von 11q13-Amplifikationen betroffen ist.

1.4 Funktion von Liprin- α 1

Das PPFIA1-Gen liegt auf dem q-Arm des Chromosoms 11 (genaue Lokalisation: 69.794.471 – 69.908.150) und misst 113.680bp. Es codiert für das Protein Liprin- α 1 auch genannt PTPRF (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type F) -Interacting Protein- α 1, LAR-Interacting Protein-1 oder kurz LIP.1 (www.ensembl.org 09/2006). LIP.1 ist der Prototyp aus der evolutionär konservierten Liprin- α Familie, zu denen heute Liprin- α 1, - α 2, - α 3 und - α 4 gezählt werden. Liprin- α 2 und - α 3 sind ausschließlich im zentralen Nervensystem zu finden, Liprin- α 1 und - α 4 werden ubiquitär exprimiert. Die Protein Familie zeichnet sich durch eine N-terminale Doppelhelix aus, durch die sich Mitglieder der Familie homo- oder heteromultimerisieren können. Alle weisen am C-terminalen Ende drei SAM-Domänen (Sterile- α -Motif) auf, die eine LH-Region (Liprin Homology) ausmacht, mit der Liprin- α 's an bestimmte andere Proteine binden können, wie zum Beispiel Mitglieder der Liprin- β Familie (Serra-Pages, Medley et al. 1998). Generell ist bekannt, dass SAM-Domänen RNA (Green, Gardner et al. 2003) sowie Lipidmembranen binden (Barrera,

¹¹CGH nutzt die Hybridisation von unterschiedlich gemarketer Tumor- und Referenz-DNA, um eine Abbildung von DNA-Kopiezahl Veränderungen in Tumorgenomen zu generieren. DNA-Verluste und Zugewinne werden so sichtbar.

Poveda et al. 2003). Jene der Liprin- α Familie reagieren nach Hinweisen zusätzlich mit ATP, um sich zu autophosphorylieren (Serra-Pages, Streuli et al. 2005). Liprin- α 's sind demnach gut ausgestattet verschiedenste zelluläre Komponenten an der Zellmembran miteinander zu verbinden. Und tatsächlich interagiert LIP.1 mit mehreren Proteinen, die in verschiedene Funktionen eingebunden sind. Wahrscheinlich reguliert es den Abbau von Fokalen Adhäsionen (FAs), die in Zell-Extrazellulärmatrix Interaktionen beteiligt sind und verschiedene Prozesse, wie die Zellmigration und Zelldifferenzierung beeinflussen (Hynes and Lander 1992). Bewegliche Zellen, wie metastasierende Tumorzellen, weisen in naher Umgebung der Zellmembran FAs auf. Außerdem wurde eine erhöhte Phosphorylierung von den FA assoziierten Proteinen gefunden (Guan and Shalloway 1992), zu denen LIP.1 gehört. Wahrscheinlich durch die Autophosphorylierung von LIP.1 geregelt, lokalisiert es das Protein LAR (Leukocyte Common Antigen) Receptor-like Tyrosine Phosphatase an die FAs (Serra-Pages, Kedersha et al. 1995). LAR ist ein in vielen Geweben exprimiertes Transmembran-Protein, besitzt eine zelladhäsionsähnliche Außendomäne sowie zwei intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphatase-Domänen und ist unter anderem an der Brustdrüsenentwicklung beteiligt. Das zeigten Schaapveld et al. an weiblichen Mäusen mit gezielt gestörten LAR-Genen, die in der späten Schwangerschaft eine beeinträchtigte Enddifferenzierung der Alveoli aufwiesen und dadurch nicht zu Laktation fähig waren (Schaapveld, Schepens et al. 1997). Später berichteten Yang et al., dass in Brusttumorzelllinien und in menschlichen Brustkrebsen deutlich erhöhte LAR-mRNA-Level und eine mehr als zehnfache LAR-Protein-Expression zu finden seien (Yang, Zhang et al. 1999). Dies beobachteten zuvor Zhai et al., die eine erhöhte LAR-Expression als eine Art Antwort in Her-2/neu positiven Tumoren verstanden (Zhai, Beittenmiller et al. 1993). Levea et al. berichten über eine positive Korrelation der LAR-Expression in ER (Estrogen-Rezeptor) positiven Brustkrebsgeweben, jedoch sind die verwendeten Fallzahlen in dieser Studie recht klein (Levea, McGary et al. 2000). Die Untersuchung der LAR-Expression via monoklonaler Antikörper gegen die P-Untereinheit LARs ergab keine erhöhten Protein-Level in Brustkrebs, dafür aber in Schilddrüsenkarzinomen (Konishi, Tsujikawa et al. 2003). Die Bedeutung von LAR in der Brustkrebsentwicklung ist bis heute nicht geklärt, auch nicht die Verbindung mit LIP.1, das in einem Komplex mit LAR vorliegt und agiert.

Nicht nur im Zusammenhang mit LAR kann LIP.1 mit Brustkrebs in Verbindung gebracht werden. Mit einem seiner weiteren Bindungspartner steht LIP.1 ebenso in Verdacht, in Malignomen eine Bedeutung zu haben, dem ING4 (Inhibitor of Growth), ein Tumorsuppressor-Protein, das eine große Rolle in der Genregulation, Zellzykluskontrolle, Apoptose und Angiogenese spielt. ING4 ist zum Beispiel in Glioblastomen (Garkavtsev, Kozin et al. 2004) signifikant reduziert, Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs weisen in einer Studie einen 66%igen allelischen Verlust von ING4 und eine erniedrigte Expression (mRNA) von 76% in 50 Fällen auf (Gunduz, Nagatsuka et al. 2005). Im malignen Melanom ist eine geringere immunohistochemische Gewebefärbung von ING4 mit einer größeren Dicke, Ulzeration und schlechterem Gesamt- sowie krankheitsspezifischem Überleben gekoppelt (Li, Martinka et al. 2008). Auch in Brustkrebs scheint ING4 eine Bedeutung zu haben. Kim et al. detektierten mit Hilfe der CGH-Technik eine 10-20% Deletion des ING4-Locus in Brustkrebszelllinien und primären Brustkrebsen (Kim, Chin et al. 2004). Zusammen mit LIP.1 ist ING4 an Lamellipodien¹² nahe am Vinculin¹³ lokalisiert. In derselben Studie ist eine verminderte Zellteilung und Zellmigration bei einer ING4-Überexpression registriert worden, überraschend aber war das Ergebnis einer LIP.1-Überexpression: sie führte zu verstärktem Zellwachstum. Es wird vermutet, dass LIP.1 als Gegenspieler von ING4 agiert (Shen, Unoki et al. 2007), wonach nicht nur eine Deletion von ING4, sondern auch eine erhöhte Expression/Amplifikation des Opponenten PPFIA1 zur verstärkten Karzinogenese führen könnte.

Schon besser untersucht ist LIP.1 in Neuronen, in denen es ebenfalls exprimiert wird. Hier ist gezeigt worden, dass LIP.1 bei dem Transport von synaptischen Vesikeln eine große Bedeutung zukommt (Miller, DeProto et al. 2005; Teng and Tang 2005). Die Zellmigration, die für eine Metastasierung einer Krebszelle unabdingbar ist, stellt einen hoch koordinativen Prozess dar, in den viele Zellkomponenten involviert sind. Die Wanderung von Zellen beginnt mit einer Zellpolarisation, die den Vesikeltransport zum führenden Zellrand beinhaltet, gefolgt von einer Membranausstülpung und einer Anhaftung von Zellkomponenten. An dem nachziehendem Zellrand erlaubt eine

¹²Ausstülpungen und Vorschub der Zellmembran in eukaryotischen Zellen. Sie dienen insbesondere der Zellmigration.

¹³Membran-Zytoskelett-Protein in fokalen Adhäsionen, das an der Verbindung von Integrin-Adhäsionsmolekülen an das Aktin-Zytoskelett beteiligt ist.

Zerlegung der mitwirkenden Komponenten eine Vorwärtsbewegung. Auch wenn die Rolle von LIP.1 in der Zellmigration noch nicht geklärt ist, so gibt es Hinweise, dass LIP.1 mit all seinen bisher bekannten Funktionen ein potentieller Mitwirkender in der Tumorentstehung und/oder Metastasenbildung in verschiedenen Malignomen sein könnte. Zu diesen Funktionen zählen die Rekrutierung und Bindung von LAR und wahrscheinlich noch vielen weiteren Proteinen an die Fokalen Adhäsionen der Zellmembran, der Vesikeltransport an zytoskelettalen Komponenten und vermutlich auch die Beteiligung am Gleichgewicht des Zellwachstums und Stase zusammen mit ING4.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Studie ist es, die Häufigkeit und potentielle klinische Relevanz der PPFIA1-Amplifikation des Mammakarzinoms im Vergleich zu CCND1 umfassend zu validieren. Dazu stehen Gewebeproben von über 2.000 Mammakarzinomen mit histopathologischen und klinischen Verlaufsdaten zur Verfügung.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengewebe

Der Tissue Microarray (TMA), der für diese Studie benutzt wurde, ist im Detail bereits beschrieben worden (Ruiz, Seibt et al. 2006). Er beinhaltet 2.197 Formalin-fixierte (neutrale 4% wässrige Pufferlösung), Paraffin-gebettete Tumoren, die alle histologischen Grade und Tumor-Stadien von Brustkrebs repräsentieren. Von allen Patienten waren klinische Verlaufsdaten verfügbar. Die Verwendung dieser Daten wurde durch die Ethikkommission des Universitätsspitals Basel genehmigt. Das mittlere Patientenalter betrug 62 Jahre (Bereich von 26 bis 101 Jahre), bei einer durchschnittlichen Beobachtungszeit von 68 Monaten (Bereich von 1 bis 176 Monate). Die Roh-Überlebensdaten waren entweder dem Krebsregister Basels entnommen oder stammen von den betreuenden Ärzten der betroffenen Patientinnen. Der pathologische Status mit Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Grading ist nach der TNM-Klassifikation der UICC (Wiley 2002) den primären Pathologieberichten entnommen worden. Alle histologischen Schnitte jeden Tumors wurden von zwei Pathologen begutachtet (Prof. G. Sauter, Prof. J. Torhorst), um den histologischen Malignitätsgrad (Grading) nach BRE zu erheben (Bloom and Richardson 1957; Elston and Ellis 1991). Die genaue Zusammensetzung des TMA ist in Tabelle 3-1 angegeben.

Die Herstellung und der Aufbau eines TMA sind ebenfalls bereits beschrieben worden (Simon, Mirlacher et al. 2004). Es werden dafür Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0.6 mm aus repräsentativen Tumorarealen gestanzt. Diese Tumoren sind die oben genannten Formalin-fixierten, Paraffin gebetteten Tumorproben. Die Stanzen, ähnlich einer Biopsie, werden in neuen Paraffinblöcken reihenweise angeordnet, so dass in diesem Fall jeder dieser Blöcke zwischen 342 und 522 Patientenproben enthält. Mit dem Mikrotom werden 4 bis 5µm dünne Blätter der TMA-Blöcke geschnitten, die auf einen Objektträger gebracht werden. Das Resultat ist ein Array mit sogenannten Spots, die durch ihre Platzbezeichnung eine zweifelsfreie Zuordnung zum Donor und dessen Gewebe möglich machen. Mit Hilfe des TMA können jetzt zur selben Zeit mit multiplen individuellen Gewebeproben experimentelle

Untersuchungen stattfinden, und zwar bei nahezu gleichen Bedingungen für jede Tumorprobe.

2.2 pBac-E.coli-Klon-Kultivierung

Ein Bakterien-Klon mit einem Vektor/Plasmid (pBac-E.coli-Klon) ausgestattet wurde via Internet im Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org 09/2006) herausgesucht. Für die Herstellung der Gen-Sonde wurde letztendlich der Klon BAC RP11-113L16 verwendet und über das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD Germany) bezogen. Dessen Plasmid enthält einen DNA-Abschnitt, der PPFIA1 relativ spezifisch abdeckt. Der Klon wurde als Stab-Stock-Kultur geliefert und zur längeren Konservierung in einen Glycerol-Stock überführt.

2.2.1 Geräte

Feinwaage, BP2100S von Satorius; Autoklav, Typ400 von Varioklav; Bunsenbrenner, Fireboy von TecNoMara; Schüttler, IH50 von Incutec; Erlenmeyerkolben, Pinzetten, Pipetten, Zahnstocher, 2ml-Kryoröhrchen.

2.2.2 Reagenzien

pBac-E.coli Klon, RZPD Produkt Nummer: RP11-113L16; Produkt Name: RP11-168B7 (Stab-Stock-Kultur), Vector: pBACe3.6; Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base) von Invitrogen, Medium 25g (25g/L in dH₂O), autoklaviert; Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol abs.) von Sigma-Aldrich; 60% Glycerol.

2.2.3 Durchführung

Alle Arbeitsschritte bis zur Inkubation werden aus Sterilitätsgründen vor einem Bunsenbrenner durchgeführt. Dabei werden 10ml des autoklavierten LB-Mediums in einen 100 ml Erlenmeyer-Kolben mittels Pipette gefüllt, ebenso 30µl Chloramphenicol-Lösung. Mit abgeflammter Pinzette wird ein Zahnstocher gefasst, ein Abstrich aus der Stab-Stock-Kultur genommen und damit das LB-Medium beimpft. Alternativ werden 10µl pBac-E.coli-Kultur aus dem aufgetauten und durchmischten Glycerol-Stock in das LB-Medium überführt und der Ansatz im Erlenmeyer-Kolben für zwei Tage bei Raumtemperatur und 200rpm im Schüttler inkubiert. 10µl der trüben Bakterien-Kultur werden erneut in 10ml autoklaviertes, mit 30µl Chloramphenicol versetztes LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C und 200rpm im Schüttler inkubiert.

