

Aus dem Institut für Tumorbiologie des  
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

***Genomische Aberrationen auf Chromosom 11p15 als  
Determinanten der frühen Disseminierung beim  
Mammakarzinom***

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Bettina Sielaff-Frimpong

aus Rostock

Hamburg, 2012

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.03.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Pantel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. I. Witzel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. K. Kutsche

Meiner Mutter.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Das Mammakarzinom .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	9
1.1.2 Ätiologie.....	10
1.1.3 Histopathologie .....	11
1.1.4 Therapie des Mammakarzinoms.....	14
1.1.5 Prognose und Prädiktion.....	16
<b>1.2 Progression des Mammakarzinoms .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 Mehrschrittkarzinogenese.....	17
1.2.2 Transformation und Angiogenese .....	19
1.2.3 Invasion und Metastasierung.....	19
1.2.4 Organotropismus .....	21
1.2.5 Minimale Residuale Krebserkrankung .....	23
1.2.5.1 Gesamtüberlebenszeit bei Knochenmikrometastasierung.....	24
1.2.5.2 Tumorbiologie disseminierter Tumorzellen .....	25
<b>1.3 Nachweis chromosomaler Veränderungen beim progressiven Mammakarzinom.....</b>	<b>27</b>
1.3.1 Nutzen der Mikrosatelliteninstabilität zum Nachweis genetischer Alterationen.....	28
1.3.2 Allelische Imbalancen auf Chromosom 11p.....	29
1.3.2.1 Allelische Imbalancen auf Chromosom 11p beim Mammakarzinom.....	31
1.3.2.2 Stromal interactive molecule 1 (STIM1).....	34
<b>1.4 Fragestellung.....</b>	<b>36</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>37</b>
2.1.1 Patientenmaterial .....	37
2.1.1.1 Patientenkollektiv der Mikrosatellitenanalyse .....	37
2.1.1.2 Patientenkollektiv der Multigewebeblock-Analyse .....	38
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	39
2.1.2.1 Reagenzien.....	39
2.1.2.2 Antikörper.....	39
2.1.2.3 Enzyme .....	40
2.1.2.4 PCR-Primer .....	40
2.1.2.5 Käufliche Systeme ( <i>Kits</i> ).....	41
2.1.2.6 Puffer und Lösungen.....	41
2.1.2.7 Sonstiges Material .....	41
2.1.3 Geräte .....	41
2.1.4 Softwareprogramme .....	42
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>42</b>
2.2.1 Detektion disseminierter Tumorzellen in Knochenmarkaspiraten .....	42
2.2.1.1 Isolierung von Tumorzellen aus dem Knochenmark .....	42
2.2.1.2 Immunzytochemischer Nachweis von Zytokeratin-positiven Tumorzellen im Knochenmark .....	43
2.2.1.3 Färbungen von Tumorgewebeschnitten .....	45
2.2.2 Nachweis Allelischer Imbalancen .....	46

2.2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	46
2.2.2.2	Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäure .....	48
2.2.2.3	Ethanol-fällung .....	49
2.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	50
2.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	52
2.2.2.6	Kapillarelektrophorese.....	52
2.2.3	Herstellung eines Tissue Microarrays .....	54
2.2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung am <i>Tissue Microarray</i> .....	55
2.2.3.2	Immunhistochemische Färbungen .....	56
2.2.4	Statistische Methoden.....	59
2.2.4.1	Chi-square und Fisher's Exact Test.....	59
2.2.4.2	Multivariate Analyse .....	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>Knochenmarkbefall und Lymphknotenstatus in Korrelation zu klinischen und pathologischen Befunden .....</b>	<b>60</b>
<b>3.2</b>	<b>Nachweis allelischer Imbalancen (AI) an Mammakarzinomen.....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Einfluss des Referenzmaterials.....	63
3.2.2	Heterozygotiegrad des Gesamtkollektivs .....	65
3.2.3	Häufigkeit allelischer Imbalancen .....	67
3.2.4	Allelische Imbalancen der 11p-Region in Korrelation zu klinischen und pathologischen Parametern.....	71
3.2.4.1	AI-Frequenz der einzelnen Mikrosatellitenmarker in Korrelation zum Knochenmarkstatus ...	74
3.2.4.2	AI-Frequenz der einzelnen Mikrosatellitenmarker in Korrelation zu klinisch-pathologischen Befunden.....	74
3.2.5	Vergleichende AI-Analysen von karzinomatösen Arealen und Bezirken mit Carcinoma <i>in situ</i> ..	76
<b>3.3</b>	<b>Expressionsanalyse des Kandidatengens <i>STIMI</i> .....</b>	<b>77</b>
3.3.1	<i>STIMI</i> -Expression in Korrelation zu Knochenmarkbefall und klinischen und pathologischen Befunden .....	78
3.3.2	Relation von <i>STIMI</i> -Expression und Überleben .....	81
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodischer Kontext .....</b>	<b>86</b>
<b>4.2</b>	<b>Nachweis allelischer Imbalancen auf 11p15 in Relation zu klinisch-pathologischen Parametern.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3</b>	<b>Genexpressionsanalyse von <i>STIMI</i> in Relation zu klinisch-pathologischen Parametern .</b>	<b>93</b>
<b>4.4</b>	<b>Potentielle Tumorsuppressorgene auf 11p15 .....</b>	<b>96</b>
<b>4.5</b>	<b>Resümee .....</b>	<b>98</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b>Anhang: Wissenschaftliche Veröffentlichung.....</b>	<b>118</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>119</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACIS	<i>automated cellular imaging system</i>
AI	allelische Imbalancen
ADH	<i>atypical ductal hyperplasia</i>
ALH	<i>atypical lobular hyperplasia</i>
APAAP	<u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase <u>A</u> nti- <u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BET	Brusterhaltene Therapie
Bp	Basenpaar
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
CGH	komparative genomische Hybridisierung ( <i>comparative genomic hybridization</i> )
CK	Zytokeratin
CTC	<i>circulating tumor cells</i>
DCIS	duktales Carcinoma <i>in situ</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	disseminierte Tumorzelle ( <i>disseminated tumor cell</i> )
ECM	Extrazelluläre Matrix
EMT	<i>epithelial-to-mesenchymal-transition</i>
FEA	<i>flat epithelial atypia</i>
G	Differenzierungsstufen ( <i>Grading</i> )
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
Kb	Kilobasenpaar
KM	Knochenmark
LCIS	lobuläres Carcinoma <i>in situ</i>
LK	Lymphknoten
LOH	Heterozygotieverlust ( <i>loss of heterozygosity</i> )
M	Status der Fernmetastasen
min	Minute
MEN	Multiple endocrine Neoplasien
MMP	Matrixmetalloprotease
MRD	<i>minimal residual disease</i>
N	Status der Lymphknoten-Metastasen
NS	nicht signifikant

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Wasserstoffionenkonzentration
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
TNM	Stadieneinteilung
PLC	Phospholipase C
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SERCA	Sarco/Endoplasmatische Calcium-ATPase
SOCC	<i>store operated calcium channel</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
STIM1	<i>stromal interactive molecule 1</i>
STL	Wächterlymphknoten ( <i>Sentinel lymph node</i> )
T	Tumorausdehnung
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TMA	Gewebeblock ( <i>tissue micro array</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Units</i>
UDH	<i>usual ductal hyperplasia</i>
Vol.	Volumenanteil
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

# 1 Einleitung

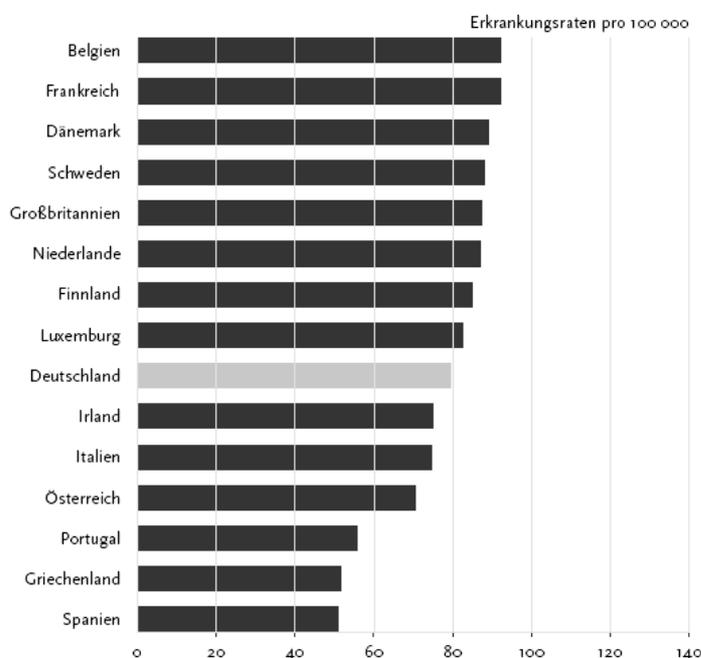
Krebserkrankungen sind gekennzeichnet durch genetisches Fehlverhalten. Eine Vielzahl genetischer und epigenetischer Alterationen führen dabei über einen mehrschrittigen Prozess zu einer Zelltransformation sowie klonalen Expansion. Zum einen können die dynamischen Genomveränderungen vererbt worden sein, wie auch infolge zufälliger Replikationsfehler und inkorrektur DNS-Reparaturen auftreten. Andere schädigende Expositionen stellen physikalische und chemische Noxen oder Einflüsse durch onkogene Viren dar. Auch das Lebensalter, hormonelle Einflüsse und Genussfaktoren sind als disponierende Faktoren bekannt [1, 2]. Die genetische Instabilität führt zum einen dazu, dass noch höhere Mutationsraten erreicht werden und unkontrollierte Proliferationen mit Massenaggregation sowie Neovaskularisation und Invasion auftreten. Begünstigt wird die abnorme Zellproliferation durch die Fähigkeit den apoptotischen Zelltod zu umgehen und in entfernte Körperregionen zu streuen. Derartige Mechanismen werden stets als multiphasischer Prozess verstanden und sind für den Zeitabschnitt der Tumorinduktion, der Progression und Metastasierung, sowie der Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie als ursächlich anzusehen [3-5].

Die Einschätzung der Prognose maligner Krebserkrankungen ist im Allgemeinen und speziell im Kontext der vorliegenden Arbeit in Bezug auf das Mammakarzinom von großer Bedeutung. Dabei steht die Prognose in direktem Zusammenhang mit der Früherkennung der Erkrankung, da bereits früh in der Karzinomentwicklung eine Tumorzell dissemination stattfindet, bei der das Knochenmark ein Reservoir für Tumorzellen darstellt und als Ursprungsort für Fernmetastasen betrachtet wird. Dementsprechend ist insbesondere die Fernmetastasierung, als häufigster Grund für das Versterben von Patienten mit primärem Mammakarzinom, von besonderem Interesse. Somit soll anhand dieser Arbeit versucht werden das Verständnis über disseminierte Tumorzellen zu erweitern und den Einfluss genetischer Marker auf deren prognostische Relevanz zu untersuchen.

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Deutschlandweit erkranken nach statistischen Erhebungen des Robert-Koch-Institutes gegenwärtig jährlich 58.000 Frauen an Brustkrebs. Demnach wird Brustkrebs mit 29 % aller malignen Erkrankungen der Frau als häufigste Krebsneuerkrankung der weiblichen Bevölkerung angesehen. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 64 Jahre, dementsprechend erkranken Frauen durchschnittlich sechs Jahre früher an Brustkrebs als an allen anderen Krebserkrankungen [6]. Bei jüngeren Frauen stellt Brustkrebs die wichtigste Neoplasie dar. Ungefähr 40 % aller Krebsneuerkrankungen und annähernd 30 % der Todesfälle sind im Alter zwischen 35 und 59 Jahren auf Brustkrebs zurückzuführen [7], wobei das Risiko an Brustkrebs zu erkranken mit voranschreitendem Alter steigt. Insgesamt gesehen ist seit 1980 ein Anstieg der Neuerkrankungsrate (Inzidenz) zu verzeichnen, während sich seit Mitte der 1990er Jahre die Sterblichkeit (Mortalität) geringfügig verringert. Im europaweiten Vergleich der Brustkrebsinzidenz- und Mortalitätsraten befindet sich, wie in Abb. 1.1 dargestellt, Deutschland im mittleren Feld [6].



**Abb. 1.1 Brustkrebsinzidenz der EU 2002**, modifiziert nach [6],

Quelle: GLOBOCAN-Schätzung 2002, RKI-Schätzung für Deutschland 2002. Quelle: GEKID

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Frauen mit Brustkrebs sind im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen günstig und betragen zurzeit im Durchschnitt 83 bis 87 % [6]. Jedoch treten beim Mammakarzinom spät Rezidive auf, auch fünf Jahre nach Diagnosestellung ist die Mortalität noch höher als die der Allgemeinbevölkerung [7, 8].

### 1.1.2 Ätiologie

Obwohl die Ätiologie des Mammakarzinoms nicht ausreichend geklärt ist, sind einige Risikofaktoren bekannt, welche die Entstehung von Brustkrebs begünstigen. Wie auch bei anderen Tumoren geht man beim Brustkrebs von einer genetischen Erkrankung mit einer Ansammlung von Mutationen in zumeist somatischen Zellen aus [9]. Insbesondere beim Mammakarzinom kommt jedoch hinzu, dass infolge der Östrogenexposition ein Proliferationsdruck auf die Brustdrüsen ausgeübt und das Mammakarzinom dementsprechend ebenso als hormonabhängige Erkrankung beschrieben wird [10, 11]. Beispielsweise ist die Brustkrebsinzidenz vor dem 25. Lebensjahr sehr gering, erhöht sich jedoch bis auf das 100-fache beim Erreichen des 45. Lebensjahres [12]. Nach Eintritt der Menopause sind dagegen weltweit deutliche Unterschiede hinsichtlich der Brustkrebsinzidenzen zu verzeichnen. Hulka et al. [12] beschreiben einen steten Anstieg der Inzidenzen bei US-amerikanischen und schwedischen Frauen auch postmenopausal, wohingegen in Kolumbien und Japan die obgleich niedrigeren Neuerkrankungsfälle nach der Menopause nahezu ein Plateau erreichen oder, wie im letzten Fall, zurückgehen. Zu weiteren reproduktiven Faktoren, welche einen Einfluss auf die Auftretenswahrscheinlichkeit von Brustkrebs haben, wird die frühe Menarche, eine spät ausgetragene erste Schwangerschaft und Anzahl der Schwangerschaften insgesamt, wie auch eine spät einsetzende Menopause gezählt [7, 13, 14]. Darüber hinaus nehmen Parkin et al. [15] Bezug auf Migrationsstudien, anhand derer sich der Einfluss exogener und soziokultureller Faktoren wie Gewicht und körperliche Aktivität bei Exposition ab dem Kindesalter zeigt.

Hinsichtlich einer exogenen Hormonzufuhr wurde wiederholt bei über mehrere Jahre währenden Hormontherapien eine erhöhte Brustkrebsinzidenz festgestellt [16-18]. Laut *Cochrane Database of Systematic Reviews* ergaben sich nach Analysen von 19 Studien über Hormonersatztherapien bei peri- und postmenopausalen Frauen erhöhte Brustkrebsinzidenzen nach kontinuierlicher Applikation kombinierter Hormonersatztherapien (Östrogen & Progesteron) [19]. Kein signifikant erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken zeigte sich dagegen bei langfristiger Verabreichung von alleinigen Östrogen-Präparaten. Im Rahmen des

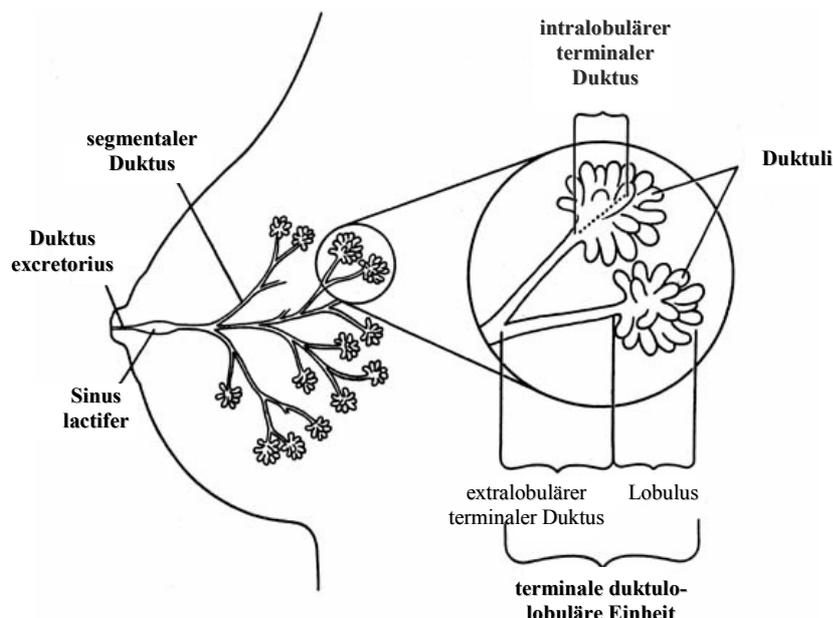
Reviews wird ebenfalls Bezug genommen auf die kontrovers betrachtete niedrigere Brustkrebsinzidenz bei Hormontherapie innerhalb von zwei Behandlungsjahren. Da zum Diagnosezeitpunkt jedoch die Probanden mit Hormontherapie bereits ein höheres Tumorstadium aufwiesen, könnte dies auf eine geringere Detektionsrate von mammographischen Befunden im stimulierten Brustgewebe zurückzuführen sein [19].

Bei einem bedeutend kleineren Patientenkollektiv ist das Risiko am Mammakarzinom zu erkranken auf hereditäre Faktoren zurückzuführen. In 5-10 % der Fälle [9, 13, 20, 21] wurden Keimbahnmutationen verschiedener Gene gefunden, wobei insbesondere Genmutationen der DNA-Reparaturgene *BRCA1* und *BRCA2* einen Anteil von 80-90 % bei hereditärem Brustkrebs ausmachen [13]. Die Trägerinnen dieser Mutationen besitzen ein Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken von 80-90 % [22] und erkranken deutlich früher als Patienten mit sporadischem Mammakarzinom [13]. Im Hinblick auf *BRCA1* sind mutierte Allele zu 40-80 % mit Familien assoziiert, wohingegen Keimbahnmutationen von *BRCA2* mit ungefähr 30-60 % der Brustkrebsfälle vergesellschaftet sind. Dabei tragen die Genträger ebenso ein signifikantes Risiko ein Ovarialkarzinom zu entwickeln, welches bei Mutationen von *BRCA1* mit 36-46 % um das zwei- bis dreifache höher liegt als bei *BRCA2*-Mutationen [20].

Die bei weitem häufigste Genmutation bei allen humanen Krebserkrankungen betrifft das Tumorsuppressorgen *TP53* und geht mit dem autosomal-dominant vererbten Li-Fraumeni-Syndrom einher. Frauen mit diesem Gendefekt weisen ein 18-fach höheres Risiko auf vor dem 45. Lebensjahr an multiplen Tumoren zu erkranken als die Allgemeinbevölkerung [23, 24]. Laut Studienlage wird eine weibliche Trägerin eines *TP53*-Defekts in 90 % ein Mammakarzinom entwickeln [20]. Insbesondere Mutationen, die das Tumorsuppressorgen *TP53*, aber auch die Gene *BRCA1* und *BRCA2* betreffen, sind mit einer hohen Penetranz und damit einem hohen individuellen Risiko behaftet an hereditärem Brustkrebs zu erkranken.

### 1.1.3 Histopathologie

Das Mammakarzinom geht von den Epithelien des Brustdrüsengewebes aus und wird histopathologisch zu den Adenokarzinomen gezählt. Prädilektionsort der Karzinomentstehung ist in den meisten Fällen, unabhängig von der histologischen Subgruppierung, die duktulo-lobuläre Einheit des Brustdrüsensystems [10] (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2 Brustdrüsen System** modifiziert nach: Hindle WH: Breast Care, p 34. New York, Springer-Verlag, 1999

Laut mehrfachen Publikationen wird davon ausgegangen, dass sich die invasiven Mammakarzinome präinvasiv über Carcinoma *in situ* entwickeln [25-27]. Diese Stadien sind dadurch gekennzeichnet, dass trotz maligner Proliferation die Basalmembran der Drüsenstrukturen intakt ist und dementsprechend keine Verbindung zum gefäßführenden Fett- und Bindegewebe besteht. Erst nachdem die neoplastischen Zellen die Basalmembran durchbrochen haben, spricht man von einem invasiven Karzinom.

Dabei scheinen die eigentlichen Vorstufen eines invasiv duktales Karzinoms duktales Hyperplasien (usual ductal hyperplasia, UDH) und/oder epitheliale Atypien (flat epithelial atypia, FEA) zu sein, welche über atypische duktales Hyperplasien (ADH) erst zu einem duktales Carcinoma *in situ* (DCIS) führen. Das DCIS nimmt entsprechend des häufigen Vorkommens duktales Mammakarzinome den größeren Anteil der Carcinoma *in situ* ein. Dem lobulären Carcinoma *in situ* (LCIS) geht als nicht-obligate Vorstufe eine atypische lobuläre Hyperplasie (ALH) voran [25]. Das LCIS scheint seltener in ein invasives Stadium überzugehen und weist dementsprechend eine günstigere Prognose auf. Es besteht jedoch ein 7- bis 12-fach erhöhtes Risiko einer invasiven Karzinomentwicklung im Vergleich zu Patientinnen ohne LCIS und zudem die Gefahr eines multifokalen und bilateralen Auftretens [28].

Bezeichnend ist, dass Tumore äußerst heterogen sind und oftmals Areale vom Typ der Carcinoma *in situ* wie auch invasive Regionen umfassen. Das von den inneren Zellschichten der Milchgänge ausgehende invasiv duktales Mammakarzinom stellt mit 70-80 % die häufigste Form des Brustkrebses dar. Diese Typisierung kann dabei lediglich als Ausschlussdiagnose gestellt werden, sofern kein invasiv lobuläres Karzinom oder andere spezielle Kategorien vorliegen. Aufgrund dessen kommt häufig die Bezeichnung *invasiv duktales Mammakarzinom, not otherwise specified* (NOS), zur Anwendung. Die von den Milchdrüsen ausgehenden Neoplasien werden als lobuläre Karzinome bezeichnet und machen einschließlich weiterer Sonderformen einen Anteil von 20-30 % der Brustkrebsformen aus, wobei mindestens 90 % des Tumors einer eindeutigen Klassifikation zuzuordnen sein muss [10].

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms ist für Therapie und Einschätzung der Prognose von großer Bedeutung. Das Ausbreitungsstadium wird durch das Staging entsprechend der pTNM-Klassifikation [29, 30] histologisch bewertet und stellt den wichtigsten Parameter dar. Beurteilt wird die Größe des Primärtumors (T), der Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasierung (M) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Tab. 1.1). Seit 01.01.2003 wird auch die Mikrometastasierung als ein Kriterium der pTNM-Klassifikation herangezogen [31].

**Tabelle 1.1 pTNM-Klassifikation**

<b>pT</b>	<b>Primärtumor</b>
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumordurchmesser 2 cm oder weniger
pT2	Tumordurchmesser mehr als 2 cm, aber weniger als 5 cm
pT3	Tumordurchmesser mehr als 5 cm
pT4	Tumordurchmesser jeder Größe mit Infiltration auf Brustwand oder Haut
<b>pN</b>	<b>Lymphknotenmetastasen</b>
pN0	keine Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in höchstens 4 axillären Lymphknoten, größter Durchmesser maximal 3 cm
pN2	Metastasen in 5 oder mehr axillären Lymphknoten, größer als 3 cm im Durchmesser, oder in Lymphknoten der A. thoracica interna
<b>pN1mi</b>	Mikrometastasen von 0,2 bis 2 mm im Durchmesser
<b>pM</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Im Grading wird zur Prognoseabschätzung über tumorhistologische Merkmale die Zelldifferenzierung erfasst. Es werden drei zunehmende Malignitätsgrade angegeben und die Kriterien der Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitosezahl beurteilt. Gut differenzierte Tumoren (GI) metastasieren und rezidivieren seltener als mäßig (GII) und schlecht

differenzierte Karzinome (GIII) [32-34]. Für eine weitere Einschätzung der Prognose werden zudem immunhistochemische Unterschiede in der Hormonrezeptorexpression von Östrogen und Progesteron, eine Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors mittels *Ki67* und eine eventuelle Überexpression des Wachstumsrezeptors *HER2* herangezogen, wodurch das therapeutische Vorgehen substantiell beeinflusst wird [11, 32].

#### **1.1.4 Therapie des Mammakarzinoms**

Seitdem erkannt wurde, dass es sich beim Mammakarzinom um eine chronische Systemerkrankung handelt, ist die Therapie zu einer interdisziplinären Herausforderung geworden. Während die radikale Mastektomie nach Halsted-Meyer-Rotter lange als Goldstandard der Behandlung des operablen Mammakarzinoms galt, haben zahlreiche Studien ähnliche Überlebensraten für brusterhaltende und radikalere Operationen nachgewiesen [35-38]. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich das Mammakarzinom bei Diagnosestellung bereits im Stadium der okkulten Generalisation befand, da die Tumorzeldisseminierung maßgeblich Prognose und Überlebenszeit der Brustkrebspatientinnen beeinflusst [39-41]. Dementsprechend umfassen heutige Therapieansätze eine Kombination aus operativen, strahlentherapeutischen und systemischen Verfahren mit wesentlicher Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit [42].

Nach brusterhaltender Therapie (BET) folgt notwendigerweise eine Bestrahlung des Brustdrüsenkörpers, wobei diese Kombination einer Mastektomie, infolge fehlender Indikation oder Patientenwunsch, gleichgestellt ist. Ebenfalls gleichwertige Therapiemaßnahmen stellen die Axilladisektion zur Ausräumung befallener Lymphknoten und die Sentinel-Lymphknotenentnahme dar, wohingegen letztere mit einer deutlich geringeren Morbidität einhergeht [43]. Der Sentinel-Lymphknoten, auch als Wächter-Lymphknoten bezeichnet, sammelt die Lymphe des Tumorbettes und drainiert diese anschließend in nachgeschaltete Lymphknoten. Demzufolge ist bei tumorfreiem Sentinel-Lymphknoten keine weitere lymphatische Metastasierung zu erwarten und eine Axilladisektion nicht indiziert.

Neben den derzeit zur Verfügung stehenden Kriterien wie Tumorgröße, Grading und axillärem Lymphknotenstatus, orientiert sich die systemische adjuvante Therapie ebenso am Menopausenstatus und Alter, wie auch dem Vorkommen von Hormon- und *HER2*-Rezeptoren. Die Auswahl der endokrinen Therapie, Chemo- und Antikörpertherapie wird

entsprechend der Empfehlungen von St. Gallen mittels Einstufung in Risikogruppen vorgenommen [45]. Ein niedriges Risiko liegt bei Frauen im Alter über 35 Jahren mit nodalnegativem Status (N0), positivem Hormonrezeptorbefund, einer Tumorgöße unter 2 cm, Grading I und negativem *HER2*-Befund vor. In diesen Fällen ist keine adjuvante Chemotherapie notwendig, eine endokrine Therapie jedoch zu empfehlen. Während bei prämenopausalen Patientinnen dieser Risikogruppe eine Therapie mit dem Antiöstrogen Tamoxifen angestrebt wird, können bei postmenopausalen Frauen zusätzlich Aromatasehemmer, zumeist bei nodalpositivem Befund, zur Anwendung kommen. Eine Chemotherapie ist stets bei zweifelhaftem Befund oder bei prognostisch ungünstigen Faktoren, wie triple-negativem Status (keine *HER2*-, Progesteron- und Östrogenüberexpression), einer *HER2*-Positivität, einem Grading von III, hohen Proliferationsmarkern (*Ki67*) und geringer Expression von Hormonrezeptoren indiziert. Den Leitlinien entsprechend, sollte die Chemotherapie in Dreierkombination einschließlich eines Anthrazyklins verabreicht werden. Nodalpositive Patienten profitieren von einer Kombinations-Chemotherapie mit Taxanen [43, 45, 46]. Insbesondere bei prämenopausalen Patientinnen ist nach Durchführung einer adjuvanten Systemtherapie mit einer Verlängerung des rezidivfreien Intervalls zu rechnen [46].

Patientinnen mit *HER2*-überexprimierenden Mammakarzinomen erhalten eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab simultan oder auch sequentiell zu einer Chemotherapie. Dabei richten sich die monoklonalen Antikörper gegen den Wachstumshormonrezeptor *ERBB2* [47, 48] und bewirken in Kombination mit einer Chemotherapie eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit. Von Besonderheit ist hierbei, dass sich eine Antikörpertherapie gegen aktiv replizierende wie auch ruhende, und damit nicht durch Zytostatika angreifbare, Tumorzellen richtet. Interessanterweise wurden sogar bei Patientinnen mit *HER2*-negativem Primärtumor im Knochenmark *HER2*-positive Mikrometastasen gefunden [49], so dass selbst diese Patientinnen von einer Antikörpertherapie profitieren würden.

Bei Knochenmetastasierung werden zudem Bisphosphonate eingesetzt, die durch ihre hochaffine Bindung an der Knochenoberfläche Osteoklasten verdrängen und somit bei Osteolysen den Knochenschmerz und das Frakturrisiko verringern, wie auch Hypercalciämien vorbeugen. Inzwischen wurde zudem auf ein Überlebensvorteil und geringeres Risiko für Knochenmarkmetastasierung durch die postoperative Behandlung mit dem zytotoxisch wirkenden Bisphosphonat Clodronat hingewiesen [44, 50, 51]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Bisphosphonate die Adhäsion von Tumorzellen an den Knochen verhindern, deren

apoptotischen Zelltod induzieren, Wachstumsfaktoren antagonisieren und antiangiogenetische Eigenschaften besitzen [44, 52, 53]. Derzeit wird in mehreren Studien der Einsatz von Bisphosphonaten in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms evaluiert [54], der Einsatz von Bisphosphonaten zur Tumorreduktion wird im Rahmen der St. Gallen-Konferenz 2011 jedoch nicht unterstützt.

### **1.1.5 Prognose und Prädiktion**

Um die derzeitigen Therapiestandards zu optimieren, ist die Kenntnis zusätzlicher prognostischer Marker notwendig, um aggressive Tumoren frühzeitig von leichteren Formen zu differenzieren. Durch derartige Marker könnte eine Aussage über das Verhalten der Tumoren gemacht werden, mithilfe von Prädiktoren ein Therapieansprechen vorausgesagt und dementsprechend individuelle Therapieansätze erstellt werden. Somit wäre in vielen Fällen eine Übertherapie mit belastenden Nebenwirkungen vermeidbar oder Risikopatientinnen könnten intensiviert behandelt werden. Bisher beschränken sich die untersuchten Marker auf die klassischen Prognosefaktoren, wozu die Tumorgroße, der Differenzierungsgrad und der axilläre Lymphnotenbefall gehören. Die Anzahl der betroffenen Lymphknoten korreliert dabei am zuverlässigsten direkt mit der Überlebensrate [32]. Darüber hinaus besitzen die histologische Typisierung, bestehende Angioinvasion und das Alter der Patientinnen prognostische Relevanz, allem voran jedoch der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus.