Wurde der Klon erstmals aus dem Stab-Stock angezogen, so sind mindestens 2 Glycerol-Stocks angelegt worden. Hierbei werden 1ml der pBac-E.coli-Kultur aus dem zweiten Ansatz mit 320µl autoklaviertem Glycerol (60%) in 2ml-Kryoröhrchen pipettiert, gut durchmischt (Endkonzentration 15% Glycerol) und zügig bei -80°C tiefgefroren.

2.3 DNA-Extraktion

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA, auf der sich der gewünschte DNA-Abschnitt befindet, wurde aus der pBac-E.coli-Kultur mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen nach Protokoll (modifiziert) die DNA extrahiert und die Plasmid-DNA von der chromosomalen Bakterien-DNA getrennt. Es handelt sich bei diesem Verfahren um eine alkalische Lyse, das meist genutzte Verfahren zur Plasmid-Extraktion. Dabei werden die Bakterien-Klone von ihrem Medium getrennt, resuspendiert und alkalisch lysiert. Die chromosomale DNA sowie die Plasmid-DNA werden durch eine Lauge denaturiert, eine RNase verdaut die bakterielle RNA, Kaliumacetat zur Neutralisation fällt alle Proteinbestandteile der Bakterien aus, ebenso deren chromosomale DNA, die an viele Proteine gebunden ist. Die Plasmid-DNA renaturiert und bleibt in Lösung. Anschließend wird die Plasmid-DNA von den Zelltrümmern getrennt und aufbereitet/gereinigt.

2.3.1 Geräte

Zentrifuge, Jota-Ave von B.Braun Biotech International; Thermomixer, 5436 von eppendorf; Spectrophotometer, NanoDrop ND-1000 von peqLab; Pipetten, 1,5ml Tubes, 2ml Tubes.

2.3.2 Reagenzien

QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAgen 50, enthält: Buffer P1 (20ml P+200µl RNase A (10mg/ml), bei 4°C, Buffer P2, Buffer N3, Buffer PE, Elution Buffer (EB: 10mM Tris-Cl, pH 8,5) sowie „QIAprep spin“ Säulen; pBac-E.coli-Kultur.

2.3.3 Durchführung

3 bis 4ml (abhängig von Trübung/Wachstum des Ansatzes) der pBac-E.coli-Kultur werden in einem 2ml Tube in einer Tischzentrifuge (~17.900 x g) für 90sek bei 13.000rpm pelletiert, der Überstand abgegossen. Das Pellet wird in 250µl Puffer P1

vollständig mit Hilfe einer Pipette resuspendiert. 250µl Puffer P2 werden zur Suspension hinzugefügt und 5 bis 15x invertiert. Anschließend werden 350µl Puffer P3 in das Tube pipettiert und sofort 5 bis 15x invertiert. Das Gemisch wird für 10min bei 13.000rpm zentrifugiert, der Überstand in eine QIAprep spin-Säule überführt. Die Spin-Säule wird in einen 2ml Tube gesteckt und für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält jetzt die Plasmid-DNA und wird noch gereinigt. Die QIAprep-spin-Säule wird mit 500µl PE-Puffer beladen und für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Dieser Waschschrift wird mit PE-Puffer wiederholt und der Durchfluss verworfen. Erneut wird für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert und der 2ml Tube von der Säule getrennt und verworfen. Die Spin-Säule wird in einen 1,5ml Tube gesetzt und mit 50µl 70°C warmem Elution-Puffer (im Thermomixer zuvor erwärmt) gefüllt und 1min bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt wird die Spin-Säule im Tube für 1min bei 13.000rpm zentrifugiert, die Spin-Säule verworfen.

Die Konzentration und der Reinheitsgrad der Plasmid DNA werden mit dem Nanodrop bestimmt. Die Aufbewahrung der DNA erfolgt im 1,5ml Tube bei 4°C.

2.4 DNA-Sonden Herstellung

Die *Nick-Translation* ist eine DNA-Markierungstechnik, die 1977 von Peter W.J. Rigby und Kollegen entwickelt wurde. Sie nutzt die Reparaturfunktion des Enzyms DNA-Polymerase I, um markierte Nukleotide in Einzelstrangbrüchen, sogenannten „Nicks“, die von dem Enzym DNase I erzeugt werden, in den DNA-Doppelstrang einzubauen. Dabei wird die Plasmid-DNA gleichzeitig in kürzere Fragmente zerlegt, so wie es für die spätere Hybridisierung mit der Gewebe-DNA notwendig ist. Die Fragment-Längen können durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert werden.

Die Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt. Das Protokoll des Kits wurde modifiziert. Eine DNA-Menge von entsprechend 2µg DNA, höchstens aber 38µl DNA-Lösung, werden pro Ansatz verwendet. Die zu pipettierende DNA-Lösung muss wegen der schwankenden DNA-Ausbeute aus der Extraktion, ausgerechnet werden. Dabei können nur DNA-Extrakte mit einer Konzentration von mindestens 56.6 ng/µl (=2000ng / 38µl) verwendet werden. Bei höher konzentrierten DNA-Extrakten wird entsprechend weniger eingesetzt und das

fehlende Volumen zu 38µl mit dH₂O aufgefüllt. Folgend wird das benötigte Volumen berechnet:

$$\frac{2000\text{ng}}{[\text{X}]_{\text{DNA Extrakt}} \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}} = X_{\text{DNA Extrakt}} \mu\text{l} \quad \text{Formel 2-1}$$

2.4.1 Geräte

Minishaker MS1 von IKA; Zentrifuge, Biofuge fresco von Heraeus Instruments; Thermocycler, PTC-100 von MJ-Research, Inc.; Pipette; 0,5ml Tube.

2.4.2 Reagenzien

Nick Translation System von Invitrogen, enthält: dNTP-Mix ohne dTTP (0.2mM je Nukleotid), Pol I/DNaseI-Mix (0.5U/µl Pol I und 0.4U/µl DNaseI), Stop-Buffer (0.5M EDTA, pH 8.0) und dH₂O; DNA Polymerase I von Invitrogen; Digoxigenin-11-dUTP von Roche; Plasmid-DNA.

2.4.3 Durchführung

Die Reagenzien werden nach folgendem Pipettierschema in einen 0,5ml Tube pipettiert.

Tabelle 2-1 Dig - Nick Translations Ansatz

Reagenz	Menge
dNTP-Mix ohne dTTP	5 µl
Digoxigenin-11-dUTP	1 µl
pBac-DNA-Lösung	X µl (entspr. ca. 2µg, Höchstvol. 38µl)
dH ₂ O	X µl (zu 38µl DNA-Lsg. fehlendes Vol.)
Pol I-/DNase Enzym Mix	5 µl
DNA Polymerase I	1 µl
Gesamt	50 µl

Das Tube wird sofort verschlossen und mit dem Vortex gemixt, der Ansatz mit einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. Im Thermocycler wird für 90min bei 15°C inkubiert. Anschließend werden nochmals 5µl Pol I/DNase-Mix in den Ansatz gegeben, zügig mit der Pipette verrührt und für weitere 15min bei 15°C im Thermocycler inkubiert. Nach Ablauf der 15min wird die Nick-Translation mit Zugabe von 5µl Stop-Buffer gestoppt.

Hierbei muss wieder auf dem Vortex gemischt und der Ansatz anschließend kurz zentrifugiert werden. Die nun fertige DNA-Sonde wird bei höchstens 4°C gelagert.

2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* (kurz: FISH) ist ein Verfahren zur Darstellung von RNA, einzelner oder mehrerer DNA-Sequenzen (bzw. Genabschnitte) oder ganzer Chromosomenbereiche im Gewebe, einzelnen Zellen oder Metaphase-Chromosomen. Die in-situ-Hybridisierung wurde erstmals vom US-amerikanischen Biologen Pardue und Joe Gall Ende der 1960er Jahre entwickelt (Pardue and Gall 1969).

Bei der Untersuchung einer bestimmten DNA-Sequenz wird diese mit einer künstlich hergestellten DNA-Sonde (auch Gen-Sonde), die komplementär zur untersuchenden Sequenz ist, über Basenpaarung spezifisch im Gewebe hybridisiert. Die Gen-Sonde kann direkt mit Fluorochromen (z.B. FITC, RRX) oder indirekt mit Hapten¹⁴ (z.B. Digoxigenin oder Biotin) markiert werden. Im letzten Fall wird nach der Hybridisierung im Gewebe das Hapten hochselektiv mit einer Folge von Antikörpern detektiert, von denen der letzte mit Fluorochromen bestückt ist. Daraus resultiert ein Antikörperbaum der einer Signalverstärkung dient, um so den gesuchten Genbereich im Gewebe als Gensignal unter dem Mikroskop relativ sicher erkennen zu lassen. Dafür wird das Fluorochrom unter dem Epifluoreszenzmikroskop mit monochromatischem Licht zum Leuchten angeregt und als farbiges Signal sichtbar. Eine kommerzielle Sonde für das Zentromer/Telomer des Chromosoms, auf der sich die gesuchte DNA-Sequenz befindet, dient als Referenz.

2.5.1 Geräte

Küvetten 100ml von Glaswerk Wertheim; Pipetten von eppendorf; temperierbare Wasserbäder von GFL-Gesellschaft für Labortechnik (Typ1002, Typ1083); Heizplatte von MEDAX; Deckgläschen von Marienfeld-Superior; Hybrite – Thermobrite Statspin von Abbot Molecular; Parafilm von Pechiney Plastic Packaging; Brutschrank von WTB Binder; Epifluoreszenzmikroskop von Zeiss; pH-Meter – Digital pH Meter pH525 von WTW-Wissenschaftlich Technische Werkstätten.

¹⁴(gr.) haften; Meist niedermolekulare Substanz, die nicht allein, aber gekoppelt an ein Trägermolekül eine Immunantwort induziert und mit einem spezifischem Antikörper reagiert.

2.5.2 Reagenzien

Xylol von MERCK; Ethanol (70%, 80%, 96%) von MERCK; VP 2000 Pretreatment Reagent (NaSCN, pH5,4) von Vysis; dH₂O; Protease-Lösung: 500ml VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCl, pH2,0) + Protease I (250mg Pepsin) von Vysis; Basis-Hybridisierungsmix aus eigener Herstellung (s.u.); Cot Human DNA¹⁵ von Roche; Gensonden-DNA-Lösung aus eigener Herstellung; Zentromersonde - CEP 11, Spektrum Orange von Abbot; ddH₂O; Fixogum von Marabu; Hybridisierungswaschpuffer aus eigener Herstellung (s.u.); PBS (Phosphate Buffered Saline), bestehend aus NaCl, Na₂HPO₄ von DakoCytomation; Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection von Roche, enthält: Blocking Solution (s.u.); Anti-DIG monoklonaler Maus-Antikörper IgG1 gegen Digoxigenin, Anti-Maus-Ig-DIG-F(ab)² Fragment vom Schaaf, Anti-DIG-Fluoreszin Fab-Fragment vom Schaaf (alle Antikörper: 12.5µg in 500µl 1 x Blocking-Solution); Detektionswaschpuffer aus eigener Herstellung (s.u.); DAPI-Antifade von Vectashield.

2.5.2.1 Puffer und Lösungen

Die für die FISH verwendeten Puffer und Lösungen wurden weitestgehend selbst hergestellt oder nach Anweisung des Herstellers angesetzt.

Basis-Hybridisierungsmix

- 5ml deionisiertes Formamid
- 1g Dextransulfat
- 1.5ml 20 x SSC (Standard Saline Citrate, NaCl)
- 2M HCl
- dH₂O

Alle Reagenzien werden in einen Messzylinder gegeben und bei 60°C auf dem Heizrührer (Ikamag Ret-Gs von IK Labortechnik) mit einem Rührfisch gerührt, bis sich das Dextransulfat gelöst, mit 2M HCl auf pH7.0 eingestellt und mit dH₂O auf 7ml aufgefüllt. Bei 4°C wird der Ansatz aufbewahrt.

Hybridisierungswaschpuffer

¹⁵Humane DNA aus sich wiederholenden Elementen, die durch eine schnelle Anlagerung an repetitive Fraktionen des Genoms unspezifische Bindungsstellen blocken und Kreuzhybridisierungen verhindern. Durchschnittliche Fragmentlänge: 50-300bp.

2 x SSC

0,3% NP40 (Octylphenoloxypolyethoxyethanol)

dH₂O; pH7,25

Detektionswaschpuffer

0.2% TWEEN (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)

1x PBS

dH₂O; pH=7,4

Blocking-Solution¹⁶

10 x konzentrierte Blocking-Solution 1:10 verdünnt mit

1 x PBS

2.5.3 Durchführung

2.5.3.1 Entparaffinierung und Vorbehandlung

Die Objektträger mit den TMA werden 3 x 10min in Xylol und 2 x 5min in 96% Ethanol entparaffiniert. Auf der Heizplatte wird das Ethanol bei 48°C verdampft. Es folgt ein 15min Bad in 80°C heißer Pretreatment-Lösung. Die Objektträger werden nun für 2min in destilliertem Wasser gewaschen. Für 150min schließt sich der proteolytische Verdau in 37°C warmer Protease-Lösung an. Anschließend wird für 2min in dH₂O gewaschen und das Wasser in einer Ethanol-Reihe für jeweils 3min in 70%, 80% und 96% Ethanol wieder entzogen. Der Alkohol wird auf der Heizplatte bei 48°C verdampft.

2.5.3.2 Hybridisierung

Das folgende Pipettierschema zeigt die Herstellung des Sonden-Hybridisierungsmixes für eine Gewebeschnittfläche bzw. Tissue Microarray von ca. 2.4cm x 3.2cm (entspricht einem Objektträger). Sollen mehr Objektträger hybridisiert werden, so müssen die Mengenangaben entsprechend vervielfacht werden. Hinweis: Die kommerzielle Zentromer-Sonde hat bereits einen fluoreszierenden Farbstoff und ist lichtempfindlich, daher sollte im Dunkeln gearbeitet und der Tube lichtundurchlässig umwickelt werden.

¹⁶Lösung aus niedermolekularen Proteinen zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe.

Tabelle 2-2 Sonden-Hybridisierungsmix

Reagenz	Menge
Basis-Hyb-Mix	14 μ l
COT-Human DNA	2.0 μ l
Gensonden DNA	3.5 μ l (aus der Nick-Translation $\approx 0.03\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Zentromer-Sonde	0.5 μ l
ddH ₂ O	X μ l (falls weniger als 4 μ l Sondenvol. auf 4 μ l)
Gesamt	20 μl

20 μ l des Sonden-Hybridisierungsmix werden auf das Gewebe/Spots des Objektträgers pipettiert und mit einem Deckgläschen eingedeckt, so dass sich der Sonden-Hybridisierungsmix auf dem Gewebe/Spots verteilt und sich keine Luftblasen unter dem Deckgläschen befinden. Das Deckgläschen wird mit Fixogum an den Kanten versiegelt (trocknen lassen). Der Objektträger wird in den Hybrite gelegt und das folgende Programm gewählt: 10min bei 72°C für Denaturierung, dann für ca. 48h bei 37°C für die Hybridisierung. Nach dieser Inkubation wird der Objektträger aus dem Hybrite genommen und das Fixogum sowie das Deckgläschen vorsichtig entfernt. Kurz in einer Küvette mit Hybridisierungswaschpuffer (Raumtemperatur) waschen. Wenn in einer anderen Küvette im Wasserbad der Hybridisierungswaschpuffer auf 72°C temperiert ist, wird der Objektträger für 2min in diesem gewaschen, um unspezifische Gensonden-Hybridisierungen zu lösen und zu entfernen. Danach in 1 x PBS stellen.

2.5.3.3 Detektion

Den Objektträger mit 500 μ l 1 x Blocking-Solution bei Raumtemperatur in einer trockenen Kammer 30-60min inkubieren. Danach die Blocking-Solution abkippen und die restliche Feuchtigkeit am Rande des Objektträgers mit einem Papiertuch vorsichtig abnehmen. 50 μ l monoklonaler Anti-DIG Maus-Antikörper IgG1 gegen Digoxygenin (Lösung aus 2 μ l AK + 48 μ l 1x Blocking-Solution) werden auf das Gewebe pipettiert, mit Parafilm abgedeckt (Luftblasen herausstreichen) und 60-90min bei 37°C in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert. In einer 37°C warmen Waschreihe mit Detektionswaschpuffer wird der Objektträger nach Entfernung des Parafilms stringent gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Der Vorgang der Antikörper-Inkubation und der Waschreihe wird mit dem Anti-Maus-Ig-DIG-F(ab)²-Fragment vom Schaaf und dem Anti-DIG-Fluoreszin Fab-Fragment vom Schaaf noch

zwei Mal wiederholt. Hinweis: Der Fluoreszin-gekoppelte AK ist lichtempfindlich, daher sollte das weitere Prozedere wie alle vorigen Schritte im relativen Dunkel stattfinden. Nach der letzten Waschreihe lufttrocknet der Objektträger bei Raumtemperatur und wird anschließend mit 50µl DAPI-Antifade gegengefärbt, mit einem Deckgläschen abgedeckt. Das Untersuchungsmaterial ist nach 15min Einwirkzeit fertig zum Mikroskopieren.

2.6 FISH Analyse

Um die FISH-Analysen zu beschleunigen, wurden die PPFIA1-Kopiezahlen und die Anzahl der Zentromere 11 für jeden Gewebe-Spot geschätzt. Die Daten aus dem FISH Labor haben zuvor gezeigt, dass Diagnosen, basierend auf Schätzungen der Signalanzahl, sehr zuverlässig sind (Simon, Nocito et al. 2001).

Ein Tumor wurde als amplifiziert angesehen, wenn die Ratio zwischen geschätzter Gen-Kopieanzahl von PPFIA1 und Zentromeren 11 ≥ 2.0 betrug. Als hoch amplifiziert wird ein Tumor angesehen, wenn die Ratio ≥ 5 ist und somit bei 2 Zentromer-Signalen mindestens 10 Gen-Signale vorhanden sind. Alle anderen Tumoren sind als nicht amplifiziert betrachtet worden. Abbildung 2-1 und 2-2 geben ein Beispiel für amplifizierte und nicht amplifizierte Tumore.

Abbildung 2-1

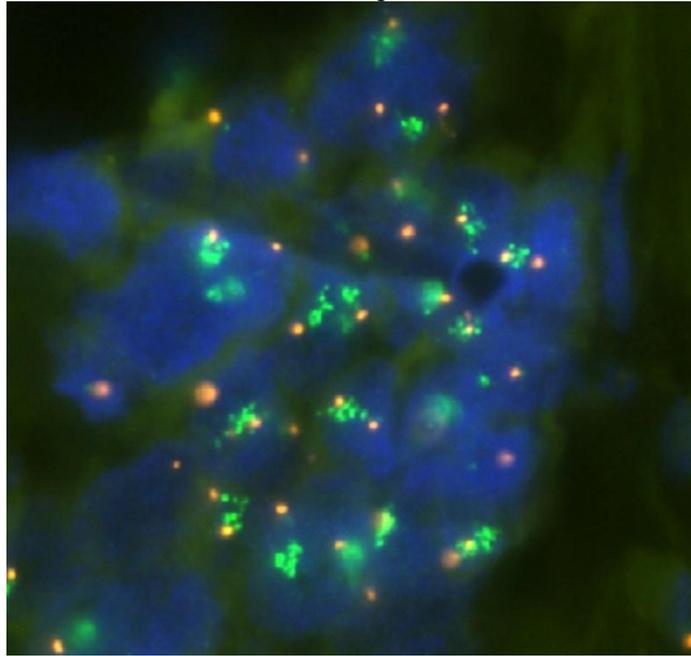
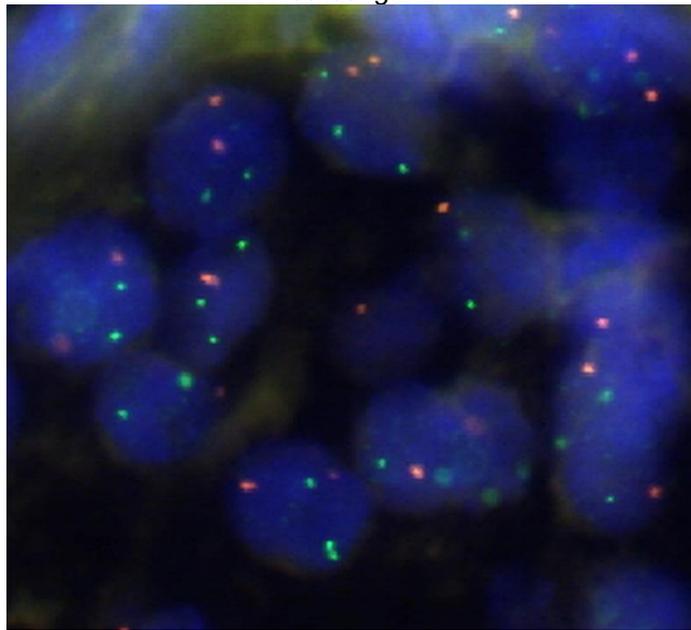


Abbildung 2-2



Ein Beispiel von amplifizierten (Abb.2-1) und nicht amplifizierten (Abb.2-2) Tumorzellen. Die grünen Signale markieren die PPF1A1-Gensequenz, das Zentromer 11 wird durch die orangenen Signale dargestellt. Durch Färbung mit DAPI-Antifade leuchtet die DNA jedes Zellkerns blau. Eine Abgrenzung der einzelnen Zellkerne und die Zuordnung der Gensignale zu einer Zelle werden so möglich.

2.7 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortypus, Grad des Tumors, „Staging“ und Genamplifikationen darzustellen, wurden die „Contingency table analysis“ und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Log-rank-Test wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen Genamplifikationen und Patientenüberleben zu untersuchen. Mit Hilfe der Cox Regression wurden die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander in Relation zum Patientenüberleben gesetzt. Ein p-Wert von <0.05 wird als signifikant betrachtet. SAS Software (SAS Institute Inc, JMP 5.1 Software (Cary, North Carolina, USA)) wurde für die Datenanalyse genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 PPFIA1-Amplifikation und Co-Amplifikation mit CCND1

In 1.772 Fällen der 2.197 Brustkrebsproben des TMA waren Daten von CCND1 aus vorigen Studien vorhanden. In diesen 1.772 Gewebespots waren die FISH-Analysen für PPFIA1 in 1.583 Fällen erfolgreich (89,3%). Gründe für ein Misslingen der Analyse schlossen fehlende Gewebespots auf dem TMA-Schnitt oder ein Fehlen von Tumorzellen im Gewebespot auf dem TMA ein. In den 1.583 analysierbaren Brustkrebsproben wurde in 248 Fällen (15,7%) eine PPFIA1-Amplifikation gefunden. 64 der 248 (4%) Gewebeproben zeigten PPFIA1-Amplifikationen mit mehr als 10 Gensignalen. Beispiele für PPFIA1 amplifizierte und nicht amplifizierte Tumoren sind in Abbildung 2-1 und 2-2 dargestellt. Für die Definition einer CCND1-Amplifikation sind zuvor dieselben Kriterien wie für die PPFIA1-Amplifikation angewendet worden. Die Amplifikations-Rate von CCND1 betrug 23,1%. Alle (248/248, 100%) der PPFIA1 amplifizierten Brustkrebsproben wiesen ebenfalls eine CCND1-Amplifikation auf. Es gab zusätzlich 117 Fälle mit einer alleinigen CCND1-Amplifikation, was 32% der gesamten CCND1-Amplifikationen ausmacht. Insgesamt 68% der Tumoren mit CCND1-Amplifikation waren auch für PPFIA1 coamplifiziert.

Um etwaige Unterschiede der biologischen Eigenschaften einer CCND1-Amplifikation mit und ohne PPFIA1-Amplifikation zu bestimmen, wurden in drei Gruppen, erstens Tumoren mit einer CCND1-Amplifikation unabhängig vom PPFIA1 Status, zweitens Tumoren mit CCND1/PPFIA1-Coamplifikation und drittens Tumoren mit CCND1-Amplifikation aber normalem PPFIA1 Status, die Häufigkeit der Amplifikationen mit dem Tumor-Phänotypus¹⁷ (Tabelle 3-1) und der Prognose (Abbildung 3-1) verglichen. Diese Analysen offenbarten keine Unterschiede zwischen einer alleinigen CCND1-Amplifikation und einer CCND1/PPFIA1-Coamplifikation, weder im Phänotypus noch in der Prognose der Patienten.

¹⁷(gr.) Gepräge, Bild; Summe aller an einem Einzelwesen vorhandenen Merkmale (Erscheinungsform und funkt. Eigenschaften), die durch den Genotypus im Zusammenwirken mit Umwelteinflüssen versch. Art geprägt werden.

Tabelle 3-1 Klinische Daten

	Analy- sierb. Spots	CCND1 Amp. [%]	p- Wert*	CCND1/ PPFIA1 Coamp. [%]	p- Wert*	Alleinige CCND1 Amp. [%]	p- Wert*
Alle Tumoren	1583	23,1		15,7		7,4	
Histologie							
Duktal	1140	24,2		16,7		7,5	
Lobulär	198	30,3		21,2		9,1	
Tubulär	37	2,7		2,7		0	
Medullär	43	9,3		4,7		4,7	
Muzinös	42	26,2		16,7		9,5	
Papillär	21	14,3		9,5		4,8	
Andere	102	9,8		3,9		5,9	
Tumorstadium			0.4668		0.7066		0.4423
pT1	543	21,5		15,5		6,1	
pT2	760	23,2		15,4		8,0	
pT3	92	21,7		14,1		7,6	
pT4	180	27,2		18,3		8,9	
BRE Grad			<0.0001		0.0002		0.0064
G1	390	14,1		9,7		4,4	
G2	640	25,8		17,7		8,1	
G3	552	26,1		17,6		8,5	
Nodalstadium			0.8046		0.5807		0.9044
pN0	662	23,1		15,9		7,3	
pN1	567	21,7		14,1		7,6	
pN2	84	23,8		17,9		6,0	
Rezeptorstatus			<0.0001		<0.0001		0.0009
ER+	1171	26,4		18,2		8,2	
ER-	349	12,3		8,3		4,0	

* versus Tumoren ohne eine 11q13 Amplifikation

Tabelle 3-1 zeigt die klinischen Daten der untersuchten Tumorgewebe mit CCND1-Amplifikation, CCND1/PPFIA1-Coamplifikation und der CCND1-Amplifikation ohne eine PPFIA1-Coamplifikation.

Beide Parameter, eine CCND1/PPFIA1-Coamplifikation und eine CCND1-Amplifikation allein waren signifikant mit ER positiven Brustkrebsen ($p < 0.0001$, $p = 0.0009$) sowie Tumoren mit einem BRE-Grad von G2 und größer assoziiert ($p = 0.0002$, $p = 0.0064$) waren aber ohne Bezug zum pT und pN Status. Zwischen einer CCND1/PPFIA1-Coamplifikation und einer CCND1-Amplifikation allein wurden keine signifikanten Unterschiede der klinischen Daten gefunden.

3.2 Prognostische Relevanz

Um den Effekt von einer PPFIA1-Amplifikation und/oder einer CCND1-Amplifikation auf die Patientenprognose zu analysieren, wurden Kaplan-Meier Diagramme für die Überlebensanalysen generiert (Abbildung 3-1 bis 3-3).