Mammakarzinome ohne Expression der Hormonrezeptoren neigen häufiger zu Rezidiven und sind in prädiktiver Hinsicht einer endokrinen Therapie nicht zugänglich [55], was zum Teil vermutlich auf höhere Proliferationsraten östrogenrezeptornegativer Karzinome zurückzuführen ist [56]. In summa entscheidet die Expression von Östrogen- und der meist simultanen Progesteronrezeptor-Expression über die Therapiemodalitäten, da sich bei negativem Status kein Überlebensvorteil einer adjuvanten Therapie gezeigt hat. Jedoch auch die Höhe der Expression von Östrogenrezeptoren scheint die Ansprechbarkeit beider Therapieregimes maßgeblich zu beeinflussen. Die Gabe von Tamoxifen oder Aromataseinhibitoren korrelierte bei intensiver Östrogenrezeptor-Expression mit höherem Therapieerfolg [57]. Da jedoch hormonpositive ebenso wie hormonnegative Tumoren durch das Risiko eines späten Rezidivs bedroht sind [58], gibt es Ansätze zur Verlängerung der Applikation von Aromataseinhibitoren im Rahmen der Risikoreduktion [59].

Eine höhere *HER2*-Expression war ursprünglich aus alleiniger prognostischer Sicht hilfreich, da Frauen mit Überexpression ein höheres Rezidivrisiko und kürzere Überlebensraten aufwiesen. Mittlerweile ist die Detektion von *HER2*-Amplifikationen jedoch zur Routine geworden und stellt einen wichtigen Schritt zu einem zielgerichteten Therapiemanagement dar [57, 60].

Fortschritte im Verständnis molekularer Mechanismen der Zellentartung führen zu einer stetig wachsenden Zahl von Surrogatmarkern, welche jedoch bislang eine geringe Wertigkeit hinsichtlich Früherkennung und Prognose aufweisen. Zum einen gehören zu diesen sogenannten neuartigen Prognosemarkern Onkogenprodukte wie *BCL2* und *TP53* [61, 62], wie auch *Cyclin D1* [57]. Des Weiteren wurden die tumorassoziierte Protease *uPA* mit dem entsprechenden Inhibitor *PAI 1* [63, 64] identifiziert, welche zu den Invasionsmarkern gezählt werden. *Ki-67* dagegen gehört neben *HER2* und dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*EGFR*) [65] zu den Proliferationsmarkern und prognostiziert ein hohes metastatisches Potential [57, 66]. Aufgrund dessen wurde *Ki-67* trotz fehlender Standardisierung bereits zur Subgruppierung der Mammakarzinome in der St. Gallen-Konsensuskonferenz 2011 einbezogen. Da Brustkrebs eine derart heterogene Erkrankung mit unterschiedlichster Morphologie und Prognose ist, sind weitere Biomarker, Gen-Expressions-Profile und die Etablierung bestehender prognostischer und prädiktiver Marker von immenser Bedeutung.

## 1.2 Progression des Mammakarzinoms

### 1.2.1 Mehrschrittkarzinogenese

Vogelstein assoziierte 1988 erstmals einen Zusammenhang zwischen spezifischen genetischen Defekten und histologischen Veränderungen anhand von DNA-Analysen normaler, adenomatöser und karzinomatöser Kolonepithelien [67]. Das seitdem häufig genutzte Modell der Mehrschrittkarzinogenese geht demnach von einem graduellen Wachstumsvorteil der mutierten Zelle im Verhältnis zu den Nachbarzellen aus. Bislang werden drei Kategorien von Genen unterschieden, denen eine Schlüsselrolle in der Tumorigenese zukommt. In das Modell der Mehrschrittkarzinogenese fließen die Gengruppen der Onkogene und der Tumorsuppressorgene ein. Die dritte Kategorie der DNA-Reparaturgene besitzt eine essentielle Funktion hinsichtlich DNA-Reparaturmechanismen und ist für die Stabilität und Integrität des Genoms unerlässlich [5, 68, 69].

Onkogene sind strukturverwandt mit normalen konstitutiven Genen, die zentrale Funktionen an der Zellwachstumsregulation ausüben. Mutationen von Protoonkogenen wirken dominant

und ziehen als Folge eine Hemmung der Apoptose oder, wie beispielsweise bei der *HER2*-Amplifikation, eine Aktivierung von Wachstumsfaktoren nach sich, einem Hauptkriterium maligner Progression [68, 70].

Demgegenüber kommen Tumorsuppressorgene vor, die maßgeblich an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, indem sie vor allem die Zellproliferation hemmen. Im Falle des Tumorsuppressorgens *TP53* (*p53*), dessen Inaktivierung nachweislich mit einem erhöhten Risiko ein Mammakarzinom zu entwickeln einhergeht, wird angenommen, dass dieses als Transkriptionsfaktor fungiert. Anfang der 70er Jahre wurde erstmals von Knudson [71] postuliert, dass neben heterozygoten Keimbahnmutationen eine weitere somatische Mutation des homologen Allels zur Tumorentstehung notwendig ist. Dieses Zwei-Treffer-Modell untermauerte Knudson am Beispiel des Retinoblastoms, einem zu 40-50 % erblich auftretenden aggressiven Retinatumor des Kindesalters, bei dem sich eine zweite, bevorzugt in den Retinoblasten auftretende Mutation ereignet. Im Falle der sporadischen Tumorentstehung dagegen treten nach der Konzeption im Verlauf zwei somatische Mutationen in den Retinazellen auf.

Somit wurde deutlich, dass Tumorsuppressorgene rezessiv wirken, da lediglich nach Wegfall des normalen zweiten Wildtyp-Allels die tumorigene Eigenschaft zur Wirkung kommt. Die erste Mutation scheint dabei vorrangig als kleine Genveränderung beispielsweise als Punktmutation aufzutreten, wohingegen die somatischen Mutationen als regionale oder chromosomale Verluste infolge von Non-disjunction, mitotischen Rekombinationen, Genkonversionen oder von *de-novo*-Deletionen vorkommen [72]. Dementsprechend ist ein Vorfinden homozygoter Tumorzellen in heterozygoten Patienten im Sinne eines Verlustes der Heterozygotie (*Loss of heterozygosity*, LOH) ein deutlicher Hinweis auf die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens (siehe 1.3.2). Mittlerweile ist bekannt, dass offensichtlich auch eine partielle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Tumorigenese beitragen kann. Beispielsweise scheint eine so genannte Haploinsuffizienz oder ein Dosiseffekt der beim Brustkrebs relevanten DNA-Reparaturgene *BRCA1* und *BRCA2* durch veränderte mRNA-Profile phänotypische Alterationen herbeiführen zu können [73].

Obwohl vorrangig die Akkumulation genetischer Alterationen die Karzinomentstehung und Tumorprogression beeinflusst, spielt auch das die Tumorzellen umgebende Mikromilieu eine entscheidende Rolle. Dabei scheinen Tumore intensiv mit ihrem Mikromilieu zu interagieren und rekrutieren regelrecht Stromazellen, welche wiederum durch die Sekretion von

Wachstumsfaktoren die Tumorprogression parakrin unterstützen. Dabei können Stromazellen gleichermaßen aberrante Expressionsmuster entwickeln und offenbar wird auch das Stroma, ähnlich wie die Tumorzellen selbst, epigenetisch beeinflusst. Beispielsweise führen Methylierungen von Promotoren zur Steuerung der Gen-Aktivität im Sinne einer Stilllegung oder Hochregulation spezifischer Gene [74, 75]. Da das Stroma insbesondere zu Beginn der Karzinomentstehung antitumorogene Wirkspektren besitzt, könnte ein tiefgreifenderes Verständnis dieser Interaktionen weitere Therapiemöglichkeiten aufzeigen.

### **1.2.2 Transformation und Angiogenese**

Ist eine Zelle von fortschreitenden genetischen Läsionen betroffen, so dass sie nicht mehr den Zellzyklusregulationen unterworfen ist, stehen der Zelltransformation alle Tore offen. Ein Verband transformierter Zellen mit neoplastischem Zellwachstum stellt das präinvasive Carcinoma *in situ* dar. Kennzeichnend sind hierbei Veränderungen der Morphologie und der Zell-Interaktionen mit Verlust der Kontaktinhibition. Während nichttransformierte Zellen beim Erreichen der Kapazitäten ihre Teilungsaktivität einstellen, wachsen transformierte Zellen solange unbegrenzt weiter, wie sie eine Ernährung über Diffusion gewährleisten können. Der *angiogene Switch*, als Übergang zu einer über das Blutsystem gewährleisteten Versorgung, findet nur selten statt. Ab einer Größe von zwei Millimetern wird eine Versorgung des Tumors über neu gebildete Blutgefäße für ein weiteres Wachstum unerlässlich [76].

Das voranschreitende Tumorwachstum und die damit einhergehende Komprimierung der Blutversorgung bedingt eine regionale Unterversorgung mit Sauerstoff wie auch Nährstoffen und führt zu einer Induktion angiogener Faktoren. Zu diesen gehört *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), der als einer der wichtigsten Schlüsselfaktoren bei der Regulation der Angiogenese neben proangiogenen Funktionen zudem die Endothelzellproliferation und -migration unterstützt und auf die Endothelzellapoptose inhibierend wirkt [76, 77]. Durch das Zusammenspiel weiterer angiogener Faktoren und der Herunterregulation angiogener Inhibitoren, wie beispielsweise Angiostatin, wird die Aussprossung von Kapillaren initiiert und infolge dessen ein neues tumorversorgendes Gefäßbett ausgebildet [70, 78].

### **1.2.3 Invasion und Metastasierung**

Im weiteren Verlauf der Tumor-Progression ist die Degregation der Basalmembran und der Extrazellulären Matrix (ECM) eine grundlegende Voraussetzung für die Invasion und

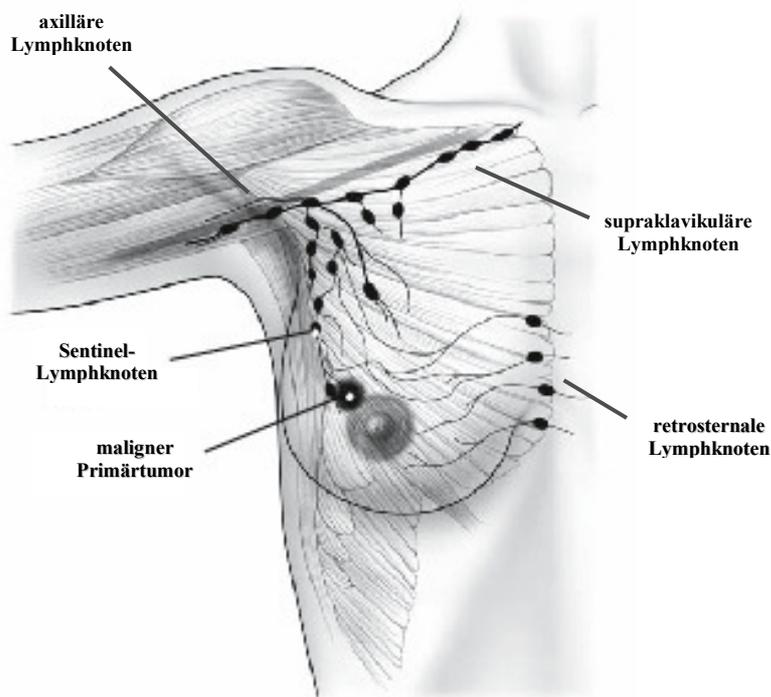
Metastasierung von Tumorzellen. Durch den Verlust interzellulärer Adhäsionsmoleküle wie *E-Cadherin* [70, 79, 80] lösen sich einzelne Tumorzellen oder Tumorzellgruppen vom Verband ab. Wahrscheinlich spielt ebenso die Expression des kürzlich entdeckten Proteins *Podoplanin* [81], welches als Induktor der Zellinvasion fungiert und das Aktin-Zytoskelett ausrichtet, eine entscheidende Rolle. Letztendlich penetrieren die Tumorzellen mittels proteolytischen Enzymen wie den *Matrixmetalloproteasen* (MMP) das stromale Gewebe [79, 82, 83].

Dabei entstehen aus intravasal gestreuten Tumorzellen schätzungsweise weniger als 1 % manifeste Organmetastasen. Zum einen findet bereits eine apoptotische Limitierung der Metastasierung durch Anoikis und Amorphosis im Zellverband statt, welche durch einen Kontaktverlust zu der Extrazellulären Matrix und benachbarten Zellen ausgelöst wird. Streuen die Tumorzellen dennoch unmittelbar in den Blutkreislauf oder indirekt über das Lymphsystem, so sind sie starken mechanischen Scherkräften und Pulsationen ausgesetzt, welche mittels Stimulierung der *Stick-Oxid-Synthase* (NO-Synthase) zur Induktion des Apoptoseprogrammes führen kann. Zudem müssen die gestreuten Tumorzellen zur Umgehung des Apoptoseprogrammes das Potential besitzen immunologischen Interaktionen mit Lymphozyten und natürlichen Killerzellen standzuhalten. Subsidiär ist dabei ein von den Tumorzellen sezernierter Fibrin-Thrombozyten-Belag [79].

In der terminalen Endstrombahn adhärieren die Tumorzellen an den Endothelzellen über ein Zusammenspiel von Selektinen und Integrinen, um letztendlich die Basalmembran der Endothelzellen zu durchbrechen. Auch nach Extravasation und Einwanderung ins Organparenchym sind die disseminierten Tumorzellen anfällig für Apoptose, da zum stromalen Gewebe adhärente Verbindungen geschaffen werden müssen. Zum Erreichen eines geeigneten Milieus adhärieren disseminierte Tumorzellen über verschiedenste Rezeptoren, wie beispielsweise über den *Hyaluron Rezeptor CD44* stromale Proteine (Hyaluronsäure, Kollagen, Fibronectin und Osteospondin), um das Überleben am Zielort zu sichern [79]. In diesem Stadium können die Tumorzellen als Mikrometastasen in einem Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose in einem schlafähnlichen Zustand (Dormancy) verharren [40, 84-87] (siehe Kap. 1.2.2). Erst nach Induktion angionetischer Faktoren und Ausbildung eines versorgenden Gefäßbettes entwickeln sich makroskopische Metastasen.

### 1.2.4 Organotropismus

Über die auf der Beobachtung bevorzugter Metastasierungswege beruhenden Mechanismen der organspezifischen Tumorstreuung herrscht bislang Uneinigkeit. So wurde bereits 1928 durch Ewing deutlich, dass das Mammakarzinom dazu neigt, aufgrund der anatomisch bedingten Lokalisation der Lymphabflusswege, benachbarte Lymphknoten zu befallen [88]. Die Lymphdrainage der Mamma beruht zum einen auf der divergent dichten Verteilung des Drüsenparenchyms. Die Aussaat erfolgt, wie in Abb. 1.3 veranschaulicht, vorrangig in die axillären, und auch in die retrosternalen und supraklavikulären Lymphknoten.



**Abb 1.3 lymphogene Metastasierung** modifiziert nach Kaufmann, Atlas der Brustchirurgie [89]

Zudem können Lymphgefäße durch die fehlende Basalmembran leichter durchbrochen werden und sekundär über den Ductus thoracicus in die Blutstrombahn streuen. Entsprechend des hämatogenen Metastisierungsmusters wird das Mammakarzinom dem Cava-Typ zugeordnet, da das Abflussgebiet über die Vena Cava und das rechte Herz eingangs in die Lunge drainiert. Die Tumorzellen bleiben anschließend einzeln oder als embolischer Zusammenschluss mit Lymphozyten und Thrombozyten häufig in den extensiven Kapillarbetten der Lunge oder, nach Steuerung in den Systemkreislauf, der Leber haften. Eine Darstellung der durchschnittlichen Häufigkeitsverteilung von Brustkrebsmetastasen findet sich in Tab. 1.2.

**Tab. 1.2 Metastasenlokalisationen beim Mammakarzinom**, modifiziert nach Kaufmann et al. [89]

<b>Metastasenlokalisation</b>	<b>bei Erstdiagnose</b>	<b>bei Autopsie</b>
Axilla	30-50%	
Brust- und Thoraxwand	20-40%	
Knochen	20-60%	60-90%
ZNS	5-10%	30-50%
Lunge	15-25%	50-70%
Leber	10-25%	70-75%
Gastrointestinaltrakt		40-60%
Endokrinum		60-90%

Die von Ewing vertretene Theorie bietet jedoch keine hinreichende Erklärung für die beim Mammakarzinom häufig auftretenden Knochenmarkmetastasen. Obwohl das Knochenmark lediglich gering durchblutet ist [90], bietet es möglicherweise ein bevorzugtes Organmilieu. Diese Überlegung geht auf die sogenannte „*Seed and Soil*“-Hypothese von Paget [91] zurück, der bereits 1989 einen Zusammenhang zwischen Tumorzellen („*Seed*“) und wachstumsfördernden oder hemmenden Faktoren im vorgefundenen Organmilieu („*Soil*“) sah. Nach dieser Hypothese können sich klinisch manifeste Metastasen lediglich dann ausbilden, wenn sich die Tumorzellen in einer für ihr Wachstum geeigneten Umgebung befinden. Die Knochenmatrix bietet durch die dortige ECM ein ideales parakrines Milieu. Unter etlichen Wachstumsfaktoren sind insbesondere *TGF- $\beta$* , *IGF-1*, *IGF-2*, *PDGF*, *FGF-2*, diverse *MMPs* und  *$\alpha\beta3$ -Integrine* zu nennen, welche begünstigend auf die Adhäsion von disseminierten Tumorzellen wirken und Proliferationsanreize setzen [74, 92]. Da die Wachstumsfaktoren unter physiologischen Bedingungen jedoch in der Knochenmatrix gebunden sind, muss eine Tumor-medierte Osteolyse stattfinden. Gut untersucht ist der von Osteoblasten sezernierte *TGF- $\beta$* , welcher in Tumorzellen die Expression von *PTHrP* (*parathyroid hormone related protein*) induziert. Darüber werden zum einen Osteoblasten zur Aktivierung der knochenabbauenden Osteoklasten stimuliert [93] und darüber hinaus Signalwege aktiviert, wie insbesondere eine Steigerung der Notch-Expression, welche das Auftreten von Knochenmetastasen begünstigen [94].

Außerdem scheint ein organspezifisches *Homing* zirkulierender Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) von besonderer Bedeutung zu sein. Über chemokinrezeptor-vermittelte Signale können Tumorzellen Lymphozyten hinsichtlich des *Homings* imitieren, um zum Zielorgan zu gelangen. Offenbar wird der membranständige Chemokin-Rezeptor *CXCR4* insbesondere von CTC überexprimiert. Da der entsprechende Ligand *SDF-1* vor allem im Knochenmark häufig vorkommt, könnte dies darauf hinweisen, dass der chemokin-vermittelte

Signalweg über *CXCR4/SDF-1* beim *Homing* maßgeblich beteiligt ist [95, 96]. Für Tumorzellen verschiedener epithelialer Tumore wie Mammakarzinom, Prostata- und Lungenkarzinom ist das Knochenmark offenbar ein bevorzugtes *Homing*-Organ. Kolonkarzinome beispielsweise entwickeln jedoch relativ selten Knochenmarkmetastasen, da sie dort vermutlich unzureichend stimuliert werden und dementsprechend klinisch inapparent bleiben. Dennoch können nicht stimulierte Tumorzellen vom Knochenmark in andere Organregionen wie Leber oder Lunge gelangen, wo geeignetere Wachstumsbedingungen vorherrschen. Das Knochenmark scheint daher ein ideales Indikatororgan für die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im gesamten Körper zu sein [85, 86, 95, 97, 98].

### 1.2.5 Minimale Residuale Krebserkrankung

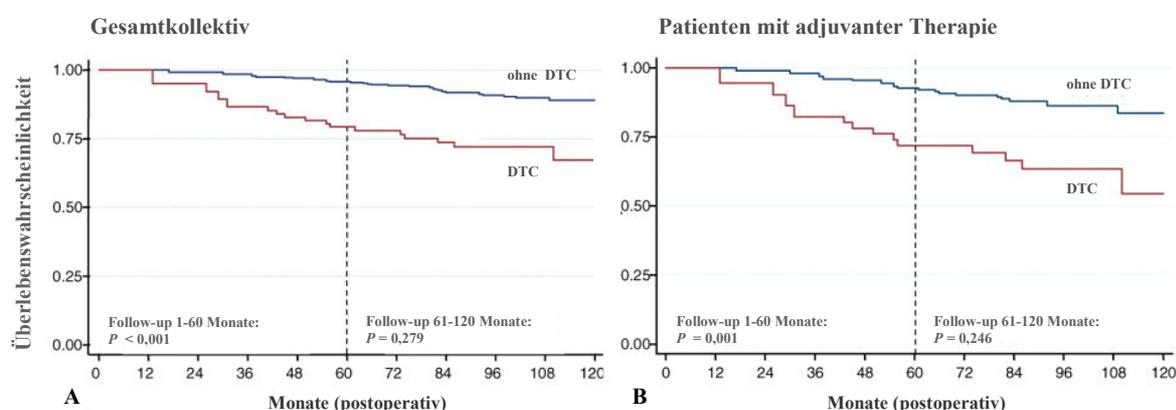
Lange wurde angenommen, dass die Aussaat von Tumorzellen ein spät auftretendes Ereignis der Tumorentwicklung darstellt [99]. Jedoch besitzen laut Expressionsstudien an humanen Malignomen die meisten Zellen eines Primärtumors einen „metastatischen Phänotyp“ und disseminieren früh in das Knochenmark oder distante Organe. Bereits bei Patientinnen mit DCIS wurden im Knochenmark disseminierte Tumorzellen (*disseminated tumor cells*, DTC) detektiert [100]. Da diese Tumorzellstreuung dementsprechend bei Diagnosestellung erfolgt sein kann, und somit eine systemische Erkrankung ohne klinisch-radiologisch nachweisbaren Befund vorliegen mag, wird auch von einer Minimalen Residualen Krebserkrankung (*minimal residual disease*, MRD) gesprochen [85, 95, 98].

Hinweise auf eine MRD wurden erstmals 1981 beschrieben, nachdem einzelne Tumorzellen mit epithelialen Markern in Knochenmarkbiopsien von Patientinnen mit nicht-metastasiertem Mammakarzinom nachgewiesen wurden [101]. Da sich im mesenchymal entstandenen Knochenmark physiologisch keine epithelialen Zellen mit den für sie charakteristischen Zytokeratinfilamenten befinden, stellen Zytokeratine geeignete Marker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark dar [95, 102]. Obwohl ektoper Expressionen von Zytokeratin-mRNA in mesenchymalen Zellen nicht auszuschließen sind, ergab sich die Höhe der Zytokeratin-Proteine in genuinen Knochenmarkzellen für die meist immunhistochemische Detektion als unzureichend. Zudem bietet die Kombination mehrerer Antikörper gegen Zytokeratine oder die Verwendung polyspezifischer Antikörper deutlich bessere spezifische Detektionsraten [98]. Bislang konnte in etlichen Studien ein Knochenbefall durch disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden, wobei sich Werte von 13-50 % auf Frühstadien und bis zu 70 % auf metastasierte Mammakarzinome beziehen. Dass trotz nodalnegativem Status bis zu 30 % der Brustkrebspatientinnen zum Teil nach mehr als zehn

Jahren Latenzzeit dennoch ein Rezidiv entwickeln und demgegenüber ungefähr 40 % der nodalpositiven Patientinnen zehn Jahre oder länger überleben, ist bezeichnend für die Einschränkung der gängigen Prognoseparameter [95, 103].

### 1.2.5.1 Gesamtüberlebenszeit bei Knochenmikrometastasierung

Diverse Einzelstudien sowie eine Meta-Analyse mit über 4700 Mammakarzinompatientinnen haben das Vorhandensein zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark ohne Lymphknotenbefall als unabhängigen Prognosefaktor für ein verkürztes rezidivfreies Intervall und eine verminderte Gesamtüberlebenszeit gewertet [39, 42, 85, 95, 103-105]. Wie in Abbildung 1.4 ersichtlich, ist das Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen mit mikrometastasenfreiem Knochenmark gegenüber Patientinnen mit Nachweis von DTC im Knochenmark am höchsten. Zudem weisen auch nach adjuvanter Therapie Patienten mit Mikrometastasen im Knochenmark eine signifikant schlechtere Prognose auf als Patienten ohne nachweisbare DTC. In beiden Fällen bezieht sich die signifikant ungünstigere Prognose auf die ersten fünf Jahre nach Primärresektion. Im Zeitraum zwischen 61 bis 120 Monaten zeigt sich gleichermaßen der Trend eines geringeren Therapieerfolges bei Nachweis von DTC im Knochenmark, jedoch ohne signifikante Korrelation [39].



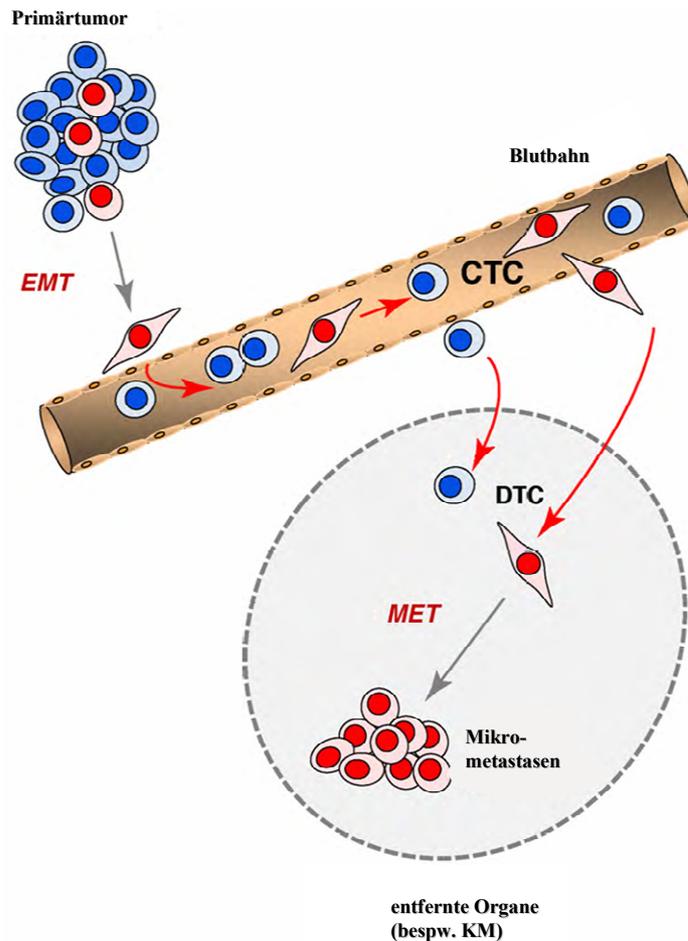
**Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier.** Langzeitüberlebensanalysen und Therapieerfolg in Relation zum Vorhandensein oder Fehlen von DTC im Knochenmark. Links im Bild (A) Darstellung des Gesamtkollektivs mit signifikant schlechterer Überlebenswahrscheinlichkeit ( $p < 0,001$ ) der Patienten mit DTC im Knochenmark innerhalb von 5 Jahren nach Primärresektion. Im Bild B ebenso signifikant geringere Überlebensraten ( $p=0,001$ ) der Patientengruppe mit DTC im Knochenmark und adjuvanter Therapie innerhalb der ersten 5 Jahre postoperativ. Laut Überlebenszeitanalysen beider Kollektive zeigten sich im Zeitraum zwischen 5-10 Jahren trotz deutlicher Differenzen zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der Gruppen mit DTC und ohne DTC keine signifikanten Werte. Graphen modifiziert nach Janni et al. 2011 [39].

Bei einem isolierten Befall entweder der Lymphknoten oder des Knochenmarks findet sich eine mittlere Gesamtüberlebenszeit [103]. Dies deutet ein Vorkommen eigenständiger Metastasierungswege in Bezug auf die hämatogene wie auch lymphatische Disseminierung an.

### 1.2.5.2 Tumorbiologie disseminierter Tumorzellen

Manifeste Metastasen entstehen letztendlich aus nur wenigen disseminierten Tumorzellen. Dabei scheinen diese offenbar aus einer kleinen Subpopulation der Mikrometastasen hervorzugehen. Die während der 1990er Jahren debattierte Hypothese über Krebsstammzellen bei Leukämiepatienten erfährt seit deren Detektion in soliden Karzinomen eine Renaissance [106, 107]. Ausgangspunkt dieser Theoriekonzepte stellt die Heterogenität solider Tumore dar. Die ursprüngliche Vorstellung der Tumorprogression geht von einer nicht hierarchischen, klonalen Selektion besonders aggressiver Zellklone aus. Dahingegen werden Krebsstammzellen als eine begrenzte Entität innerhalb eines Tumors betrachtet, welche als multipotente Vorläuferzellen ein nahezu unbegrenztes Selbsterneuerungs- wie auch Differenzierungspotential besitzen und befähigt sind Apoptose-induzierende Signalwege zu unterbinden und die Telomerase zu aktivieren [108]. Bezeichnend ist, dass sich die tumorigenen Krebsstammzellen nur äußerst selten teilen, jedoch intermittierend schnell proliferierende Krebszellen generieren. Diese Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften verharren ähnlich wie physiologisch vorkommende adulte Stammzellen über einen langen Zeitraum in einem dormanten Zustand mit herunterreguliertem Metabolismus [109]. Vergleichbar mit hämatopoetischen Stammzellen weisen auch die Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften einen ähnlichen Phänotyp und ein assoziierbares Wachstumsverhalten auf. Beide Populationen sind darüber hinaus befähigt im Knochenmark zu persistieren und sich in reifere Zellen zu differenzieren.

Es wird davon ausgegangen, dass im Primärtumor während der Tumorprogression die Subpopulation der Krebsstammzellen einen mesenchymalen Phänotyp annimmt und damit einhergehend die Fähigkeit zu migrieren erwirbt [110]. Dieser Prozess wird als Epitheliale-zu-Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet und beinhaltet den Verlust epithelialer Eigenschaften dieser Tumorzellen [40]. Beispielsweise erfolgt eine Herunterregulation von Zytokeratinen und des Zelladhäsionsmoleküls *EpCAM*. Hierdurch wird der derzeit gängige Nachweis zirkulierender Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) durch epitheliale Marker insbesondere im Hinblick auf die Detektion mesenchymaler Tumorstammzellen in der Blutbahn verhindert oder zumindest erschwert. Folgt nach Extravasation ein Homing ins Knochenmark oder auch Einnisten in anderen distanten Organen, findet wiederum eine Mesenchymal-zu-Epitheliale Transition (MET) statt. Infolge der wiedererworbenen epithelialen Eigenschaften bilden sich kleine Anhäufungen dieser Tumorzellen, welche auch als Mikrometastasen bezeichnet werden [40, 111, 112]. Eine Veranschaulichung der Vorstellungen mesenchymaler und epithelialer Transitionswege findet sich in Abb. 1.5.



**Abb. 1.5 Tumoplastizität.** Im Rahmen der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) werden Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften (rot im Bild) zu migrierenden Zellen mesenchymalen Phänotyps und befinden sich als zirkulierende Tumorzellen (CTC) in der Blutbahn. Erfolgt die Extravasation, disseminieren die Tumorzellen (DTC) in distante Organe, darunter das Knochenmark und bilden nach rückführender Mesenchymal-Epithelialer Transition (MET) Mikrometastasen aus. Modifiziert nach Pantel et al. 2010 [40].

Ausgangspunkt der Änderung des Tumorphänotyps sind genetische und epigenetische Alterationen der Tumorzellen, wie auch des umgebenden Stromas. Dabei wird den umgebenden Zellen und Gewebeeigenschaften für die Induktion der Phänotypänderung eine große Bedeutung beigemessen. In Bezug auf osteotrophe Karzinome finden sich die mesenchymal transformierten Tumorzellen in einer Stammzellnische des Knochenmarks ein, in welcher ein Signalaustausch mit dem Mikromilieu eine Differenzierung unterbinden kann. Dabei determinieren vor allem eng anliegende Osteoblasten, jedoch auch die Extrazelluläre Matrix und retikuläre Zellen über parakrine Stimuli die Progression oder Quieszenz [74, 113, 114].