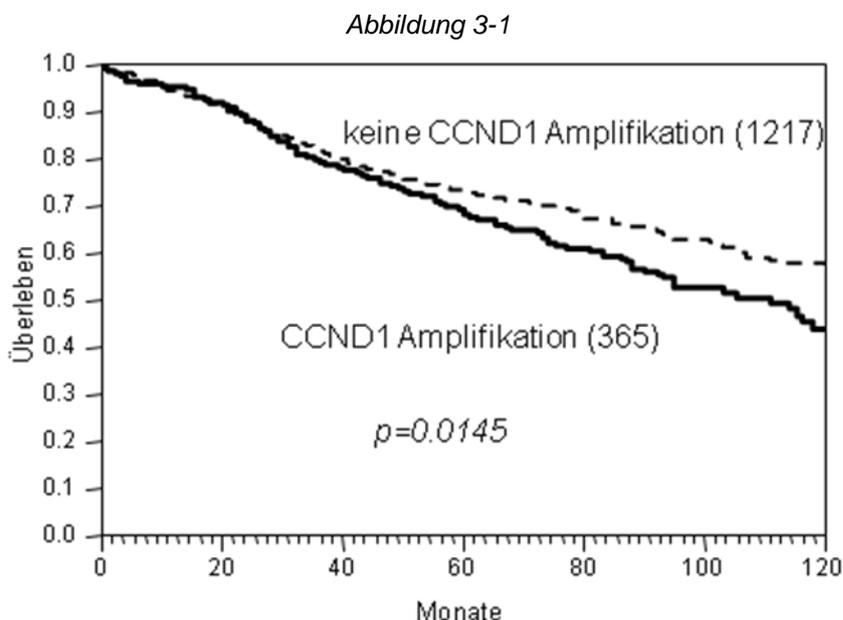


Abbildung 3-1 zeigt die Überlebenskurven von Brustkrebspatienten mit und ohne CCND1-Amplifikation, unabhängig des PPFIA1-Amplifikationsstatus. Die Prognose über 10 Jahre ist für die Patienten mit CCND1-Amplifikation im Tumor signifikant verschlechtert.

Abbildung 3-2

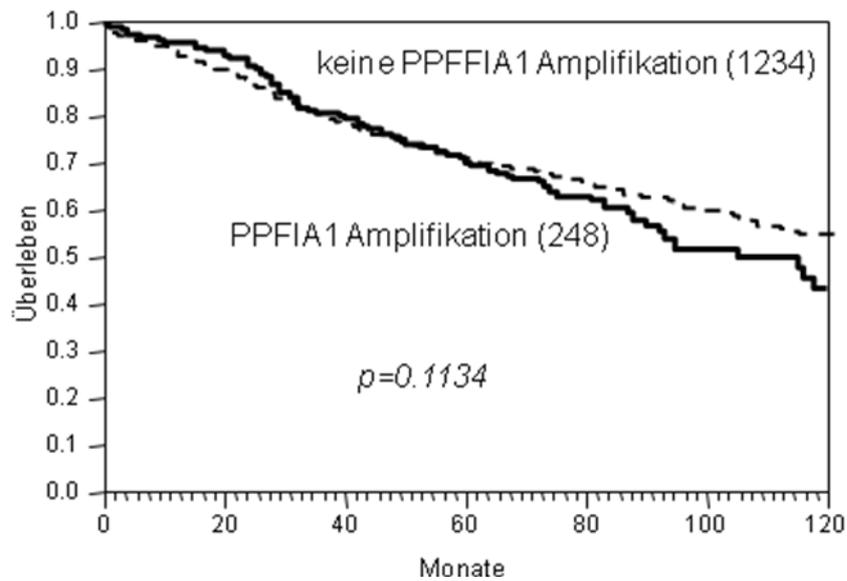
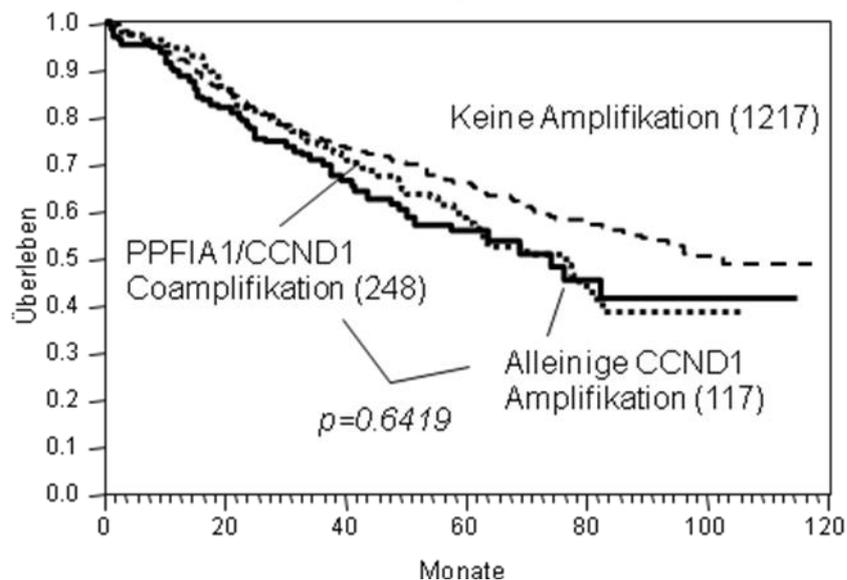


Abbildung 3-2 stellt die Kaplan-Meier Diagramme von allen Tumoren mit und ohne einer PPFIA1-Amplifikation ungeachtet einer CCND1-Amplifikation dar. Es ist kein Unterschied im Gesamtüberleben bei Tumoren mit und ohne PPFIA1-Amplifikation zu finden.

Abbildung 3-3



Eine alleinige CCND1-Amplifikation wird mit der CCND1/PPFIA1-Coamplifikation und Tumoren ohne eine Amplifikation (weder von CCND1 noch PPFIA1) in Abbildung 3-3 verglichen. Auch wenn Tumoren mit einer CCND1/PPFIA1-Coamplifikation eine

schlechtere Prognose zeigen als jene ohne eine der genannten Amplifikationen, so unterscheidet sie sich nicht von der einer alleinigen CCND1-Amplifikation.

3.3 Einfluss einer 11q13 Amplifikation auf das Ansprechen einer Tamoxifen Therapie

Um den möglichen Einfluss einer PPFIA1-Amplifikation auf das Ansprechen einer Anti-Estrogen-Rezeptor (ER) Therapie abzuschätzen, wurde das Überleben der Patienten mit einer PPFIA1-Amplifikation und CCND1-Amplifikation separat mit denen ohne einer der beiden Amplifikationen in einer Untermenge von 211 bzw. 168 Patienten, welche den ER-Inhibitor Tamoxifen als einzige Behandlung erhalten haben, verglichen.

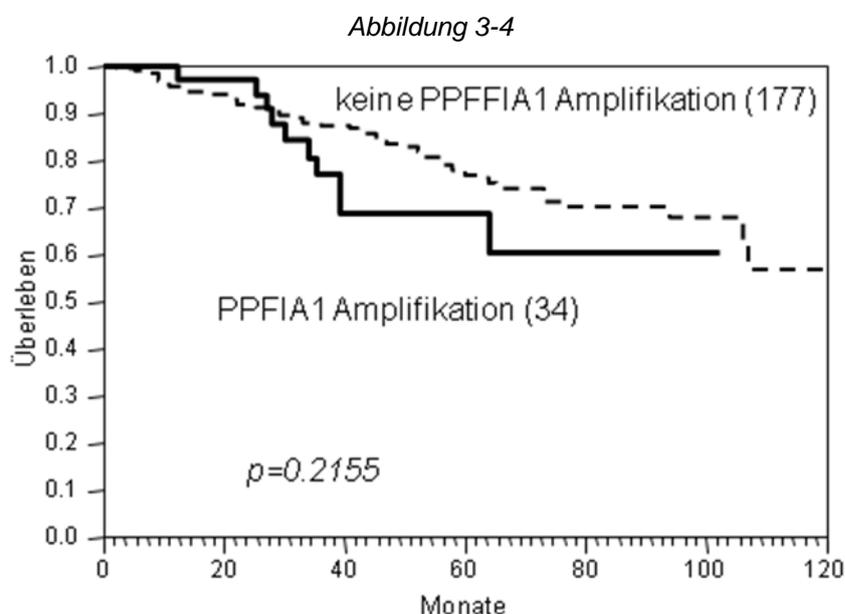


Abbildung 3-4 vergleicht das Überleben von Patienten mit und ohne PPFIA1-Amplifikation, die eine Tamoxifen-Therapie erhielten. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen gefunden werden.

Abbildung 3-5

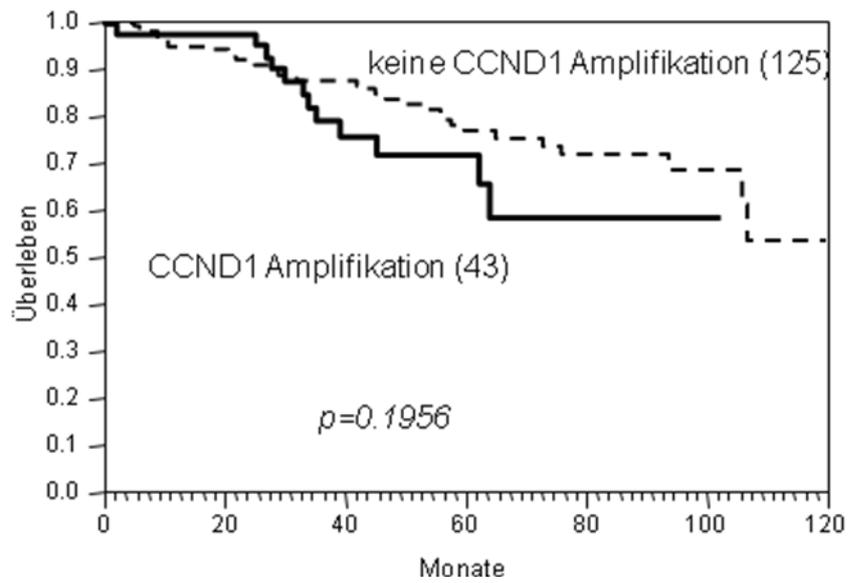


Abbildung 3-5 zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Überleben bei 168 Patienten mit Tamoxifen-Behandlung, wenn alle CCND1 amplifizierten Tumoren einbezogen sind, unabhängig vom Status der PPFIA1-Coamplifikation.

4 Diskussion

In dieser Studie wurde das Coamplifikations-Muster von CCND1 und PPFIA1 in einer großen Kohorte von mehr als 2.000 Mammakarzinomen in einem Tissue Microarray (TMA) Format untersucht. Dazu sind die Proben mit der FISH-Technik nach einer PPFIA1-Amplifikation durchsucht worden. Der TMA ist im Rahmen voriger Studien mit mehreren molekularen Markern, die eine potentielle Relevanz für Brustkrebs haben, einschließlich der CCND1-Genamplifikation, analysiert worden. Diese Daten konnten daher im Zusammenhang mit der PPFIA1-Amplifikation für eine gemeinsame Analyse verwendet werden. Basierend auf der Hypothese, dass CCND1 amplifizierte Malignome mit oder ohne PPFIA1-Coamplifikation einen klinischen oder histologischen Unterschied zeigen könnten, wurden 117 Tumoren mit einer alleinigen CCND1-Amplifikation mit 248 Tumoren, die eine CCND1/PPFIA1-Coamplifikation aufwiesen, verglichen.

Eine PPFIA1-Amplifikation wurde in 15% der Gewebeproben gefunden, was es zu einem häufig amplifizierten Gen in Brustkrebs macht. Allerdings zeigt der Vergleich mit den bestehenden CCND1 Daten (Al-Kuraya, Schraml et al. 2004), dass eine PPFIA1-Amplifikation ausschließlich in Tumoren vorkommt, die auch eine CCND1-Amplifikation vorweisen. Diese Tatsache, und, dass CCND1 häufiger auch ohne PPFIA1 in Brustkrebstumoren amplifiziert ist, spricht an sich gegen eine biologische Bedeutung einer PPFIA1-Amplifikation in Brustkrebs. Bei dem Vergleich der klinisch-histologischen Daten blieben Unterschiede zwischen Tumoren mit einer alleinigen CCND1 und einer CCND1/PPFIA1-Coamplifikation aus. Das erhärtet die Hinweise gegen eine signifikante biologische Rolle und/oder klinischen Effekt einer PPFIA1-Amplifikation in Brustkrebs. Die Daten legen nahe, dass eine PPFIA1-Amplifikation nicht als ein unabhängiges Ereignis auftritt, sondern sich sehr wahrscheinlich im Verlauf einer CCND1 angetriebenen 11q13-Amplifikation entwickelt. Obwohl keine PPFIA1-Amplifikation bei der Absenz von einer CCND1-Amplifikation zu beobachten ist, kann eine biologische Rolle von PPFIA1 in anderen Krebsarten nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Basierend auf den Resultaten von Studien, die eine Bedeutung von PPFIA1 in anderen Tumorarten wie Larynxkarzinomen vorschlagen (s.u.), könnte

über einen möglichen Effekt für CCND1 amplifizierte Zellen mit einer simultanen PPFIA1-Überaktivierung spekuliert werden. Zumindest kann aber ein histologischer sowie klinischer Einfluss auf das Überleben von Patientinnen mit Brustkrebs, wie diese Studie zeigt, ausgeschlossen werden.

In Brustkrebs tritt eine 11q13-Amplifikation in bis zu 20% der Tumoren auf (Karlseder, Zeillinger et al. 1994; Al-Kuraya, Schraml et al. 2004). Es ist in einer Mehrzahl von Malignomen einschließlich des Mammakarzinoms amplifiziert und in vielen Studien mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert (Michalides, Hageman et al. 1996; Seshadri, Lee et al. 1996; Bieche, Olivi et al. 2002; Ashman, Patmore et al. 2003; Wreesmann, Shi et al. 2004). Es wird angenommen, dass CCND1 (CyclinD1) das wichtigste treibende Gen in der 11q13-Amplifikation ist, da es in der Regel in der Amplifikation enthalten (Karlseder, Zeillinger et al. 1994; Ormandy, Musgrove et al. 2003) und die CyclinD1-Proteinexpression stark hochreguliert ist (Bieche, Olivi et al. 2002). Außerdem wird CyclinD1 eine bedeutende Funktion als Regulator im Fortschreiten des Zellzyklus der G1-Phase zugeschrieben (Fu, Wang et al. 2004; Yang, Hitomi et al. 2006). Allerdings ist die Ausdehnung einer Amplifikation für gewöhnlich groß, umfasst bis zu mehreren Megabasen und beinhaltet multiple Gene, von denen viele bei dem Prozess der malignen Transformation mitwirken könnten. Die Gene, die vermutlich für die Entstehung einer Amplifikation führend sind, können nicht immer einfach bestimmt und klar von den umliegenden Genen als einzig verantwortliches Gen getrennt werden. Es gibt viele Diskussionen und offene Fragen darüber, ob und wie mehrere Gene in derselben Amplifikation ihren Einfluss ausüben könnten (Zender, Spector et al. 2006). Das trifft besonders auf die 11q13-Amplifikation zu, die schon in unzähligen Studien untersucht worden ist und durch ihre Komplexität immer wieder die Aufmerksamkeit der Forschung erlangt. Sie misst etwa zwei bis neun Megabasen (Huang, Gollin et al. 2002; Freier, Sticht et al. 2006; Jin, Jin et al. 2006; Gibcus, Menkema et al. 2007) und ist eine sehr genreiche, phylogenetisch hoch konservierte Region des Genoms (Katoh 2003). Neben CCND1 beinhaltet sie mehrere weitere Gene wie MYEOV, ORAOV1, FGF19, FGF4, FGF3, TMEM16A, FADD, PPFIA1, CTTN oder SHANK2 (Katoh 2005) und zeigt eine variable Ausdehnung (Jarvinen, Autio et al.

2006) sowie in manchen Studien mehrere unterschiedliche Amplifikations-Spitzen (Lin, Smith et al. 2006).

Drei aktuelle Array CGH-Studien identifizierten eine PPFIA1-Amplifikation als rezidivierendes Ereignis in Zelllinien und Primärkarzinomen des Kopf/Hals-Bereichs, einem Tumortyp, der häufig von 11q13-Amplifikationen betroffen ist. In einer von ihnen ist PPFIA1 zusammen mit FADD als ein hoch amplifiziertes Gen mit der höchsten Korrelation zwischen der DNA-Kopiezahl und der Expression gefunden worden, neben CCND1 und CTTN als ebenfalls hoch amplifizierten aber nicht zwangsläufig überexprimierten Genen (Jarvinen, Autio et al. 2006). Ähnliches fand Gibcus et al. heraus. In einem Amplifikations-Mapping¹⁸ und Expressions-Profilings¹⁹ stellte sich PPFIA1 mit drei weiteren Genen ebenfalls als jenes mit der besten Korrelation zwischen Expression und Amplifikation heraus (Gibcus, Menkema et al. 2007). Die dritte Studie hat PPFIA1 ebenso als das am häufigsten amplifizierte und exprimierte Gen in HNSCC-Zelllinien entdeckt (Tan, Zhu et al. 2008). Diese Studie von Tan et al. zeigt PPFIA1 jedoch überraschend als Tumorsuppressorgen in Hals- und Kopf-Tumoren, weil zuvor ein Knockdown aber nicht die ektopische Überexpression von PPFIA1 in HNSCC Zelllinien in erhöhter Invasivität resultierte (Tan, Zhu et al. 2008).

CyclinD1 (CyclinD1) gilt als das wichtigste Zielgen der 11q13 Amplifikation (Karlseder, Zeillinger et al. 1994; Bieche, Olivi et al. 2002; Ormandy, Musgrove et al. 2003; Tan, Zhu et al. 2008). Es ist früh bewiesen worden, dass CyclinD1 auf mRNA-Level mit oder ohne Amplifikation eines der meist überexprimierten Onkogene in primären Brustkrebsen ist (Buckley, Sweeney et al. 1993; Gillett, Fantl et al. 1994). Dennoch wurde mehrfach gezeigt, dass eine CCND1-Amplifikation ein aussagekräftiger prognostischer Faktor für eine schlechte Prognose in ER-positiven Brustkarzinomen sowie von frühen Rezidiven ist (Michalides, Hageman et al. 1996; Seshadri, Lee et al. 1996; Bieche, Olivi et al. 2002) und im Gegensatz dazu eine Überexpression von CyclinD1 in Brusttumoren mit einem besseren Gesamt- und rezidivfreien Überleben korreliert (Gillett, Smith et al. 1996; Naidu, Wahab et al. 2002;

¹⁸Kartierung einer Amplifikation.

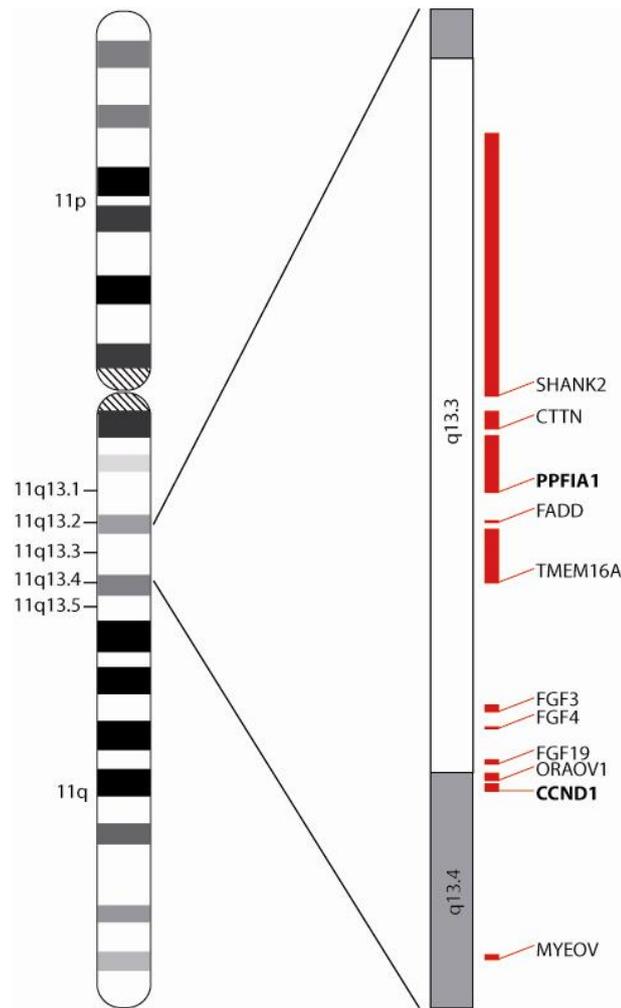
¹⁹Expressions-Profil.

Hwang, Han et al. 2003), wenn auch eine Studie dem widerspricht (Kenny, Hui et al. 1999). Eine größere Bedeutung einer CCND1-Amplifikation gegenüber einer CyclinD1-Überexpression als prognostischem Faktor bestätigen Studien in Kopf/Hals-Tumoren (Kyomoto, Kumazawa et al. 1997; Miyamoto, Uzawa et al. 2003). Die Gründe für dieses paradoxe Verhalten von CyclinD1 sind nicht bekannt. Überwiegend korreliert eine CCND1-Amplifikation sehr gut mit der Expression des Proteins (Bringuier, Tamimi et al. 1996; Miyamoto, Uzawa et al. 2003; Jirstrom, Stendahl et al. 2005; Gibcus, Menkema et al. 2007; Elsheikh, Green et al. 2008), aber hohe Expressionslevel sind nicht immer gleich Folge einer Gen-Amplifikation. Es gibt folglich auch andere Wege für eine entartete Zelle, ein Onkogen hoch zu exprimieren, wie zum Beispiel Mutationen im Promoter. Wenn nun eine Krebszelle für CyclinD1 hoch positiv und nicht amplifiziert ist, könnte der onkogene Effekt des alleinigen CyclinD1 geringer sein als mit einer zusätzlich amplifizierten 11q13-Region, deren Gene synergistische Effekte aufweisen könnten. Außerdem ist in Kopf/Hals-Tumoren eine Assoziation der 11q13-Amplifikation mit einer Deletion des distalen 11q-Arms entdeckt worden. Es wird vermutet, dass durch eine Deletion Gene inaktiviert werden, deren Funktionsverlust kooperativ mit der CCND1 Überexpression wirken könnte (Jin, Hoglund et al. 1998). Hinzu kommen Anhaltspunkte, dass CyclinD1 unter bestimmten Umständen auch ein negativer Regulator des Zellzyklus sein kann, denn CyclinD1 unterliegt in normalen Zellen periodischen Proteinlevel-Schwankungen, die obligat für einen kontrollierten Zellzyklus sind. So muss die CyclinD1-Konzentration in der G1-Phase hoch, in der S-Phase reduziert sein, um die DNA-Synthese und ein Fortschreiten im Zellzyklus zu gewährleisten (Yang, Hitomi et al. 2006). Hohe CyclinD1-Level können eine Progression der S-Phase verzögern (Han, Sgambato et al. 1995), was eine Wachstumshemmung zur Folge hätte. Es liegt also nahe, dass für eine aktive Proliferation ein so kritischer Wachstumsregulator wie CyclinD1 in einem begrenzten Expressionsbereich liegen sollte. Außerdem ist CyclinD1 in gut differenzierten, langsam wachsenden und geringgradig malignen Brustkrebsen exprimiert (Naidu, Wahab et al. 2002; Hwang, Han et al. 2003). Eine gewebespezifische Expression von CyclinD1 in transgenen Mäusen resultierte erst nach einer langen Latenzzeit in Hyperplasie und Adenokarzinomen des Brustgewebes (Wang, Cardiff et al. 1994). Dies spricht ebenfalls für einen relativ schwachen onkogenen Effekt von CyclinD1 allein und

dass eventuell eine Kooperation mit anderen Onkogenen für eine effiziente Karzinogenese nötig ist. Die Summe der Studien, die sich mit CCND1 und dessen Produkt befassen, zeigt keine einheitliche Meinung über die Rolle des CCND1 in der Tumorgenese. Etliche Untersuchungen zu dessen onkogener Potenz haben seine Bedeutung in der 11q13-Amplifikation nicht vollständig klären können, weshalb die Analyse der nebenstehenden Gene in dieser Region nicht nur deren Relevanz sondern auch die des CCND1 endgültig entschlüsseln kann.

Neben PPFIA1 und CCND1 könnten auch andere Gene in Amplifikationen eine Tumor-relevante Rolle spielen. Abbildung 4-1 zeigt die 11q13-Region auf dem Chromosom 11 mit den Genen um CCND1. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei CCND1/PPFIA1 coamplifizierter Tumore alle Gene zwischen CCND1 und PPFIA1 ebenfalls amplifiziert sind. Die hier dargestellten Gene waren und sind daher wie PPFIA1 oft Gegenstand von Studien. Resultat ist, dass so gut wie jedes einzelne bereits im Verdacht stand oder steht, neben CCND1 einen fördernden Effekt auf die Tumorgenese zu haben. Eine folgende Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse über die Gene um CCND1 gibt einen Überblick über diese Region und darüber, inwieweit die benachbarten Gene von CCND1 neben PPFIA1 klinisch relevant sein könnten.

Abbildung 4-1 Umgebung von CCND1 auf Chromosom 11



Beginnend mit dem Gen distal von CCND1 ist die Funktion von MYEOV (Myeloma-overexpressed) noch weitgehend unbekannt. Den Namen bekam MYEOV, da es zuerst in Myelom-Tumorzelllinien mit einer $t(11;14)(q13;q32)$ Translokation entdeckt wurde (Janssen, Vaandrager et al. 2000). Ein Knockdown von MYEOV ergab in Magenkrebs sowie Kolonkarzinom-Zelllinien eine verminderte Proliferation und Zellinvasion (Leyden, Murray et al. 2006; Moss, Lawlor et al. 2006). In Plattenepithel Karzinomen des Ösophagus ist MYEOV, ebenso wie PPFIA1 in dieser Studie, regelhaft mit CCND1 coamplifiziert gefunden worden. Die Expression war jedoch nicht erhöht, so dass die Autoren am ehesten von einer transkriptionellen Stilllegung des Gens durch Methylierung sprechen und eine bedeutende Rolle des Gens zumindest in Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen ausschließen (Janssen, Imoto et al. 2002). In einer anderen

Studie waren von 946 Brusttumoren 9,5% der Fälle MYEOV amplifiziert (90/946), der überwiegende Teil mit CCND1 coamplifiziert (74/90), die restlichen 16 Tumoren unabhängig von CCND1. Das entspräche 1,7% aller untersuchten Proben. Vom Normalen abweichende Expressionsmuster des MYEOV korrelierten nur partiell mit den DNA-Amplifikationen, und es konnte keine Assoziation zum krankheitsspezifischen Verlauf gefunden werden (Janssen, Cuny et al. 2002). In nicht amplifizierten primären Mundhöhlen-Tumoren ist MYEOV, hier OCIM (Oncogene in Multiple Myeloma) genannt, neben TMEM16A häufig überexprimiert, obwohl CCND1 und CTTN (auch EMS1) es nicht sind (Huang, Godfrey et al. 2006).

Direkt an CCND1 in Richtung Zentromer liegt das Gen ORAOV1 (Oral cancer overexpressed 1), manchmal zu finden als TAOS1 (Tumor amplified and overexpressed sequence 1). Es ist in oralen Plattenepithelkarzinomen nicht nur sehr wahrscheinlich CCND1 abhängig amplifiziert, sondern auch überexprimiert (Huang, Gollin et al. 2002). Eine Verminderung der Expression durch siRNA²⁰ führte zu verzögertem Zellwachstum in vitro sowie zu einer Hemmung des Tumor-Wachstums und der Angiogenese in vivo, wobei synergistische Effekte anderer Ereignisse (VEGF Suppression) mitgewirkt haben sollen (Jiang, Zeng et al. 2008).