Da Mikrometastasen über einen langen Zeitraum im zum Teil widrigen Mikromilieu des Knochenmarks überdauern, deutet dies die Notwendigkeit einer plastischen Adaptation an die

Umgebungsfaktoren an. Somit weist das Knochenmark größtenteils ein hypoxisches und hypoglykämisches Milieu, wie auch einen sauren pH-Wert auf. Unter hypoxischen Bedingungen kann es in DTC zu einer Fehlfaltung von Proteinen kommen, was jedoch über den sogenannten UPR-Signalweg (*unfolded protein response*) eine Hochregulation von Chaperonen zur Korrektur der Fehlfaltung bewirkt und somit einen Schutz vor dem hypoxieinduzierten Zelltod darstellt. Außerdem scheint Chaperonen eine Rolle bei der Entwicklung von Chemotherapeutika zuzukommen [40].

Aufgrund des Verweilens der stammzellähnlichen Tumorzellen in der zellzyklusarretierten Latenzphase, sind diese keiner Radio- oder Chemotherapie zugänglich. Theoretisch müsste vor Therapiebeginn eine potentielle Aktivierung der dormanten Tumorzellen stattfinden, wobei so genannte Differenzierungs-induzierende Faktoren eine tragende Rolle spielen könnten. Weiterhin ist die Beobachtung einer differentiellen Expression von *HER2*-Rezeptoren auf DTC im Gegensatz zum *HER2*-negativen Primärtumor klinisch relevant [111, 112, 115]. Zukünftig ist die Untersuchung neuartiger Angriffspunkte gegen mesenchymale Zellklone und des zu berücksichtigenden Stromas von besonderem Interesse, wobei die Rolle der epithelialen und mesenchymalen Transition im Ganzen bislang weitgehend unklar ist [74].

### **1.3 Nachweis chromosomaler Veränderungen beim progressiven Mammakarzinom**

Ein Weg zum besseren Verständnis der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms bis hin zur Prognose und Therapieansprechbarkeit stellt die Untersuchung chromosomaler Veränderungen dar. Brustkrebszellen sind genetisch überaus heterogen und in höchstem Maße chromosomal instabil. Auf dem Weg zur Aneuploidie durchwandern Tumoren höchstwahrscheinlich anfangs telomerische Dysfunktionen gefolgt von Polyploidie, um das Überleben zu sichern. Demzufolge treten unzählige chromosomale Brüche und Fusionen auf, welche sich in zielloser Weise akkumulieren und sich in chromosomalen Gewinnen wie auch Verlusten äußern [116].

Untersuchungen mithilfe von CGH (*comparative genomic hybridisation*) bieten eine Möglichkeit zum genomweiten Screening zur Aufdeckung vielzähliger Veränderungen der DNA-Kopienzahlen. Im Gegensatz zu Expressionsstudien, die selbst in normalen Zellen enorm variierende Genexpressionsmuster hervorbringen, vor allem bedingt durch Zelltyp und Zellzyklus, entstehen bei der CGH durch Messung der Kopienzahl chromosomaler Fragmente

oder Gene bedeutend weniger Abweichungen [117]. Ein Nachteil besteht darin, dass weiträumige Aberrationen der Kopienzahlen eine Vielzahl von Genen betreffen und eine eindeutige Festlegung auf relevante Gene schwierig ist. Man geht weiterhin davon aus, dass 40-60 % der Amplifikationen ebenfalls zu einer Überexpression führen. Ein Beispiel mit großer Übereinstimmung stellt die Amplifikation und Überexpression des Wachstumsrezeptors *HER2* dar [118].

So ergaben CGH-Studien, dass DNA-Kopienverluste auf 9p und Gewinne auf 8q, 11q13, 17q und 20q mit einer schlechten Prognose korrelieren. Wiederum sind Heterozygotieverluste auf Chromosom 1p, 1q, 11p, 3p25.1, 8p22, 13q12, 16q, 17p13.3 und 22q13 ebenso mit einem progredientem Krankheitsverlauf assoziiert [119]. Dabei sind komplexe Tumoren mit extensiv auftretender chromosomaler Instabilität ähnlich wie *BRCA1*- Keimzelltumoren (17q21) mit einer geringen Überlebenszeit assoziiert. Das sich auf Chromosom 13q14.1-2 befindliche Tumorsuppressorgen *RBI* ist ebenso am Zellzyklus beteiligt. Weiterhin werden häufig DNA-Gewinne beschrieben, die das *HER2*-Onkogen (17q21.1) und das *Myc*-Onkogen (8q24.12) betreffen [118, 120]. Interessanterweise finden sich beim Tumorsuppressorgen *TP53* (17p13.2) als im CGH-Array Gewinne wie auch Verluste, was auf das Vorhandensein angrenzender Onkogene und Tumorsuppressorgene hinweist [119].

Strukturelle Alterationen, die keine Veränderung der DNA-Kopienzahlen zur Folge haben, können durch eine CGH-Analyse jedoch nicht detektiert werden. Die Untersuchung von Heterozygotieverlusten detektiert dagegen lokus-spezifisch Veränderungen der DNA hinsichtlich des parentalen Ursprunges, ist jedoch nicht quantitativer Art. Dementsprechend stellt die Methode zur Detektion allelischer Imbalancen eine geeignete Ergänzung zum besseren Verständnis der der Brustkrebsentwicklung zugrundeliegenden genetischen Mechanismen dar.

### **1.3.1 Nutzen der Mikrosatelliteninstabilität zum Nachweis genetischer Alterationen**

Die Beobachtung hochpolymorpher Mikrosatelliten hielt durch die Möglichkeit der Erstellung eines genetischen Fingerabdruckes Einzug in die forensische Medizin und der Vaterschaftsdiagnostik. Da mit einer Sonde Hunderte 4- bis 20 kb-Region umfassende Mikrosatelliten analysiert werden können, würde bei einem anderen Individuum ein identisches Muster mit einer Wahrscheinlichkeit von  $3 \times 10^{-11}$  auftreten. Bei Verwendung

einer zweiten Sonde beläuft sich die Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung zwischen zwei Individuen auf nahezu null [121].

Diese über das gesamte Genom verstreuten Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen bis zu einer Länge von sechs Basenpaaren und besitzen als größtenteils nicht codierende DNA-Regionen, in denen sich neutrale Mutationen akkumulieren, ein höchst polymorphes Erscheinungsbild [122]. Der Verlust eines Tumorsuppressorgens kann sich offensichtlich durch ein stark reduziertes Allel seitens der Tumor-DNA zeigen. Die DNA aus tumorfreiem Brustgewebe, beziehungsweise aus Lymphozyten, würde in diesem Fall als Referenz-DNA dienen, um einen Heterozygotieverlust erkennbar zu machen. Da die DNA-Sequenzen, welche die einzelnen Mikrosatelliten flankieren bekannt sind, können Mikrosatellitenmarker mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) analysiert werden. Dazu wird DNA aus Tumorzellen, wie auch aus Lymphozyten oder tumorfreiem Brustgewebe derselben Patientin isoliert und in getrennten Ansätzen mit Primern, die die Mikrosatelliten flankieren, amplifiziert [121, 123, 124].

Erfolgen Mutationen in der Tumor-DNA, wie beispielsweise Deletionen, Reduplikationen oder andere Alterationen, sind bei heterozygoten Merkmalsträgern die Allele, infolge der variierenden Einheitszahl der Mikrosatelliten auf beiden Chromosomen, unterschiedlich lang. Diese Amplifikationsprodukte können dann mit der Kapillarelektrophorese der Größe nach voneinander getrennt und graphisch dargestellt werden. Dadurch werden Genveränderungen im Sinne von allelischen Imbalancen (AI) entsprechend einer AI-Berechnung nachgewiesen und zur Ermittlung des Log-Scores die Peakflächen der Allele und deren Verhältnis zueinander berechnet.

Da ein Heterozygotieverlust genetisch höchst instabiler Tumore wie dem Osteosarkom oder auch Mammakarzinom nicht nur durch den Verlust eines Allels bedingt sein können, ist es bezeichnender den Begriff der allelischen Imbalance (AI) anstelle des Terminus Heterozygotieverlust (LOH) zu verwenden [125].

### **1.3.2 Allelische Imbalancen auf Chromosom 11p**

In der molekulargenetischen Forschungsgeschichte spielt das Chromosom 11 aufgrund der außergewöhnlich hohen Gendichte und deren häufiger Krankheitsassoziation eine bedeutende Rolle. Insbesondere das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), ein hereditäres Großwuchs-

Syndrom mit ausgeprägter Prädisposition zum Tumorwachstum, wurde frühzeitig intensiv erforscht. Neben den für das BWS charakteristischen Inversionen und Translokationen [126, 127] besteht eine hohe Assoziation allelischer Imbalancen auf 11p15.5 mit der Tumorigenese des Wilms-Tumors, einem v.a. im Kindesalter auftretendem Nephroblastom [128-130]. Dabei scheinen genetische Alterationen auf dieser Lokalisation des kurzen Arms von Chromosom 11 ein häufiges Ereignis in der Ätiologie zahlreicher Tumore, Viel et al. [131] beispielsweise beschreiben Allelverluste auf 11p15 zwischen 15-50 % bei Ovarialkarzinomfällen. Insbesondere bei entdifferenzierten Ovarialtumoren kommen Verluste auf Chromosom 11p häufiger als in gut differenzierten Tumoren vor [132]. Weiterhin werden bei Bronchialkarzinomen allelische Imbalancen auf 11p15 mit Frequenzen zwischen 15-75 % angegeben und in Assoziation mit einer schlechten Prognose gesetzt [133-135]. Auch scheinen beim Harnblasenkarzinom allelische Imbalancen auf 11p mit einer erhöhten Rezidivneigung in Verbindung zu stehen [136]. Mertens et al. [137] veröffentlichte eine Kartierung chromosomaler Imbalancen bei diversen soliden Tumoren, wobei neben den bereits beschriebenen Tumorentitäten Allelverluste auf Chromosom 11p vor allem das Testikuläre Keimzellkarzinom und Maligne Melanom, wie auch das Neuroblastom und Kopf-Hals-Karzinome betreffen. Mikrosatellitenanalysen mehrerer Arbeitsgruppen konnten ebenso Allelverluste auf 11p bei endokrinen Pankreastumoren nachweisen. So stellte die Arbeitsgruppe um Rigaud [138] Heterozygotieverluste in 50 % der Fälle auf Chromosom 11p fest, Chung et al. [139] wiederum detektierten in 36 % der Fälle allelische Deletionen auf 11p. Diese Tumore treten häufig im Rahmen eines hereditären Syndroms mit multiplen endokrinen Neoplasien (*MEN1*) auf, die laut einer Studie um Hessman et al. [140] in allen *MEN1*-assoziierten Pankreastumoren (n=23) durchgehend Heterozygotieverluste auf Chromosom 11p nachweisen konnten.

Bislang konnte dementsprechend ein häufiges Auftreten allelischer Imbalancen auf Chromosom 11p nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass diese betroffene Region offenbar zahlreiche Tumorsuppressorgene beherbergt. Die Anhäufung diverser ausgeschalteter Gene lässt vermuten, dass das Chromosom 11p dem „Imprinting“ unterworfen ist. Bei dieser genomischen Prägung werden spezifische autosomale Gene ausschließlich von dem Allel eines Elternteils exprimiert. Der dem Imprinting zugrunde liegende Mechanismus ist eine epigenetische Modifikation, welche wahrscheinlich durch Methylierung von CpG-Inseln am 5'-Ende imprinteter Gene reguliert wird und zu einer Stilllegung des betroffenen Gens führt. Es wurden bereits etliche Gene

entdeckt, die dem genomischen Imprinting unterliegen und mit einigen genetischen Erkrankungen wie dem Prader-Willi und Angelman Syndrom, wie auch dem Beckwith-Wiedemann Syndrom in Zusammenhang gebracht werden. Auch bei einigen Krebserkrankungen, wie zum Beispiel dem Wilms-Tumor, scheint die genomische Prägung eine bedeutende Rolle zu spielen [141-144].

### **1.3.2.1 Allelische Imbalancen auf Chromosom 11p beim Mammakarzinom**

Bislang konnte in mehreren Studien ein Einfluss von Chromosom 11p auf die Tumorigenese beim Mammakarzinom beobachtet werden, eine Übersicht der publizierten Daten über allelische Imbalancen auf 11p beim Mammakarzinom findet sich in Tab. 1.3.

Tab. 1.3 Allelische Imbalancen auf 11p beim Mammakarzinom

Publikationen	Position	Fälle	Marker	AI	Gewebeentitäten
Smeds et al., 2005 [145]	11p15.3	n=30	D11S1999	0%	DCIS
	11p14-13		D11S904	8%	DCIS
Ellsworth et al., 2004 [146]	11p15.1	n=30	D11S2368	14%	Tumor-DNA
				67%	Stroma-DNA
Kim et al., 2004 [147]	11p15.5	n=68	D11S922	27%	DCIS
				45%	Tumor
			D11S988	7%	DCIS
				19%	Tumor
			TH	13%	DCIS
				34%	Tumor
Lerebours et al., 2002 [148]	11p15	n=66	D11S860	50%	Tumor
		n=1387		27%	Tumor
Regitnig et al., 2002 [149]	11p15.5	n=41	TH.PCR2	59%	Tumor
					Tumor
Karnik et al., 1998 [150]	11p15.5-15.4	n=94	I: D11S1318- D11S4088	35-45%	Tumor
			II: D11S1338- D11S1323	55-60%	Tumor
O'Connell et al., 1998 [119]	11p15	n=399	D11S988	60%	Tumor
Nakata et al., 1998 [151]	11p15.5	n=184	D11S922	38%	Tumor
			D11S1318	39%	Tumor
			D11S1338	36%	Tumor
			D11S1349	37%	Tumor
			D11S902	32%	Tumor
			D11S1359	33%	Tumor
			D11S929	35%	Tumor
			D11S1324	29%	Tumor
			D11S907	37%	Tumor
	11p11		D11S1360	29%	Tumor
			D11S905	33%	Tumor
			D11S986	32%	Tumor
			D11S1344	32%	Tumor
Winqvist et al., 1995 [152]	11p15.5-4	n=96	TH	40%	Tumor
Negrini et al., 1995 [153]	11p15	n=60	D11S922-	20%	Tumor
			D11S1318,		
			D11S860	22%	Tumor
			D11S2349	26%	Tumor

Vor allem korrelierten Verluste auf 11p15 mit einem aggressiveren Tumortyp oder einer schlechteren Prognose [154, 155]. Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 wurden nach Untersuchungen von Lymphknoten-negativen Brustkrebspatientinnen ebenso von Dellas und Kollegen beschrieben und mit einer ungünstigeren Prognose in Verbindung gebracht [156]. Dies deutet darauf hin, dass diese insbesondere die von genomischer Prägung betroffene Region Tumorsuppressorgene beherbergt, welche im Zuge der Tumorprogression

verloren gehen. Insgesamt gesehen stellte sich beim Mammakarzinom die chromosomale Region 11p15.5-15.3 (Abb. 1.11) als prozentual am häufigsten von allelischen Imbalancen betroffene Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 heraus, so dass eine genauere Betrachtung dieses Lokus im Rahmen dieser Arbeit erfolgen sollte. Eine Auflistung für das Mammakarzinom prognostisch relevanter Tumorsuppressorgene auf 11p15 ist in Tab. 1.4 dargestellt.

Chr. 11p15.5-3



**Abbildung 1.11 Chromosom 11.** Der Targetbereich 11p15.5-11p15.3 codiert etliche für die Kanzerogenese relevante Tumorsuppressorgene.