Es folgen drei Gene FGF19, FGF4 und FGF3 (Fibroblast Growth Factor). Die Funktion von FGF19 ist noch weitgehend unbekannt, es soll aber in der Gehirnentwicklung während der Embryogenese eine Rolle spielen (Nishimura, Utsunomiya et al. 1999). Das FGF4 (auch HST) -Protein hat bekannte mitogene Effekte und ist zum Beispiel im Karposi-Sarkom, das auch 11q13-Amplifikationen aufweist, gefunden worden (Delli Bovi, Curatola et al. 1987; Taira, Yoshida et al. 1987). Das Maus-Homolog von FGF3 (INT-2) ist ursprünglich als häufig aktiviertes Zielgen eines Brusttumor-Virus der Maus identifiziert worden (Peters, Brookes et al. 1983). Es war auch der erste Marker auf Chromosom 11q13, der in humanen Mammakarzinomen als amplifiziert bekannt wurde (Lidereau, Callahan et al. 1988; Zhou, Casey et al. 1988). Es trägt zur Entwicklung des Innenohres bei, denn Defekte im Protein führen im Rahmen eines rezessiv vererbten Syndroms zu kongenitaler Taubheit (Tekin, Hismi et al. 2007). Außer bei FGF4 in Karposi-Sarkomen ist keine klare Verbindung der drei Gene zur Tumorgenese gegeben. Da ist es nicht verwunderlich, dass FGF19, FGF4 und FGF4 entweder keine Expression

²⁰ Small interfering RNA.

oder nur eine mit der DNA-Amplifikation schlecht korrelierende, schwache Expression in 11q13 amplifizierten Tumoren aufweisen (Bringuiet, Tamimi et al. 1996; Freier, Sticht et al. 2006; Huang, Godfrey et al. 2006; Jarvinen, Autio et al. 2006).

Das Gen TMEM16A (Transmembrane 16A), auch bekannt als DOG1 (Discovered on Gastrointestinal Stromal Tumors 1), codiert für einen Kalzium-aktivierten Chloridkanal. Es wurde im Vergleich zu anderen Weichteiltumoren, ohne dessen Funktion zu kennen, in Gastrointestinalen Stroma Tumoren (GIST) stark exprimiert gefunden (West, Corless et al. 2004). Heute wird ein monoklonaler Antikörper gegen DOG1 in der Forschung als sehr sensitiver und spezifischer Marker für GIST gehandelt (Espinosa, Lee et al. 2008). In einer Studie von Huang et al. ist TMEM16A zusammen mit allen anderen Genen (ausgeschlossen FGF3, FGF4 und FGF19) in der 11q13-Region in oralen Plattenepithelkarzinomen als amplifiziert und überexprimiert gefunden worden. Zusätzlich hat es sich zusammen mit MYEOV/OCIM durch häufig erhöhte Expressionsmuster auch ohne eine Amplifikation hervorgetan, was CCND1 und CTTN in dieser Studie nicht taten (Huang, Godfrey et al. 2006).

FADD (FAS-associated death domain) ist das Gen für ein Apoptose²¹-Adaptermolekül, das an der Rekrutierung von Enzymen zu einem Zelltod-induzierenden Signalkomplex (DISC) beteiligt ist. In 28 von 29 Larynx- und Pharynxkarzinomen wurde FADD als das meist amplifizierte Gen der 11q13-Region gefunden und dessen Expression korrelierte gut mit der DNA-Amplifikation, so dass FADD in dieser Studie als potentieller Treiber der 11q13-Amplifikation eingestuft worden ist (Gibcus, Menkema et al. 2007). In Brustkrebsgeweben ist FADD ebenso amplifiziert entdeckt worden, aber nur wenn ebenfalls eine CCND1 Amplifikation vorlag (Lundgren, Holm et al. 2008). Gerade auf Grund der Tatsache, dass das FADD-Protein mit für die Apoptose zuständig ist und diese eine Tumorentwicklung hemmen kann, macht eine Amplifikation und vor allem eine Überexpression in Malignomen so erstaunlich. Doch entgegen der Vermutung, eine Tumorzelle sei dem kontrollierten Zelltod ferner als eine gesunde Zelle, können manche Tumorzellen leichter durch apoptotische Stimuli zugrunde gehen, da die Spiegel der apoptotischen Proteine, wie zum Beispiel FADD, durch onkogene Ereignisse erhöht werden können oder weil deren Aktivierung erleichtert sein kann, so

²¹ sog. programmierter Zelltod, Zelluntergang, der im Ggs. zur Nekrose durch genetische Informationen der betroffenen Zelle selbst ausgelöst und reguliert wird.

dass die Schwelle zur Apoptose in Tumorzellen erniedrigt sein kann (Evan and Vousden 2001; Lowe, Cepero et al. 2004). Es gibt aber anscheinend Mechanismen in Krebszellen, die den genannten Proteinlevel-Erhöhungen durch Inaktivierung entgegenwirken, im Fall von FADD mit einer Dephosphorylierung. In verschiedenen Tumorarten, wie Brust- und Prostatakrebs, ist eine FADD-Dephosphorylierung nachgewiesen worden, die krebsfördernd zu sein scheint (Shimada, Matsuyoshi et al. 2005; Matsuyoshi, Shimada et al. 2006). Der Phosphorylierungszustand des FADD könnte daher bei der Regulierung von Zellwachstum und Metastasenbildung eine Rolle spielen.

Ein weiteres Gen, das besonders im Fokus der Forschung steht, ist CTTN, auch bekannt als EMS1-Onkogen. Es ist das Gen für Cortactin, eines der Hauptsubstrate der Src-Kinase²², mit einer Bindungsfähigkeit an kortikalen Aktin²³-Strukturen, woher es seinen Namen hat (Wu and Parsons 1993). Es stellte sich heraus, dass CTTN und EMS1, das oft in Brustkrebs, und Kopf- und Hals-Tumoren mit einer 11q13-Amplifikation überexprimiert ist (Schuuring, Verhoeven et al. 1992), identisch sind. Die konsistent erhöhte Expression in 11q13 amplifizierten Tumoren und sein ubiquitäres Vorkommen in Zellmotilitäts-Strukturen machen Cortactin als weiteren Kandidaten mit onkogener Funktion für die Forschung interessant. Es gibt Hinweise für eine von CCND1 unabhängige Amplifikation von CTTN in Brustkrebs und Kopf/Hals-Plattenepithelkarzinomen von circa 7-8% (Hui, Campbell et al. 1997; Rodrigo, Garcia et al. 2000). Karlseder et. al unterstützen die Hypothese von sogar vier unabhängigen Amplifikationen im 11q13-Band, von denen CTTN einer der Treiber sein soll. Sie beobachteten CTTN-Amplifikationslevel, die die von CCND1 übertrafen (Karlseder, Zeillinger et al. 1994). Die Wirkung einer Cortactin-Überexpression wurde unter anderem in Brust-, Ösophagus- und hepatozellulärem Karzinom und/oder Zelllinien untersucht, wobei sich ein erhöhtes Metastasierungsvermögen offenbarte (Li, Tondravi et al. 2001; Chuma, Sakamoto et al. 2004; Luo, Shen et al. 2006). In Larynx Karzinomen wurde anhand von multivarianten Cox-Analysen eine Korrelation der Expressionslevel mit der krankheitsspezifischen Sterblichkeit entdeckt. Dieser Einfluss fand unabhängig von der CyclinD1-Expression statt (Gibcus, Mastik et al. 2008).

²² Tyr-Protein-Kinase und Mitglied der Src-Familie, die selbst durch Phosphorylierung reguliert wird.

²³ (gr.) Strahl; Ein Strukturprotein, das in Myofibrillen u. Mikrofilamenten des Zytoskeletts vorkommt.

Ähnliche Ergebnisse erlangte Hofman et al. in Experimenten mit Kopf- und Hals-Plattenepithel-Karzinomen (Hofman, Butori et al. 2008). Der Einfluss Cortactins scheint sich aber nicht nur auf die Metastasenbildung auszuwirken. Clark et al. haben in Kopf- und Hals- Tumorzelllinien durch Knockout eine Verringerung der Tumorgroße erreicht. Eine Überexpression vergrößerte den Tumor. In vivo steigerte Cortactin die Proliferation und Vaskularisation (Clark, Brown et al. 2008).

Das Gen SHANK2 (SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains) liegt über 800kb von CCND1 entfernt und wurde bis jetzt wenig untersucht. Es scheint ein Adaptermolekül für das Aktin-Zytoskelett zu sein. Dabei ist es vor allem in Synapsen des Gehirns und Isoform E auch in epithelialen Dickdarmzellen zu finden. Neben vielen anderen Bindungspartnern interagiert das Protein von SHANK2 mit Cortactin (CTTN), weshalb es CORTBP1 (Cortactin-binding Protein1) genannt wird. Es besteht der Verdacht, dass SHANK2 wie Cortactin in Zellmigrationsvorgänge verwickelt sein könnte.

Die klinische Signifikanz von 11q13-Veränderungen mit Berücksichtigung der Patientenprognose und des Erfolges einer Hormontherapie ist kontrovers diskutiert. Eine Überexpression von CyclinD1 ist in einigen Studien mit einer guten (Naidu, Wahab et al. 2002; Hwang, Han et al. 2003) und in anderen mit einer schlechten Prognose (Kenny, Hui et al. 1999; Umekita, Ohi et al. 2002; Rudas, Lehnert et al. 2008) verbunden. In einigen Studien korrelieren eine CyclinD1-Überexpression und eine CCND1-Amplifikation positiv mit einer Resistenz für die Tamoxifen-Therapie und einem frühen Tumorrezidiv (Stendahl, Kronblad et al. 2004; Jirstrom, Stendahl et al. 2005). Ein Modell der Resistenzmechanismen ist von Iishi et al. entwickelt worden, der behauptet, dass Tamoxifen die CyclinD1 vermittelte Inhibition des Transkriptionsfaktors STAT3 aufhebt und somit zu einer Aktivierung eines von STAT3 vermittelten Wachstumssignal führt (Ishii, Waxman et al. 2008). Bostner et al. hingegen konnten keine Rolle von CyclinD1 bei der Tamoxifen-Resistenz bestätigen (Bostner, Ahnstrom Waltersson et al. 2007). Die Autoren fanden vielmehr heraus, dass die Amplifikation vom 11q13 benachbarten PAK1-Gen, an Stelle von CCND1, die Tamoxifen-Resistenz hervorrufen könnte, und dass PAK1 (im 11q14-Lokus gelegen) ein weiteres Onkogen in einer Amplifikation nahe dem oder sogar zugehörig zum 11q13-Lokus sei. Diese kontroversen Feststellungen im Hinblick auf das Tamoxifen-Ansprechen könnten

infolge der verhältnismäßig kleinen Anzahl von 11q13 amplifizierten Tumoren ($n < 50$) in diesen Studien herrühren. In dieser Studie jedenfalls wurde kein prognostischer Effekt von 11q13-Veränderungen beobachtet, eingeschlossen der PPFIA1- und/oder CCND1-Amplifikation, in einer Untermenge von 211 Patienten, die eine Tamoxifen-Monotherapie erhielten. Das spricht gegen den Einfluss einer CCND1-Amplifikation in Bezug auf eine Tamoxifen-Resistenz, auch wenn die klinischen und Behandlungsdaten des TMA retrospektiv erfasst wurden.

Ohne ein umfangreiches Amplifikations-Mapping zu beinhalten implizieren die Ergebnisse dieser Studie, aufgrund der 100% Co-Amplifikationsrate von PPFIA1 mit CCND1, eine mindestens zwischen diesen beiden Genen ununterbrochene Amplifikation. Übereinstimmend mit dem Resultat dieser Studie zeigten Karlseder et al., der die 11q13-Region in 389 Brustkrebsen anhand Southern Blotting²⁴ mit zehn verschiedenen Proben abgebildet hat, ein Abfallen der Amplifikationshäufigkeit von 11q13-Genen mit steigender Distanz zu CCND1 und in höchstens 1Mb Entfernung zu ihm (CCND1: 14.7%, FGF3: 14.1%, FGF4: 14.1%; CTTN: 8.5%) (Karlseder, Zeillinger et al. 1994). Gaffey et al. beschrieb vergleichbare Häufigkeiten (14%) von CCND1, FGF4 und CTTN in 50 invasiven Mammakarzinomen (Gaffey, Frierson et al. 1993). In Hals- und Mundboden-Tumoren fanden Freier et al. nahezu identische Amplifikationsraten von CCND1 (36,8%) und benachbarten Genen FGF3 (34,3%), CTTN (37,4%) und SHANK2 (36,3%) (Freier, Sticht et al. 2006). Zaharieva et al. berichteten zuvor über eine Coamplifikation von CCND1 und FGF3/FGF4 von 19,5% in 11q13 amplifizierten Krebsen der Harnblase (Zaharieva, Simon et al. 2003). Ferner kann in einigen Fällen über die Existenz einer größeren 11q13-Amplifikation spekuliert werden, die sich über mehr Gene erstreckt, weil Karlseder et al. in der oben genannten Studie in weitaus größeren Distanzen von bis zu 7Mb von CCND1 weitere amplifizierte Genloci fand. Ob diese sehr große Amplifikation dann tatsächlich ohne Unterbrechung vorliegt, ist fraglich. Zumindest ist anzunehmen, dass alle Gene zwischen CCND1 und PPFIA1 amplifiziert sind, denn abgesehen von den vorigen Studien, hat diese Untersuchung nicht einen Tumor gezeigt der eine alleinige PPFIA1-Amplifikation ohne CCND1 aufwies. Zudem zeigt diese Studie durch den Vergleich der klinischen Daten,

²⁴ Methode zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Auftrennung der DNA-Fragmente mit Gelelektrophorese, Transfer auf eine Folie und dortige Detektion durch fluoreszierende/radioaktive Sonden.

dass amplifizierte Gene, obwohl sie höchst wahrscheinlich sogar überexprimiert sind, nicht im gleichen Zuge als klinisch relevant zu bewerten sind. Unzweifelhaft ist das Defizit dieser Studie, sich nicht mit dem Expressionsmuster PPFIA1 in Brustkrebs auseinandergesetzt zu haben, um die biologische Rolle eindeutig auszuschließen. Es war jedoch kein für die Analyse von Formalin-fixierten und Paraffin gebetteten Geweben passender kommerzieller Antikörper erhältlich. Solche Expressions-Studien sind in anderen Krebsarten wie Blasen- und Kopf/Hals-Karzinomen durchgeführt worden und keineswegs einfach auf Brustkrebs zu übertragen. Aber andere Studien in Brustgewebe beweisen, dass zum Beispiel eine erhöhte FGF3 (INT-2) -Expression zwar zu zellulären Veränderungen, aber nicht zur Tumorgenese beiträgt (Kwan, Pecenka et al. 1992; Hollmann, Kittrell et al. 2001). Das wirft die Frage auf, ob andere Gene neben CCND1, und wenn ja, welche dieser Gene in der 11q13-Amplifikation einen Einfluss auf das Überleben der Patienten haben, wenn es sicher nicht PPFIA1 ist.

Die Hypothese, andere Gene in der 11q13-Amplifikation, die neben CCND1 auch amplifiziert und folgend überexprimiert sind, übten synergistische Effekte aus, unterstützt Huang et al. in seiner Studie mit oralen Plattenepithelkarzinomen. In dieser Untersuchung ist PPFIA1, ebenso wie die anderen Gene der 11q13-Amplifikation, außer FGF19, FGF4 und FGF3, amplifiziert und mit hoher Korrelation ($>0,7$) überexprimiert (Huang, Godfrey et al. 2006). Dafür spricht die Tatsache, dass bis heute kaum Hinweise einer Beteiligung von FGF19, 4 und 3 in der Tumorgenese bekannt sind und genau diese drei Gene, obwohl sie in der Amplifikation enthalten und coamplifiziert sind, sich als nicht überexprimiert darstellen (Bringuiet, Tamimi et al. 1996; Freier, Sticht et al. 2006; Huang, Godfrey et al. 2006; Jarvinen, Autio et al. 2006). Danach würde sich jene Krebszelle einen Wachstumsvorteil verschaffen, die in einer amplifizierten DNA-Region eben genau diese Gene exprimiert, die ihr zum Wachstumsvorteil verhelfen. Nur leider ist der Zusammenhang weitaus komplexer, denn auch Tumorsuppressorgene wie FADD, das an der Apoptose beteiligt ist, werden, wenn in einer hoch amplifizierten Region enthalten, ebenfalls vermehrt exprimiert. Aber die überlebende Krebszelle steuert erfolgreich mit anderen Maßnahmen gegen Kontrollmechanismen solcher Art, wie zum Beispiel der Dephosphorylierung des Genproduktes (Shimada, Matsuyoshi et al. 2005; Matsuyoshi, Shimada et al. 2006). Das

deutet darauf hin, dass nicht unbedingt jedes amplifizierte Gen in einer hoch amplifizierten Region in der Tumorgenese eine Rolle spielen muss.

Bemerkenswert ist, dass alle Ergebnisse, die für die PPFIA1-Amplifikation in dieser Studie ermittelt worden sind, auch für CTTN gelten, da die verwendete Gen-Sonde (BAC RP11-113L16, RZPD, Germany) beide Gene detektiert. PPFIA1 ist circa 114kb lang und wird vollständig von der Gensonde erfasst. CTTN zeigt eine 35kb lange Überschneidung mit der Sonde. Somit gilt auch für CTTN, dass es in jedem Fall mit CCND1 coamplifiziert war, und dass für CTTN ebenfalls kein klinischer sowie prognostischer Einfluss in Brustkrebs gezeigt werden konnte, der unabhängig von CCND1 ist.

Zusammenfassend ist nicht viel über die molekulare Funktion oder über die Expression von PPFIA1 in Brustkrebs bekannt. Es könnte in Verbindung mit LAR an der Entwicklung der Brustdrüse beteiligt sein. In anderen Geweben gibt es Hinweise auf eine Rolle von LIP.1/PPFIA1 in der Migration und Metastasierung von Zellen. Auch die Regulation des Zellwachstums könnte LIP.1 zusammen mit ING4 beeinflussen. Weitere Gene in unmittelbarer Nähe von CCND1 zeigen sich in anderen Studien und Krebsarten bei einer Amplifikation ebenfalls als hochgradig exprimiert, jedoch gibt es keinen Vergleich der klinischen bzw. prognostischen Daten solch einer Amplifikation/Überexpression mit denen von CCND1/CyclinD1. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass eine Veränderung der PPFIA1-Kopiezahl höchstwahrscheinlich das Ergebnis einer CCND1 getriebenen Amplifikation der 11q13-Region ist. Das komplette Fehlen von klinischen und phenotypischen Effekten in Brustkrebs mit einer CCND1/PPFIA1-Coamplifikation im Vergleich zu Tumoren mit einer alleinigen CCND1-Amplifikation macht eine größere biologische Rolle der PPFIA1-Amplifikation für den Brustkrebs extrem unwahrscheinlich, wobei ein Effekt nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Ein solcher wäre aber nur schwer und experimentell aufwendig von einer alleinigen CCND1-Amplifikation zu trennen. Ein starker Einfluss wäre in so einem Fall sicher nicht zu erwarten, da sich andernfalls ein Unterschied im klinischen Vergleich gezeigt hätte.

5 Zusammenfassung

Amplifikationen auf dem Chromosomenabschnitt 11q13 wurden in ca. 15 – 20% in Mamma-Karzinomen gefunden und gehören daher zu den häufigsten chromosomalen Veränderungen dieses Tumortyps. Aufgrund der Größe des Amplikons, beinhaltet diese Region noch viele weitere Gene, die ebenfalls einen Effekt auf die Tumorgenese haben könnten. Studien, die die Array-CGH Methodik benutzen, haben PPFIA1-Amplifikationen und hohe Expressionsmuster seines Proteins in Zelllinien und Primärkarzinomen des Kopf-/Hals-Bereichs beschrieben. Da eine 11q13-Amplifikation häufig in Brustkrebs zu finden ist und es Hinweise für ein Mitwirken von PPFIA1 bei der Entwicklung der Brustdrüse gibt, wurden in dieser Studie die Häufigkeiten und klinische Relevanz von PPFIA1 Amplifikationen in über 2000 humanen Brustkrebsgeweben im tissue microarray Format mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung bestimmt und mit vorhandenen Daten zu CCND1 – einem bekannten Onkogen im 11q13 Amplikon verglichen.

In den 1.583 analysierbaren Brustkrebsproben wurde in 248 Fällen (15,7%) eine PPFIA1-Amplifikation gefunden. 64 der Gewebeproben zeigten PPFIA1 mit mehr als 10 Gensignalen als hoch amplifiziert (4%). Eine Coamplifikation mit CCND1 wurde in allen PPFIA1 amplifizierten Tumoren gefunden (248/248, 100%). Es gab CCND1-Amplifikationen ohne PPFIA1-Coamplifikation zusätzlich in 117 (7,4%) Tumoren. Amplifikationen beider Gene (PPFIA1 und CCND1) waren signifikant mit entdifferenzierten Tumoren assoziiert ($p=0,0002$), aber ohne Bezug zum Tumorstadium ($p=0,7066$) oder dem Lymphknotenstatus ($p=0,5807$). Es wurde kein Unterschied in der Patientenprognose zwischen 248 PPFIA1/CCND1 coamplifizierten Tumoren und 117 allein CCND1 amplifizierten Tumoren gefunden ($p=0,6419$).

Diese Daten zeigen, dass eine PPFIA1-Amplifikation häufig (15,7%) in Brustkrebs auftritt. Die höhere Inzidenz der CCND1-Amplifikation verglichen mit der von PPFIA1, sowie die fehlende prognostische Relevanz der Coamplifikation und die Tatsache, dass die PPFIA1-Amplifikation ausschließlich in CCND1 amplifizierten Tumoren gefunden wurde, spricht gegen eine tumorrelevante Rolle von PPFIA1. Am ehesten kann die PPFIA1 Amplifikation als Begleitgeschehen einer CCND1-Amplifikation gesehen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Al-Kuraya, K., P. Schraml, et al. (2004). "Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer." Cancer Res **64**(23): 8534-40.
- Arriola, E., S. M. Rodriguez-Pinilla, et al. (2007). "Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer." Breast Cancer Res Treat **106**(2): 181-9.
- Ashman, J. N., H. S. Patmore, et al. (2003). "Prognostic value of genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma detected by comparative genomic hybridisation." Br J Cancer **89**(5): 864-9.
- Barrera, F. N., J. A. Poveda, et al. (2003). "Binding of the C-terminal sterile alpha motif (SAM) domain of human p73 to lipid membranes." J Biol Chem **278**(47): 46878-85.
- Bieche, I., M. Olivi, et al. (2002). "Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays." Br J Cancer **86**(4): 580-6.
- Bloom, H. J. and W. W. Richardson (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**(3): 359-77.
- Bostner, J., M. Ahnstrom Waltersson, et al. (2007). "Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer." Oncogene **26**(49): 6997-7005.
- Bringuier, P. P., Y. Tamimi, et al. (1996). "Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification." Oncogene **12**(8): 1747-53.
- Buckley, M. F., K. J. Sweeney, et al. (1993). "Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer." Oncogene **8**(8): 2127-33.
- Cardoso, F., V. Durbecq, et al. (2004). "Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer." Int J Oncol **24**(1): 201-9.
- Chin, K., S. DeVries, et al. (2006). "Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies." Cancer Cell **10**(6): 529-41.
- Chuma, M., M. Sakamoto, et al. (2004). "Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma." J Hepatol **41**(4): 629-36.
- Clark, E. S., B. Brown, et al. (2008). "Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon." Oncogene.
- Coon, J. S., E. Marcus, et al. (2002). "Amplification and overexpression of topoisomerase IIalpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer." Clin Cancer Res **8**(4): 1061-7.

- Delli Bovi, P., A. M. Curatola, et al. (1987). "An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family." Cell **50**(5): 729-37.
- Deutsche_Krebsgesellschaft, e. V. (2008). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG).
- Elsheikh, S., A. R. Green, et al. (2008). "CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome." Breast Cancer Res Treat **109**(2): 325-35.
- Elston, C. W. and I. O. Ellis (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**(5): 403-10.
- Espinosa, I., C. H. Lee, et al. (2008). "A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors." Am J Surg Pathol **32**(2): 210-8.
- Evan, G. I. and K. H. Vousden (2001). "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer." Nature **411**(6835): 342-8.
- Freier, K., C. Sticht, et al. (2006). "Recurrent coamplification of cytoskeleton-associated genes EMS1 and SHANK2 with CCND1 in oral squamous cell carcinoma." Genes Chromosomes Cancer **45**(2): 118-25.
- Fu, M., C. Wang, et al. (2004). "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." Endocrinology **145**(12): 5439-47.
- Gaffey, M. J., H. F. Frierson, Jr., et al. (1993). "Chromosome 11q13, c-erbB-2, and c-myc amplification in invasive breast carcinoma: clinicopathologic correlations." Mod Pathol **6**(6): 654-9.
- Gansauge, S., F. Gansauge, et al. (1997). "Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis." Cancer Res **57**(9): 1634-7.
- Garkavtsev, I., S. V. Kozin, et al. (2004). "The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis." Nature **428**(6980): 328-32.
- Gibcus, J. H., M. F. Mastik, et al. (2008). "Cortactin expression predicts poor survival in laryngeal carcinoma." Br J Cancer **98**(5): 950-5.
- Gibcus, J. H., L. Menkema, et al. (2007). "Amplicon mapping and expression profiling identify the Fas-associated death domain gene as a new driver in the 11q13.3 amplicon in laryngeal/pharyngeal cancer." Clin Cancer Res **13**(21): 6257-66.
- Gillett, C., V. Fantl, et al. (1994). "Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining." Cancer Res **54**(7): 1812-7.
- Gillett, C., P. Smith, et al. (1996). "Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer." Int J Cancer **69**(2): 92-9.
- Gray, J. W., C. Collins, et al. (1994). "Molecular cytogenetics of human breast cancer." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 645-52.

- Green, J. B., C. D. Gardner, et al. (2003). "RNA recognition via the SAM domain of Smaug." *Mol Cell* **11**(6): 1537-48.
- Guan, J. L. and D. Shalloway (1992). "Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation." *Nature* **358**(6388): 690-2.
- Gunduz, M., H. Nagatsuka, et al. (2005). "Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas." *Gene* **356**: 109-17.
- Han, E. K., A. Sgambato, et al. (1995). "Stable overexpression of cyclin D1 in a human mammary epithelial cell line prolongs the S-phase and inhibits growth." *Oncogene* **10**(5): 953-61.
- Hofman, P., C. Butori, et al. (2008). "Prognostic significance of cortactin levels in head and neck squamous cell carcinoma: comparison with epidermal growth factor receptor status." *Br J Cancer* **98**(5): 956-64.
- Hollmann, C. A., F. S. Kittrell, et al. (2001). "Wnt-1 and int-2 mammary oncogene effects on the beta-catenin pathway in immortalized mouse mammary epithelial cells are not sufficient for tumorigenesis." *Oncogene* **20**(52): 7645-57.
- Huang, X., T. E. Godfrey, et al. (2006). "Comprehensive genome and transcriptome analysis of the 11q13 amplicon in human oral cancer and synteny to the 7F5 amplicon in murine oral carcinoma." *Genes Chromosomes Cancer* **45**(11): 1058-69.
- Huang, X., S. M. Gollin, et al. (2002). "High-resolution mapping of the 11q13 amplicon and identification of a gene, TAOS1, that is amplified and overexpressed in oral cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11369-74.
- Hui, R., D. H. Campbell, et al. (1997). "EMS1 amplification can occur independently of CCND1 or INT-2 amplification at 11q13 and may identify different phenotypes in primary breast cancer." *Oncogene* **15**(13): 1617-23.
- Hwang, T. S., H. S. Han, et al. (2003). "Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients." *Pathol Int* **53**(2): 74-80.
- Hynes, R. O. and A. D. Lander (1992). "Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons." *Cell* **68**(2): 303-22.
- Ishii, Y., S. Waxman, et al. (2008). "Tamoxifen stimulates the growth of cyclin D1-overexpressing breast cancer cells by promoting the activation of signal transducer and activator of transcription 3." *Cancer Res* **68**(3): 852-60.
- Janssen, J. W., M. Cuny, et al. (2002). "MYEOV: a candidate gene for DNA amplification events occurring centromeric to CCND1 in breast cancer." *Int J Cancer* **102**(6): 608-14.
- Janssen, J. W., I. Imoto, et al. (2002). "MYEOV, a gene at 11q13, is coamplified with CCND1, but epigenetically inactivated in a subset of esophageal squamous cell carcinomas." *J Hum Genet* **47**(9): 460-4.
- Janssen, J. W., J. W. Vaandrager, et al. (2000). "Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32)." *Blood* **95**(8): 2691-8.