**Tabelle 1.4 potentielle Tumorsuppressorgene mit Lokalisation auf Chromosom 11p**

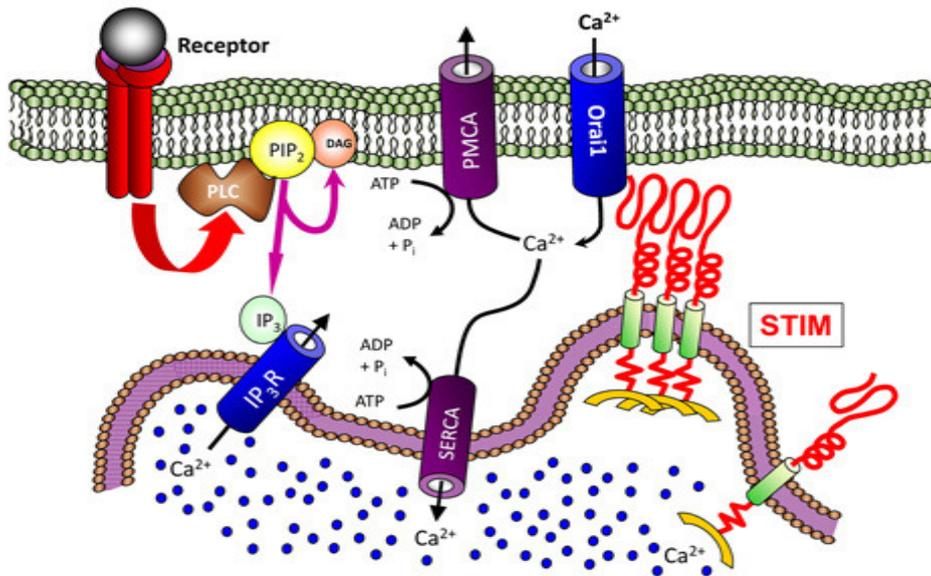
Gen	Marker	Region	Publikation
SLC22A1L	D11S2071-TH.PCR2	11p15.5	[157, 158]
MUC5AC	D11S2071-TH.PCR2	11p15.5	[159, 160]
PRKCDBP	D11S2071-TH.PCR2	11p15.5	[222]
STIM1	TH.PCR2-D11S1338	11p15.4	[161] [162]
CDK N1C	TH.PCR2-D11S1338	11p15.4	[163]
RRM1	TH.PCR2-D11S1338	11p15.4	[133, 164]
hSRBC	D11S1338-D11S1323	11p15.4	[165, 166]
ILK	D11S1323-D11S1999	11p15.4	[167, 168]
SCUBE2	D11S1323-D11S1999	11p15.4	[169]
WEE1	D11S1323-D11S1999	11p15.4	[170]
LYVE1	D11S1323-D11S1999	11p15.4	[171]
CK2	D11S1999-D11S1349	11p15.4	[172]

Unter den auf 11p15.5 identifizierten Genen war zum einen der *endotheliale Hyaluronrezeptor (LYVE-1)* von besonderem Interesse, da dieser anscheinend mit der Angiogenese und Metastasierung des Mammakarzinoms assoziiert ist [171, 173, 174]. Entsprechend der Aberrationsmuster auf Chromosom 11p15 könnten darauf ebenso für die Mikrometastasierung relevante Gene beherbergt sein. Letztendlich wurde für die vorliegende

Arbeit das *stromal interactive molecule 1 (STIM1)* als auf die Expression hin näher zu untersuchendes Kandidatengen eingegrenzt, welchem laut Suyama et al. [162] eine Rolle bei der Metastasierung von Tumoren zukommt.

### 1.3.2.2 *Stromal interactive molecule 1 (STIM1)*

Dem auf Chromosom 11p15.4 vorkommenden potentiellen Tumorsuppressorgen *STIM1* wird zunehmend eine grundlegende Relevanz hinsichtlich der Migration von Tumorzellen und Ausbildung metastatischer Tumoreigenschaften beigemessen [108, 169, 175]. Als ubiquitär vorkommender Botenstoff spielt Calcium eine ausschlaggebende Rolle bei der Tumorentstehung und Progression. *STIM1* ist ein Bestandteil kapazitiver Calciumkanäle (*store operated calcium channel, SOCC*), welche infolge Depletion intrazellulärer Calciumspeicher einen Calciumeinstrom ins Zellinnere bewirken. Bei Tumorzellen fungieren höchstwahrscheinlich unzählige Stimuli wie Chemokine, Membranpotentialänderungen und Membrandehnungen zu einer Rezeptoraktivierung mit nachfolgender Signaltransduktion über den *PLC-PIP<sub>2</sub>-IP<sub>3</sub>*-Signalweg (Abb.1.6) [175]. Damit erfolgt über die Aktivierung des *IP<sub>3</sub>*-Rezeptors am calciumspeichernden Endoplasmatischen Retikulums (ER) eine Calciumfreisetzung ins Zellinnere. Calcium wiederum kann so genannte Myosin- und Aktinfilamente anregen, welche als kleinste Muskelfasereinheiten durch eine integrinvermittelte Kopplung zwischen Einzelzelle und der ECM die Zellmigration regulieren [175]. Dabei ist ein Herstellen und Lösen von Zelladhäsionen von grundsätzlicher Bedeutung. Verarmen die Calciumspeicher des ER, wird dies vom membranständigen Calciumsensor *STIM1* detektiert und über *Orai1*, der kanalbildenden Untereinheit mit Lokalisation an der Zellmembran, ein Calciumeinstrom in den Intrazellularraum vermittelt. Die Auffüllung der Calciumspeicher des ER erfolgt dann aktiv unter ATP-Spaltung über den *SERCA*-Kanal [161, 175].



**Abb. 1.6 Rolle von *STIM1* beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling.**

Phospholipase C (*PLC*), Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat (*PIP<sub>2</sub>*), Diacylglycerol (*DAG*), Inositol 1,4,5-Triphosphat (*IP<sub>3</sub>*), *IP<sub>3</sub>*-Rezeptor (*IP<sub>3</sub>R*), Sarco/Endoplasmatische Calcium-ATPase (*SERCA*), Plasmamembran-Calcium-ATPase (*PMCA*), *Stromal interactive molecule (STIM1)*. Modifiziert nach Ritchie et al. 2011 [161]

Die Regulation von *STIM1* selbst erfolgt laut neueren Ergebnissen auf genomischer Ebene über die Transkriptionsfaktoren *WT1* (*Wilms tumor suppressor 1*) und *EGR1* (*Early growth response*), welche bei etlichen Tumorarten eine Rolle spielen. Zum einen kann eine Überexpression von *WT1* oder eine Ausschaltung von *EGR1* zu einem Verlust der *STIM1*-Expression führen. Beim Brustkrebs ist der Übergang hormonrezeptorpositiver Karzinome hin zum Verlust der endokrinen Ansprechbarkeit von einer Vielzahl an genomischen Alterationen bedingt, die eine veränderte Expression nach sich ziehen. Dabei wird von einer Beteiligung von *WT1* und *EGR1* ausgegangen, jedoch auch ein Einfluss von *STIM1* und *Orai1* angenommen [161]. Obwohl derzeit das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling hinsichtlich der Tumorigenese und Metastasierung intensiv erforscht wird, scheint der Erkenntnisstand erst am Anfang zu stehen. Jedoch gerade der hochkomplexe Mechanismus der Calciumhomöostase bietet Raum für neuartige Therapieansätze zur Einschränkung des Tumorwachstums, der Migration und Angiogenese.

#### 1.4 Fragestellung

Da sich während der Genese des Mammakarzinoms diverse chromosomale Veränderungen ereignen, stellt sich die Frage, ob die initiale Phase der Tumorzell dissemination besonderen Gesetzmäßigkeiten unterworfen oder rein zufälliger Natur ist. Obwohl molekulargenetische Untersuchungen epithelialer Tumore in den vergangenen Jahren zu neuen Erkenntnissen führten, bleiben elementare Aspekte des frühen Metastasierungsverhaltens ungeklärt.

Um herauszufinden, ob spezifische genetische Muster mit einer Mikrometastasierung ins Knochenmark korrelieren, wird eine Identifikation genomischer Aberrationen und genetischer Expressionsmuster beim Mammakarzinom hinsichtlich früher hämatogener Disseminierung von Krebszellen in das Knochenmark angestrebt. Da ein Verlust auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 bei der Progression des Mammakarzinoms und vermutlich der Mikrometastasierung im Knochenmark eine Rolle spielt, sollen die eingangs dargestellten Deletionsmuster über eine Mikrosatellitenanalyse eingehender untersucht und feinkartiert werden. Weiterhin wird mithilfe der *Tissue-Mikroarray-Methode* die Expression und prognostische Bedeutung eines auf 11p15.5 befindlichen Tumorsuppressorgens untersucht und mit dem Vorhandensein von Mikrometastasen korreliert.

Durch die Analyse der erhobenen Daten soll eine Einschätzung der diagnostischen und prognostischen Wertigkeit potentieller genetischer Marker erfolgen. Die neu gewonnenen Erkenntnisse könnten einen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle von 11p im Rahmen der Mikrometastasierung leisten und wesentlich an einer Erkenntniserweiterung auf dem Weg zu innovativer Diagnostik und zielgerichteten Therapieansätzen beteiligt sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenmaterial

##### 2.1.1.1 Patientenkollektiv der Mikrosatellitenanalyse

In Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, standen Tumor- und Normalgewebe sowie Blutproben zur Mikrosatellitenanalyse zur Verfügung. In die Studie wurden 34 Patienten mit Mammakarzinom eingeschlossen, denen perioperativ lokoregionale LK entfernt wie auch Knochenmark (KM) vom oberen Beckenkamm entnommen wurde. Die Tabelle 2.1 stellt die klinisch-pathologischen Daten des Patientenkollektivs dar.

**Tabelle 2.1 Patientenkollektiv der Mikrosatellitenanalyse**

	<i>Anzahl (n)</i>		<i>Anzahl (n)</i>
<b>Gesamtkollektiv</b>	<b>34</b>		<b>34</b>
<b>Knochenmarkstatus</b>		<b>Erkrankungsalter</b>	
negativ	18	< Median	19
positiv	16	> Median	15
<b>Lymphknotenstatus</b>		<b>Hormonrezeptorstatus</b>	
negativ	31	negativ	1
positiv	3	positiv	33
<b>pT-Stadium</b>		<b>Menopausenstatus</b>	
pT1	13	praemenopausal	3
pT2	20	perimenopausal	4
pT3	1	postmenopausal	27
<b>Differenzierungsgrad</b>		<b>HER2</b>	
Grad 1	2	negativ	11
Grad 2	20	positiv	23
Grad 3	12		
<b>Tumorgröße</b>			
< Median	19		
> Median	15		

Es waren in 16 Fällen Knochenmarkmikrometastasen nachweisbar. Das duktales Mammakarzinom war mit 25 Fällen am häufigsten vertreten, das lobuläre in 6 Fällen und 2 Fälle wurden einem anderen Histologietyp zugeordnet. Die Tumorgröße entsprach bei 13 Exzisionen pT1, bei weiteren 20 Patienten pT2 und in einem Fall pT3. Den Differenzierungsgrad 1 wiesen 2 Tumore auf, 20 den Differenzierungsgrad 2, sowie 12 Tumore besaßen den Differenzierungsgrad 3. Lymphknotenmetastasen fanden sich in 3 Fällen, ein positiver Hormonrezeptorstaus in 33 Fällen und ein positiver *HER2*-Status in 23 Tumoren.

### 2.1.1.2 Patientenkollektiv der Multigewebeblock-Analyse

Die für die Herstellung der Multigewebeblöcke (TMA) verwendeten formalinfixierten Paraffinblöcke mit reseziertem Tumorgewebe von Brustkrebspatientinnen wurden vom Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Anhand der Pathologieberichte des Instituts konnten die vollständigen Patientendaten eingesehen werden, wobei folgende Befunde zur Auswertung herangezogen wurden: Tumorhistologie, Tumorgröße, LK-Befall, Grading, Hormonrezeptor- sowie Menopausenstatus wie auch der *HER2*-Status und das Auftreten von Rezidiven. Somit wurden zwei TMA's mit einer Stichprobe von insgesamt 124 Patientinnen erstellt, wobei von 10 Patientinnen dieses Kollektivs ebenfalls Tumorgewebe und Blutproben für die Mikrosatellitenstudie zur Verfügung standen. Auf dem TMA I befinden sich 39 Mammakarzinome, davon 17 einschließlich Lymphknoten, sowie 20 Kontrollen aus malignen wie auch benignen Kolon-, Lungen-, Prostata-, Endometrium- und Uterusgeweben. Der TMA II umfasst 85 Mammakarzinome und 20 Kontrollen derselben Gewebeentitäten. Die Daten zur Histologie, zum TNM-Stadium und Hormonrezeptor-Status der letztendlich 90 auswertbaren Mammakarzinomproben von TMA I und TMA II sind der Tabelle 2.2. zu entnehmen.

**Tabelle 2.2 Patientenkollektiv der TMA-Analyse**

	Anzahl (n)		Anzahl (n)
<b>Gesamtkollektiv</b>	<b>90</b>		<b>90</b>
<b>Knochenmarkstatus<sup>v</sup></b>		<b>Erkrankungsalter</b>	
negativ	65	< Median	45
positiv	24	> Median	45
<b>Lymphknotenstatus<sup>σ</sup></b>		<b>Hormonrezeptorstatus</b>	
negativ	53	negativ	12
positiv	36	positiv	78
<b>pT-Stadium</b>		<b>Menopausenstatus<sup>τ</sup></b>	
pT1	39	praemenopausal	28
pT2	43	perimenopausal	7
pT3/4	8	postmenopausal	53
<b>Differenzierungsgrad</b>		<b><i>HER2</i></b>	
Grad 1	7	negativ	74
Grad 2	44	positiv	16
Grad 3	39		
<b>Tumorgröße</b>			
< Median	43		
> Median	47		

<sup>v</sup> KM-Status fehlt bei einem Patienten

<sup>σ</sup> LK-Status fehlt bei einem Patienten

Bei 23 Patientinnen wurden Mikrometastasen in den Knochenmarkspiraten gefunden. In 60 Fällen zeigte sich hinsichtlich des Histologietyps ein duktales, in 17 Fällen ein lobuläres Mammakarzinom und 13 der Tumore besaßen eine andere histologische Einteilung. Die Tumorgöße betreffend waren 39 Proben in pT1 eingeteilt, in 43 Fällen in pT2 und in 8 Fällen in pT3 beziehungsweise pT4. 36 der Patientinnen wiesen einen positiven Lymphknotenstatus auf. Einen Differenzierungsgrad 1 besaßen 7 der Tumore, 44 einen Differenzierungsgrad 2, und ein Differenzierungsgrad 3 lag bei 39 Tumoren vor. In 78 Fällen war der Hormonrezeptor-Status positiv, wobei in 16 Fällen ein positiver *HER2*-Status vorlag.

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

### 2.1.2.1 Reagenzien

Citratpuffer	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA (Diethylen-diamin-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eosin G-Lösung	Merck Eurolab, Darmstadt
Entellan	Merck Eurolab, Darmstadt
Eukitt	Merck Eurolab, Darmstadt
Ethanol, Isopropol	Merck Eurolab, Darmstadt
Ficoll-Plaque	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fixogum	Marabuwerke GmbH & Co., Tamm
Formamid, deionisiert	Merck Eurolab, Darmstadt
Genescan ABI Prism 310, Genetic Analyser	PE Applied Biosystems
Hämalaun	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Methylenblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Eurolab, Darmstadt
PBS, Dulbecco´s	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Seakem® LE Agarose	FMC-Bioproductions, Rockland, USA
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	Merck Eurolab, Darmstadt
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Xylenxanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### 2.1.2.2 Antikörper

#### 2.1.2.2.1 Antikörper zum Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im KM

Anti-Pan CK A45-B/B3 (0,2 mg/ml)	Micromet, Martinsried
MOPC21 (1 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen
Sekundärantikörper Z259 (2,5 mg/ml)	Dako, Hamburg

APAAP-Komplex (0,1 mg/ml) Dako, Hamburg

#### 2.1.2.2.2 Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Anti-Pan CK A45-B/B3 (0,2 mg/ml) Micromet, Martinsried

APAAP-Komplex (0,1 mg/ml) Dako, Hamburg

STIM1 Abnova Corporation, Taiwan

#### 2.1.2.3 Enzyme

AmpliTaq<sup>®</sup>DNA Polymerase Perkin Elmer (Roche, Mannheim)

Pepsin Zymed, Berlin

Proteinase K Qiagen GmbH, Hilden

#### 2.1.2.4 PCR-Primer

Die aufgeführten Mikrosatellitenmarker wurden mit *Gene Runner* ([www.generunner.net](http://www.generunner.net)) selbst entworfen, direkt von Publikationen entnommen wie auch modifiziert. Eine detaillierte Auflistung der Mikrosatellitenmarker ist in Tabelle 2.3 sowie 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.3 und 2.4 Eigenschaften sowie Herkunft der PCR-Primer und Primer-Sequenzen.

Mikro-satelliten	Locus	PCR-Produkt Größe	Markerherkunft	Literatur
D11S2071	11p15.5	168 bp	<i>Reverse</i> neu erstellt	Karnik et al. 1998 (Hum. Mol. Gen.)
TH.PCR2	11p15.5	118 bp	selbst erstellt	Regitnig et al. 2002 (J. Pathol.)
D11S1338	11p15.4	255-265 bp	Publikationsentnahme	Karnik et al. 1998 (Hum. Mol. Gen.)
D11S1323	11p15.4	201-207 bp	Publikationsentnahme	Karnik et al. 1998 (Hum. Mol. Gen.)
D11S1999	11p15.4	114 bp	<i>Reverse</i> modifiziert	Smeds et al. 2005 (Acta Onc.)
D11S1349	11p15.3	260-280 bp	Publikationsentnahme	Nakata et al. 1998 (Eur. J. Cancer)

Marker	Forward	Reverse
D11S2071	AGGGCAATGAGGACATGAAC	TGTGGGTGGCAGTGAAAC
TH.PCR2	TTCAAAGGGTATCTGGGCTCTG	GCAGGTCACAGGGAACACAG
D11S1338	GACGGTTTAACTGTATATCTAAGAC	TAATGCTACTTATTTGGAGTGTG
D11S1323	TGCTGCTTAGAATGAGTAGATGTC	CTCTATGAAGTTGGAGTCTAGGTTG
D11S1999	TACATGGCAGCAGGCATATA	GTAACAAGATTGCTAGATAGGC
D11S1349	AGAGAGCACTTGAGTGAAGG	GGACTTTTCATCCCAAATC

### 2.1.2.5 Käufliche Systeme (*Kits*)

Tabelle 2.5 Verwendete käufliche Systeme.

Anwendung	Produkt	Hersteller
DNA-Isolation	QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
DNA-Isolation	QIAamp <sup>®</sup> DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
Immunhistochemie	DAKO ChemMate <sup>™</sup> Detection Kit	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
Immunhistochemie	Envision Kit (5007)	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
Immunhistochemie	DAB Chromogen (5001)	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
Erythrozyten-Lyse	Whole Blood Erythrocyte Lysing Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA

### 2.1.2.6 Puffer und Lösungen

Methylenblau-Toluidin-Färbelösung	0,2 % Methylenblau, 1 % Touidin in 0,9 % NaCl-Lösung
PBS, pH 7,4 (10x)	1,54 M NaCl; 0,08 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,02 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
SSC, pH 7,0 (20x)	3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat
TBE, pH 8,0 (10x)	0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 0,02 M Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O
TBST (10x)	1 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,2 % Tween 20 (Polyethylensorbitan- monolaurate)

### 2.1.2.7 Sonstiges Material

Fettstift DAKO-Pen	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Stuttgart

### 2.1.3 Geräte

Genescan ABI Prism 310, Genetic Analyser	Applied Biosystems
Durchlichtmikroskop	Wilovert S Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Geldokumentations-System, GeneGenius 2	Syngene, Cambridge, UK
Gelelektrophorese-Analagen	Bio-Rad Laboratories, München
Gelkammer, ComPor L Mini	Bioplastics RV, Landgraaf, Niederlande
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler + Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Microwelle	Promicro, München
Mikrotom	Promicro, München
Nanodrop ND-1000 Spectrometer	PeqLab, Erlangen
pH-Meter	inoLab WTW, Heidelberg

Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rollmischer, Stuart SRT1	Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Thermocycler	Flexigene Techne, Staffordshire, UK
Tischzentrifuge, Heraeus B12	Kendro, Langselbold
Tissue Micro Arrayer	TSS (Technischer Service & Support)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Sartorius
Wasserbad, GFL-1003	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge, Heraeus 3S-R	Kendro, Langselbold
Zentrifuge, Rotofix 32	Hettich, Villingen-Schwenningen
Zytozentrifuge	Hettich, Villingen-Schwenningen

#### 2.1.4 Softwareprogramme

ABI Prism DNA Sequencing Software	Applied Biosystems
ABI PRISM® 3100 GeneScan® Analysis	Applied Biosystems
Excel, Version 12.0	Microsoft Office 2007
SPSS, Version 11 für Windows	SPSS Inc., Chicago, USA
Gene Runner	<a href="http://www.generunner.net">www.generunner.net</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Detektion disseminierter Tumorzellen in Knochenmarkaspiraten

#### 2.2.1.1 Isolierung von Tumorzellen aus dem Knochenmark

Die aus dem oberen Beckenkamm intraoperativ entnommenen Knochenmarkbiopsien wurden in Heparin aspiriert und möglichst zeitnah aufarbeitet, um ein Absterben der Zellen zu unterbinden. Zur Separation der epithelialen, sowie mononuklearen Zellen von Erythrozyten und Granulozyten diente die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nach Braun et al. [103, 176]. Voran ging ein Waschschrift in Hank's Solution, um die Fettzellen aus dem Knochenmarkaspirat zu entfernen. Durch eine dreißigminütige Dichtegradientenzentrifugation bei 800 x g und Raumtemperatur (RT) wurde eine Trennung der mononuklearen Zellen erreicht. Dadurch entstand eine Interphase, in der sich der Großteil der mononuklearen Zellen befand. Diese Interphase wurde extrahiert und mit 50 ml PBS bei 1.400 rpm für 10 min gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Bei Vorhandensein von höheren Erythrozytenanteilen wurde zudem eine Erythrozyten-Lyse nach den Herstellerangaben des Whole Blood Erythrocyte Lysing Kits (R&D Systems, Minneapolis) durchgeführt. Die mononuklearen Zellen wurden anschließend zu jeweils  $7 \cdot 10^5$  Zellen bei 1.000 rpm für 3 min auf einen Objektträger (Superfrost Plus, Fischer) zentrifugiert. Diese sogenannten Zytospins wurden über Nacht getrocknet und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.1.2 Immunzytochemischer Nachweis von Zytokeratin-positiven Tumorzellen im Knochenmark

Zur Beantwortung der Frage, ob bereits Mikrometastasen in den Knochenmarkbiopsien vorhanden waren, diente die immunzytochemische Färbung der Zytospins mit einem Panzytokeratinantikörper nach der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase). Da Zytokeratine von epithelialen Zellen gebildet und als zytoplasmatische Intermediärfilamente essentieller Bestandteil des Zytoskeletts sind, können sie als spezifische Marker zur Detektion epithelialer Tumorzellen im mesenchymalen Knochenmark verwendet werden. Dabei wurde als monoklonaler Primärantikörper A45-B/B3 (IgG1, Micromet, München, Germany) verwendet, welcher spezifisch an verschiedene Zytokeratinkomponenten, wie Zytokeratin 8, 18 und 19 wie auch Zytokeratin 8/19 Heterodimere, bindet (siehe Abb. 2.1). Die immunzytologische Untersuchung des Zytokeratinprofils erfolgte durch drei mit A45-B/B3 und drei mit MOPC21 gefärbten Zytospins mit je  $7 \cdot 10^5$  Zellen. Patienten mit mindestens einer Zytokeratin-positiven Zelle im Knochenmarkaspirat wurden als KM-positiv deklariert. Aufgrund der Zytokeratin-positiven Eigenschaften der MCF7-Mammakarzinomzelllinie dienten Zytospins dieser Zellen als Positivkontrolle jeder immunzytochemischen Färbung. Zur Isotyp-Kontrolle wurde der MOPC21 Antikörper (Sigma) verwendet.

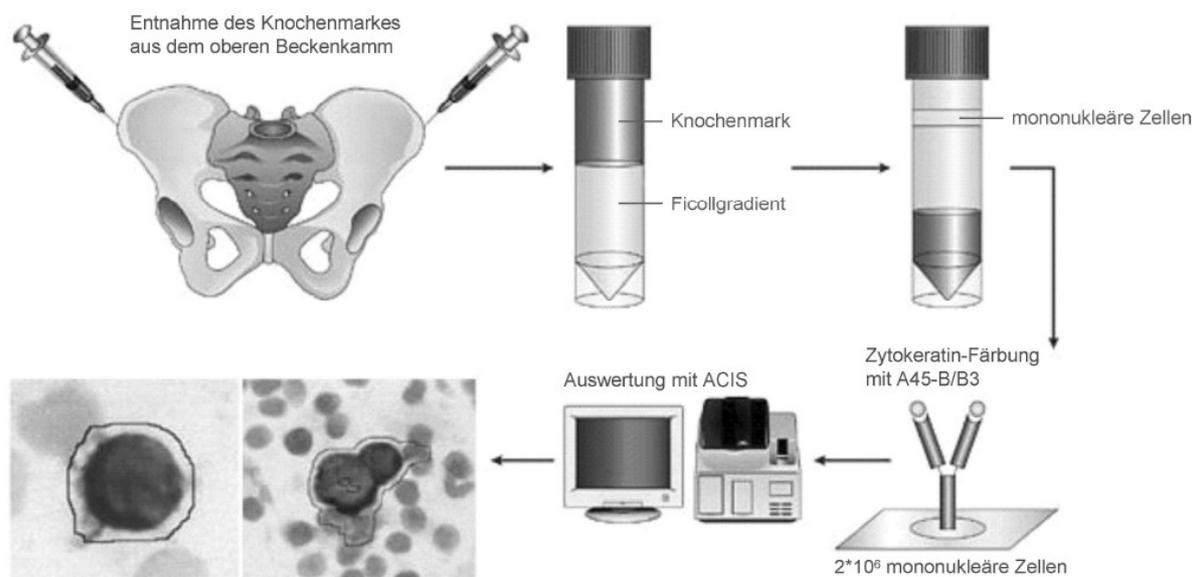


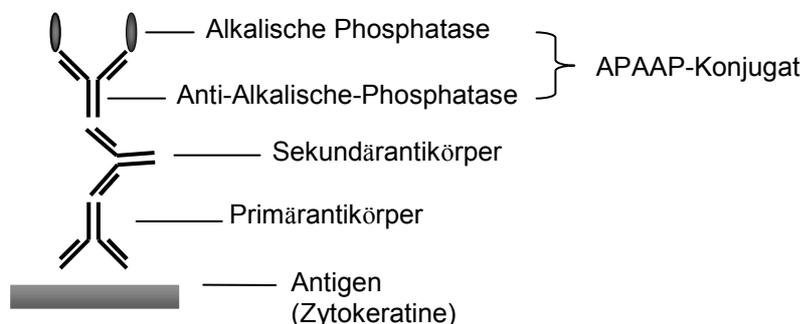
Abbildung 2.1 Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark. Modifiziert nach Pantel et al. [98]

Eine Fixierung der mononuklearen Zellen auf den Zytospins wurde durch eine 5-minütige Inkubation mit Aceton erreicht. Danach wurden durch Zugabe von 10 %igem AB-Serum in PBS für 20 min bei RT unspezifische Bindungen blockiert, so dass die Zellen für 45 min mit dem Primärantikörper A45-B/B3 (2 µg/ml, Micromet) inkubieren konnten. Im Anschluss daran wurden die Zytospins in PBS gewaschen, um für 30 min eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus Brückenantikörper Z 0259; 125 µg/ml Dako) vorzunehmen. Es folgte ein Waschschrift mit PBS und daraufhin eine 30-minütige Inkubation mit einem APAAP-Konjugat (1 µg/ml, Dako). Dieser APAAP-Komplex besteht aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem gegen den Sekundärantikörper gerichteten Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörper. Dadurch entsteht eine Verbindung des am Antigen gekoppelten Primärantikörpers und dem APAAP-Komplex über den Sekundärantikörper. Nach Hinzugabe einer Substratlösung für 20 min fand die Färbung statt, indem die alkalische Phosphatase Naphtolphosphatester (Substrat) zu Phenolkomponenten und Phosphaten hydrolysiert. Es bilden sich letztendlich durch Reaktion der Phenole mit Neufuchsin unlösliche Azofarbstoffe. Eine schematische Darstellung der APAAP-Reaktion findet sich in Abbildung 2.2.

#### Substratlösung (frisch angesetzt)

- Lösung 1      78,8 ml Aqua dest., 4,2 ml 1 M Tris (pH 9,5), 200 µl 0,625 M Levamisol  
 Lösung 2      415 µl 0,56 M NaNO<sub>2</sub>, 166 µl 5 % Neufuchsin  
 Lösung 3      42 mg Napthol-AS-Bi-Phosphat, 500 µl Dimethylformamid

Lösung 1 und 2 vermischen, Lösung 3 hinzugeben und filtrieren.

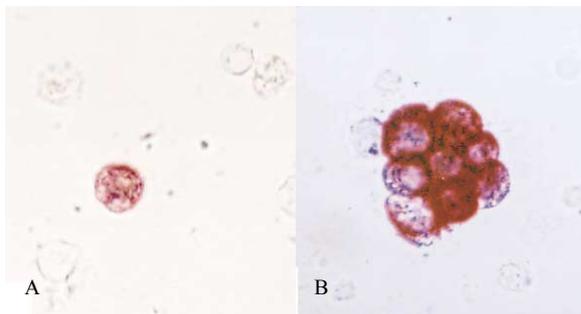


**Abbildung 2.2 APAAP-Methode.** Primärantikörper und Antikörper des APAAP-Konjugats stammen von derselben Spezies (Maus), der verbindende Sekundärantikörper vom Kaninchen.

Endogen im Knochengewebe und in einigen Leukozyten vorkommende alkalische Phosphatasen wurden vorab durch Applikation von Levamisol gehemmt. Nach einem letzten

Waschschrift der Zytospins in PBS wurde mit Mayer's Hämalaun Lösung (1:5) gegengefärbt und mit Glyzergel Mounting Medium eingedeckelt.

Mithilfe des *Automated Cellular Imaging System* (ACIS; Clariant, Kalifornien, USA) wurde ein automatisches Scannen mit anschließender Analyse vorgenommen [177]. Alle positiven Präparate wurden einer zusätzlichen Evaluierung durch einen erfahrenen Wissenschaftler hinsichtlich morphologischer Malignitätskriterien von Tumorzellen (definiert in Borgen und Pantel et al., [178]) zugeführt. Eine exemplarische Darstellung im Knochenmark detektierter Mikrometastasen ist in Abbildung 2.3 ersichtlich.



**Abb. 2.3 Nachweis zytokeratinexprimierender Zellen im Knochenmark (x1000).** APAAP-Färbung mit monoklonalem Antikörper A45-B/B3. In der linken Abbildung (A) ist eine einzelne DTC dargestellt, rechts im Bild (B) findet sich eine Anhäufung von acht okkulten Zellen. Modifiziert nach Braun et al. 2000 [103].