- Jarvinen, A. K., R. Autio, et al. (2006). "Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses." Oncogene **25**(52): 6997-7008.
- Jarvinen, T. A. and E. T. Liu (2003). "HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **78**(3): 299-311.
- Jemal, A., L. X. Clegg, et al. (2004). "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival." Cancer **101**(1): 3-27.
- Jiang, L., X. Zeng, et al. (2008). "Oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1): a regulator for the cell growth and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma." Int J Cancer **123**(8): 1779-86.
- Jin, C., Y. Jin, et al. (2006). "Molecular cytogenetic characterization of the 11q13 amplicon in head and neck squamous cell carcinoma." Cytogenet Genome Res **115**(2): 99-106.
- Jin, Y., M. Hoglund, et al. (1998). "FISH characterization of head and neck carcinomas reveals that amplification of band 11q13 is associated with deletion of distal 11q." Genes Chromosomes Cancer **22**(4): 312-20.
- Jirstrom, K., M. Stendahl, et al. (2005). "Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification." Cancer Res **65**(17): 8009-16.
- Karlseder, J., R. Zeillinger, et al. (1994). "Patterns of DNA amplification at band q13 of chromosome 11 in human breast cancer." Genes Chromosomes Cancer **9**(1): 42-8.
- Katoh, M. (2003). "Evolutionary conservation of CCND1-ORAOV1-FGF19-FGF4 locus from zebrafish to human." Int J Mol Med **12**(1): 45-50.
- Katoh, M. (2005). "Comparative genomics on mammalian Fgf3-Fgf4 locus." Int J Oncol **27**(1): 281-5.
- Kenny, F. S., R. Hui, et al. (1999). "Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer." Clin Cancer Res **5**(8): 2069-76.
- Kim, S., K. Chin, et al. (2004). "A screen for genes that suppress loss of contact inhibition: identification of ING4 as a candidate tumor suppressor gene in human cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(46): 16251-6.
- Konishi, N., K. Tsujikawa, et al. (2003). "Overexpression of leucocyte common antigen (LAR) P-subunit in thyroid carcinomas." Br J Cancer **88**(8): 1223-1228.
- Kwan, H., V. Pecenka, et al. (1992). "Transgenes expressing the Wnt-1 and int-2 proto-oncogenes cooperate during mammary carcinogenesis in doubly transgenic mice." Mol Cell Biol **12**(1): 147-54.
- Kyomoto, R., H. Kumazawa, et al. (1997). "Cyclin-D1-gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head-and-neck squamous-cell carcinoma." Int J Cancer **74**(6): 576-81.
- Lambros, M. B., H. Fiegler, et al. (2005). "Analysis of ovarian cancer cell lines using array-based comparative genomic hybridization." J Pathol **205**(1): 29-40.

- Levea, C. M., C. T. McGary, et al. (2000). "PTP LAR expression compared to prognostic indices in metastatic and non-metastatic breast cancer." Breast Cancer Res Treat **64**(2): 221-8.
- Leyden, J., D. Murray, et al. (2006). "Net1 and Myeov: computationally identified mediators of gastric cancer." Br J Cancer **94**(8): 1204-12.
- Li, J., M. Martinka, et al. (2008). "Role of ING4 in human melanoma cell migration, invasion and patient survival." Carcinogenesis **29**(7): 1373-9.
- Li, Y., M. Tondravi, et al. (2001). "Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells." Cancer Res **61**(18): 6906-11.
- Lidereau, R., R. Callahan, et al. (1988). "Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors." Oncogene Res **2**(3): 285-91.
- Lin, M., L. T. Smith, et al. (2006). "DNA copy number gains in head and neck squamous cell carcinoma." Oncogene **25**(9): 1424-33.
- Lowe, S. W., E. Cepero, et al. (2004). "Intrinsic tumour suppression." Nature **432**(7015): 307-15.
- Lundgren, K., K. Holm, et al. (2008). "Gene products of chromosome 11q and their association with CCND1 gene amplification and tamoxifen resistance in premenopausal breast cancer." Breast Cancer Res **10**(5): R81.
- Luo, M. L., X. M. Shen, et al. (2006). "Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance." Cancer Res **66**(24): 11690-9.
- Matsuyoshi, S., K. Shimada, et al. (2006). "FADD phosphorylation is critical for cell cycle regulation in breast cancer cells." Br J Cancer **94**(4): 532-9.
- Michalides, R., P. Hageman, et al. (1996). "A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer." Br J Cancer **73**(6): 728-34.
- Miller, K. E., J. DeProto, et al. (2005). "Direct observation demonstrates that Liprin-alpha is required for trafficking of synaptic vesicles." Curr Biol **15**(7): 684-9.
- Miyamoto, R., N. Uzawa, et al. (2003). "Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas." Oral Oncol **39**(6): 610-8.
- Moss, A. C., G. Lawlor, et al. (2006). "ETV4 and Myeov knockdown impairs colon cancer cell line proliferation and invasion." Biochem Biophys Res Commun **345**(1): 216-21.
- Naidu, R., N. A. Wahab, et al. (2002). "Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: relationship with histopathological types and clinicopathological parameters." Oncol Rep **9**(2): 409-16.
- Nishimura, T., Y. Utsunomiya, et al. (1999). "Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain." Biochim Biophys Acta **1444**(1): 148-51.
- Ormandy, C. J., E. A. Musgrove, et al. (2003). "Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **78**(3): 323-35.
- Pardue, M. L. and J. G. Gall (1969). "Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations." Proc Natl Acad Sci U S A **64**(2): 600-4.

- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Peters, G., S. Brookes, et al. (1983). "Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: evidence for a common region for provirus integration in mammary tumors." Cell **33**(2): 369-77.
- Robert_Koch_Institut (2008). Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends, Robert Koch Institut. **6. überarbeitete Auflage.**
- Rodrigo, J. P., L. A. Garcia, et al. (2000). "EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck." Clin Cancer Res **6**(8): 3177-82.
- Rudas, M., M. Lehnert, et al. (2008). "Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy." Clin Cancer Res **14**(6): 1767-74.
- Ruiz, C., S. Seibt, et al. (2006). "Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer." Int J Cancer **118**(9): 2190-4.
- Schaapveld, R. Q., J. T. Schepens, et al. (1997). "Impaired mammary gland development and function in mice lacking LAR receptor-like tyrosine phosphatase activity." Dev Biol **188**(1): 134-46.
- Schuuring, E., E. Verhoeven, et al. (1992). "Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas." Oncogene **7**(2): 355-61.
- Serra-Pages, C., N. L. Kedersha, et al. (1995). "The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions." EMBO J **14**(12): 2827-38.
- Serra-Pages, C., Q. G. Medley, et al. (1998). "Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins." J Biol Chem **273**(25): 15611-20.
- Serra-Pages, C., M. Streuli, et al. (2005). "Liprin phosphorylation regulates binding to LAR: evidence for liprin autophosphorylation." Biochemistry **44**(48): 15715-24.
- Seshadri, R., C. S. Lee, et al. (1996). "Cyclin DI amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis." Clin Cancer Res **2**(7): 1177-84.
- Shen, J. C., M. Unoki, et al. (2007). "Inhibitor of growth 4 suppresses cell spreading and cell migration by interacting with a novel binding partner, liprin alpha1." Cancer Res **67**(6): 2552-8.
- Shimada, K., S. Matsuyoshi, et al. (2005). "Phosphorylation status of Fas-associated death domain-containing protein (FADD) is associated with prostate cancer progression." J Pathol **206**(4): 423-32.
- Simon, R., M. Mirlacher, et al. (2004). "Tissue microarrays." Biotechniques **36**(1): 98-105.
- Simon, R., A. Nocito, et al. (2001). "Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer." J Natl Cancer Inst **93**(15): 1141-6.
- Statistisches_Bundesamt (2008). Krankheitskosten 2002, 2004 und 2006, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

- Stendahl, M., A. Kronblad, et al. (2004). "Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients." *Br J Cancer* **90**(10): 1942-8.
- Taira, M., T. Yoshida, et al. (1987). "cDNA sequence of human transforming gene hst and identification of the coding sequence required for transforming activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(9): 2980-4.
- Tan, K. D., Y. Zhu, et al. (2008). "Amplification and overexpression of PPFIA1, a putative 11q13 invasion suppressor gene, in head and neck squamous cell carcinoma." *Genes Chromosomes Cancer* **47**(4): 353-62.
- Tekin, M., B. O. Hisimi, et al. (2007). "Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia." *Am J Hum Genet* **80**(2): 338-44.
- Teng, F. Y. and B. L. Tang (2005). "APC/C regulation of axonal growth and synaptic functions in postmitotic neurons: the Liprin-alpha connection." *Cell Mol Life Sci* **62**(14): 1571-8.
- Umekita, Y., Y. Ohi, et al. (2002). "Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients." *Int J Cancer* **98**(3): 415-8.
- Vogel, C. L., M. A. Cobleigh, et al. (2002). "Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **20**(3): 719-26.
- Wagener, C. (1999). *Molekulare Onkologie - Entstehung und Progression maligner Tumoren*, Thieme.
- Wang, T. C., R. D. Cardiff, et al. (1994). "Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice." *Nature* **369**(6482): 669-71.
- West, R. B., C. L. Corless, et al. (2004). "The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status." *Am J Pathol* **165**(1): 107-13.
- WHO (2008). The global burden of disease: update 2004, World Health Organization.
- WHO (2008). World Health Statistics 2008; Part 1: Ten Highlights in health statistics, World Health Organisation.
- Wiley, J. (2002). *TNM Classification of Malignant Tumors*, Wiley J and Sons, UICC.
- Wreesmann, V. B., W. Shi, et al. (2004). "Identification of novel prognosticators of outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck." *J Clin Oncol* **22**(19): 3965-72.
- Wu, H. and J. T. Parsons (1993). "Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex." *J Cell Biol* **120**(6): 1417-26.
- www.ensembl.org. (09/2006). "Ensembl Genome Browser." from www.ensembl.org.
- Yang, K., M. Hitomi, et al. (2006). "Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell." *Cell Div* **1**: 32.
- Yang, T., J. S. Zhang, et al. (1999). "Leukocyte common antigen-related tyrosine phosphatase receptor: increased expression and neuronal-type splicing in breast cancer cells and tissue." *Mol Carcinog* **25**(2): 139-49.

- Zaharieva, B. M., R. Simon, et al. (2003). "High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer." J Pathol **201**(4): 603-8.
- Zender, L., M. S. Spector, et al. (2006). "Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach." Cell **125**(7): 1253-67.
- Zhai, Y. F., H. Beittenmiller, et al. (1993). "Increased expression of specific protein tyrosine phosphatases in human breast epithelial cells neoplastically transformed by the neu oncogene." Cancer Res **53**(10 Suppl): 2272-8.
- Zhou, D. J., G. Casey, et al. (1988). "Amplification of human int-2 in breast cancers and squamous carcinomas." Oncogene **2**(3): 279-82.

7 Danksagung

Ich danke den medizintechnischen Assistentinnen der molekularen Pathologie und allgemeinen Pathologie, die mir allzeit helfend zur Seite standen.

Ich danke Marlies Sachs, die mich in ihrem Labor mit viel Humor und Geduld willkommen hieß und nahezu immer einen technischen Rat wusste.

Ich danke dem naturwissenschaftlichen Mitarbeiter Frederik Holst, für die kompetente und nette Betreuung am Arbeitsplatz.

Ich danke ebenfalls der naturwissenschaftlichen Mitarbeiterin Antje Krohn für die regelmäßigen sozialen Kontakte während der Inkubationszeiten.

Ich danke Peter Hülsenbeck für die freundliche Beratung bei formalen Fragen.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Sauter und meinem Betreuer PD Dr. Simon für die Möglichkeit ein Teil ihrer wissenschaftlichen Projekte zu sein, für die hervorragende Betreuung und Bereitstellung ihrer Mittel und Zeit.

Ich danke meinem Lebensgefährten Dennis Pysch für die Geduld in der Zeit meines Studiums, für das kontinuierliche Vertrauen und den Rückhalt, den er mir zu jederzeit mit der größten Selbstverständlichkeit gab und gibt.

Ich danke meinem Bruder Clemens Wuth, der als Vorbild voranschreitet und bei den wichtigen Fragen meines Lebens stets die Antworten mit der größten Tragweite weiß.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, Jong Soon und Hans Peter Wuth für die Liebe, Erziehung und finanziellen Unterstützung zur Entwicklung meiner geistigen Unabhängigkeit.

8 Lebenslauf

Name	Laura Wuth
Geburtsdatum, -ort	24.12.1983 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Hans Peter Wuth Jong Soon Wuth, geb. Park
Geschwister	Clemens Wuth
Schulbildung	
1989 - 1994	Vor- und Grundschule in Hamburg Finkenwerder
1994 - 2003	Hochschule Gymnasium Finkenwerder
Studium	
2003 - 2010	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
30.06.2010	Approbation als Ärztin
Tätigkeit	
seit 15.08.2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Ärztin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

9 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 entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Laura Wuth