### 2.2.1.3 Färbungen von Tumorgewebeschnitten

#### 2.2.1.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Für die Anfärbung der Gewebestrukturen wurde eine kombinierte Kern- Plasmafärbung mit Mayer's Hämalaun als kationischem Metallionen-Farbkomplex und Eosin als anionischem Farbstoff verwendet. Damit wurde eine kontrastreiche Färbung erzielt, durch welche die Zellkerne anhand von Hämatoxylin blau dargestellt wurden und sich das Zellplasma durch Eosin rötlich anfärbte. Vor dem Färben wurde das Paraffin mittels Xylol in einer Entparaffinierungsreihe aus den Paraffingewebeschnitten (6-8  $\mu\text{m}$  dick) herausgelöst. Zuerst erfolgte bei Raumtemperatur ein zweimaliges Xylolbad für jeweils 10 min und daraufhin eine jeweils zweimalige absteigende Ethanol-Reihe (100 % Ethanol, 96 % Ethanol, 80 % Ethanol) für 3 min, um die Schnitte in ein wässriges Milieu zu überführen. Daran wurde für 7 min ein Hämalaun-Bad (filtriert) angeschlossen, ein Wässern in Leitungswasser und nachfolgend ein kurzes Schwenken in einem HCl/Ethanol (96 %)-Bad. Unter laufendem Leitungswasser wurden die Objektträger 10 min gewaschen und im Anschluss für 20 sek mit Eosin gefärbt. Daraufhin wurde in Leitungswasser gewässert, bis Farbrückstände beseitigt waren und eine aufsteigende Ethanol-Reihe (80 %, 96 % und 100 % Ethanol) für jeweils 1 min begonnen

wurde. Die Schnitte wurden 2x für 10 min in Xylol gebadet letztendlich mit Eukitt eingedeckelt.

### **2.2.1.3.2 Toluidinblau/Methylenblau-Färbung**

Zur Beurteilung von Tumorgewebeschnitten erfolgte eine Anfärbung der Präparate nach oben genanntem Protokoll mit Hämatoxylin-Eosin. Da diese Farbstoffe jedoch auf die PCR-Analyse inhibierend wirken können, wurde vor der DNA-Isolierung und PCR-Analyse aus Tumorgewebeschnitten stets eine Toluidinblau/Methylenblau-Färbung verwendet. Dieser Farbstoff zeichnet sich durch eine Anfärbung der Zell- und Faserkomponenten in unterschiedlichen Blautönen aus, wobei das Stroma metachromatisch rotviolett gefärbt wird. Durch die kontrastreiche Färbung waren die Schnitte für die manuelle Mikrodisektion von Tumorzellen optimal.

Die Gewebeschnitte wurden nach einer kurzen Inkubation in Aqua dest. in einer filtrierten Toluidinblau/Methylenblau-Lösung (1 % (w/v) Toluidinblau, 0,2 % (w/v) Methylenblau in Aqua dest.) für 30 sek angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 1 min. in Aqua dest. gewaschen und standen nach einer Dehydratation in 75 % und 100 %igem Ethanol der Mikrodisektion zur Verfügung (siehe 2.2.5.)

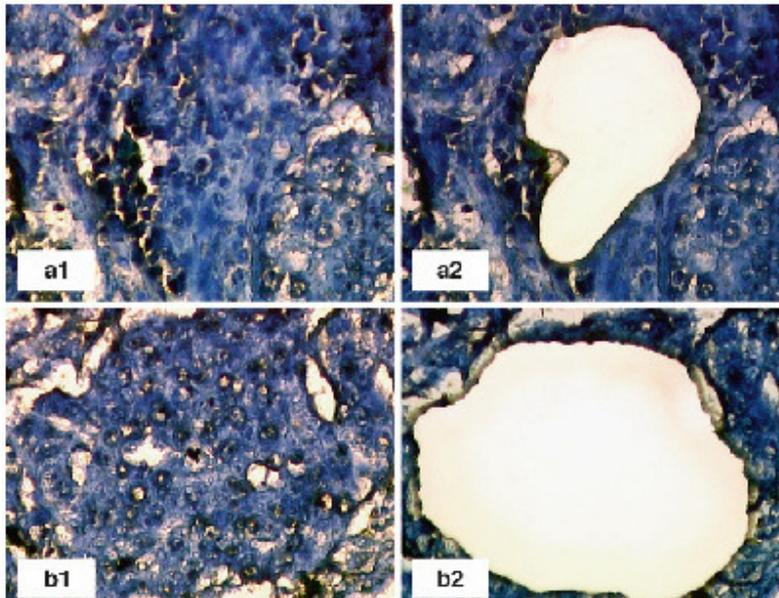
## **2.2.2 Nachweis Allelischer Imbalancen**

### **2.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **2.2.2.1.1 Manuelle Dissektion maligner Brustgewebszellen**

Der eigentlichen DNA-Isolierung voran ging der Versuch möglichst reines Tumorgewebe zu gewinnen. Dementsprechend wurden von Gefriergewebeblöcken mit einem Kryotom 6-8 µm messende Gewebepreparate geschnitten und auf positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) überführt, um diese nach einer kurzen Trocknung anschließend mit Toluidinblau/Methylenblau zu färben. Somit konnte der Tumorgehalt des Gewebeschnittes unter einem Durchlichtmikroskop (Hund Wetzlar) bestimmt werden. Lag der Tumorgehalt über 80 %, so wurde das gesamte Gewebestück verwendet. Bei einer geringeren Tumorzellausbeute schloss sich eine manuelle Dissektion der Tumorzellen an. Hierbei wurden die Gefriergewebeblöcke auf 10 µm geschnitten und wiederum mit Toluidinblau/Methylenblau gefärbt. Diese Färbung gewährleistet eine Differenzierung der Tumorzellen vom umliegenden benignen Gewebe ohne die Qualität der Nukleinsäuren zu beeinflussen. Unter mikroskopischer Sicht wurden entartete Zellen auffindig gemacht und

sorgfältig mit einer sterilen Injektionsnadel (Braun, Melsungen) manuell dissektiert und sofortig in Puffer ATL (QIAmp Micro Kit, Quiagen) überführt, so dass sich die eigentliche DNA-Isolation anschließen konnte.



**Abbildung 2.4 Mikrodissektion von invasiven Mammakarzinom-Zellarealen.** Gewebeschnitte vor Laser-capture-Mikrodissektion jeweils links im Bild (a1, b1), sowie nach Mikrodissektion rechts im Bild (a2, b2). Modifiziert nach Decarlo et al., Springer 2011 [179].

#### 2.2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Tumorzellen

Für die anschließende Isolation der Tumor-DNA wurde das „QIAmp Tissue Kits“ der Firma Qiagen verwendet. Das Tumorgewebe beziehungsweise die manuell dissektierten Tumorzellen wurden nach Entnahme sofortig in Puffer ATL überführt und bei Raumtemperatur aquilibriert. Als essentieller Schritt der Isolation ist die nachfolgende Zugabe von 20 µl Proteinase K anzusehen. Hierbei handelt es sich um eine Subtilisin-verwandte Serinprotease, welche die Histone oder Histon-ähnlichen Proteine der DNA bei langer Inkubation vollständig aufbrechen kann. Dementsprechend wurde nach Zugabe der Proteinase K im Überschuss die Probe gut vermischt und bei 56 °C für 2 Tage im Wasserbad (GFL-Inkubator) aufbewahrt. Im Anschluss daran wurden 200 µl des AL-Lysis-Puffers hinzupipettiert und im Vortex für 15 sek gut durchgemengt. Zur Fällung der DNA wurden der Probe 200 µl Ethanol hinzugefügt, diese wiederum 15 sek gevortext und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Lysat vorsichtig auf eine mit Silikatfilter versehene Säule gegeben und daraufhin bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das

Collection tube mit dem sich darin befindlichen Durchfluss wurde verworfen. Ebenso die Sammel tubes nach 2 Waschschritten mit je 500 µl AW1 beziehungsweise AW2 bei ebenfalls 1-minütiger Zentrifugation bei 8000 rpm. Um die Waschpuffer gründlich aus der Säule zu entfernen und die Membran vollständig zu trocknen, schloß sich eine Leerzentrifugation bei 14000 rpm für 3 min an. Die Säule wurde dann auf ein neues Collection tube gestellt, um im letzten Schritt mittels Zugabe von 200 µl RNase freien Wassers und nochmaliger Zentrifugation die DNA aus der Säule herauszulösen. In gleicher Weise wurde nach Verwendung eines neuen Collection tubes ein zweites Eluat gewonnen.

### **2.2.2.1.3 DNA-Isolierung aus Leukozyten**

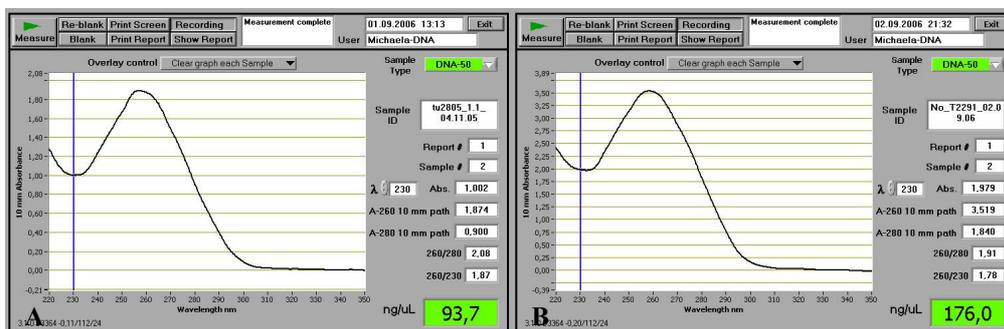
Bei dem weitaus größten Teil des Patientenkollektives standen Blutproben zur Verfügung, so dass eine DNA-Isolation aus Lymphozyten vorgenommen werden konnte. Unter Verwendung des QIAmp Blood Kits (Qiagen) wurde mit der Zugabe von 20 µl Protease zu dem von der Frauenklinik erhaltenen Leukozyten-Pellet begonnen. Dann wurden 200 µl PBS, wie auch 200 µl ATL-Puffer hinzupipettiert und der Ansatz für 15 sek gevortext. Durch die Protease und AI-Lysis Puffer findet eine enzymatische Lyse der Blutbestandteile statt. Dieser Reaktion wurde bei einer 3-stündigen Inkubation bei 56 °C und unter ständigem Vermengen im „Eppendorf Thermomixer Compact“ Raum gegeben. Nach einer anschließenden kurzen Zentrifugation schloß sich die Fällung mit 200 µl Ethanol an, woraufhin die Probe wiederum gevortext und zentrifugiert wurde. Entsprechend der DNA-Isolation aus Tumorzellen (siehe oben), wurde das Gemisch auf die Silikatsäule überführt, diese mit Auffangssäulen bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert und das Filtrat anschließend verworfen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte wiederum durch nacheinander stattfindende Waschschriffe mit AW1 und AW2, bis die DNA nach Zugabe von 200 µl RNase freien Wassers eluiert wurde.

### **2.2.2.2 Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäure**

Abhängig von der Ausgangsmenge und Art des Probenmaterials werden Nukleinsäure-Isolationen unterschiedlicher Konzentration und Reinheit gewonnen. Über photometrische Messung der eluierten DNA mit einem Absorptionsmaximum von A<sub>260</sub>nm/A<sub>280</sub>nm wird die Ausbeute der Nukleinsäuren-Isolation ermittelt. Zudem konnte die Reinheit der gewonnenen DNA durch den 260/280 nm Quotienten beurteilt werden. Die Qualitätsermittlung basiert darauf, dass die Absorption bei einer aus reiner DNA bestehenden Lösung bei 260 nm doppelt so hoch ist wie bei 280 nm. Bei Kontaminationen würden zusätzliche Absorptionen den

260/280 nm Quotienten dementsprechend verringern. Bei reiner DNA ist der 260/280 nm Quotient bei ungefähr 1,8 zu erwarten. Bei Werten von  $Q > 2,0$  muss von einer Verunreinigung durch RNA und Salze, sowie bei Werten von  $Q < 1,8$  von einer Verunreinigung durch Proteinreste oder degradierte DNA ausgegangen werden. In diesem Fall würde eine erneute DNA-Isolation angeschlossen werden.

Die Bestimmung der Quantität und Qualität der DNA erfolgte durch Messungen am Nanodrop ND-1000-Spektrophotometer (PeqLab) unter Verwendung von 1  $\mu\text{l}$  der DNA-Lösung (Abb. 2.5).



**Abbildung 2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA.** Links (Bild A) Messbericht der Tumor-DNA, rechts (Bild B) DNA-Konzentration von Vergleichs-DNA

Die aus den Eluaten gewonnenen reinen DNA-Proben wurden auf einen DNA-Gehalt von 5 ng/ $\mu\text{l}$  zu jeweils 20  $\mu\text{l}$  aliquotiert und bis zur Verwendung bei der Polymerase-Kettenreaktion bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.2.3 Ethanol-fällung

Die Ethanol-fällung diente der Aufreinigung und Konzentrierung der DNA. Die nukleinsäurehaltigen Lösungen wurden mit 2,5 Vol. reinem Ethanol (96 %ig) und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,4) vermischt, so dass die DNA während einer Inkubation bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  präzipitieren konnte. Anschließend wurde bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 70 %igen Ethanol versetzt, um es von Salzen sowie wasserlöslichen Substanzen zu reinigen. Nach dem Trocknen im Vakuumkonzentrator (Thermocycler) wurde die DNA in sterilem, entionisiertem Wasser oder TE (pH 7,4) gelöst.

### 2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Angelehnt an die *in vivo* ablaufenden Prinzipien der enzymatischen DNA-Replikation ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) inzwischen zu einer Standardmethode der Molekularbiologie geworden. Zur *in situ* Amplifikation spezifischer Nukleinsäurefragmente werden vielfach Zyklen unterschiedlicher Temperaturen durchlaufen. Dabei wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang initial bei 95 °C denaturiert, so dass nach Abkühlung von generell auf 50-68 °C ein Annealing der Primer erfolgen kann. Diese zwei kurzen einzelsträngigen Oligonukleotide, mit komplementären Sequenzen an den 5'Enden der Einzelstränge, hybridisieren mit der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Die Extension der Primer vom 3-OH-Ende bei 72 °C erfolgt mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Ampli Taq Gold, Roche Diagnostics) durch fortlaufende Addition von entsprechenden Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's). Bei mehrfacher Wiederholung dieser Zyklen (35-40x) ergibt sich eine exponentielle Zunahme des DNA-Fragmentes.

#### Standard-Ansatz:

1 µl	10x PCR Gold Buffer	
1 µl	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)
1 µl	dNTP	(8 mM, Roche Diagnostics)
0,5 µl	Primer <i>forward</i>	(10 pmol)
0,5 µl	Primer <i>reverse</i>	(10 pmol)
0,1 µl	DNA-Polymerase	(5 U/µl)
2 µl	DNA	
3,9 µl	Aqua dest.	

Die Erweiterung der oben beschriebenen PCR zu einer Multiplex-Mikrosatelliten-PCR erlaubte einen gleichzeitigen Einsatz mehrerer Primerpaare zur simultanen Amplifikation unterschiedlicher DNA-Fragmente.

#### 2.2.2.4.1 Primerauswahl

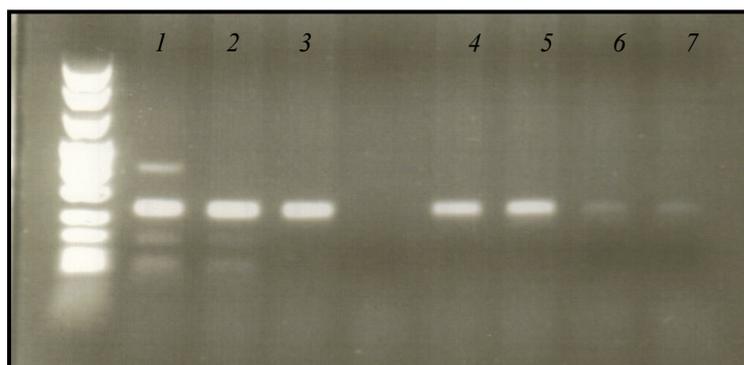
Es wurde auf dem Chromosom 11p15 ein Bereich von 11,5 MBp abgedeckt, um auf potentielle Tumorsuppressorgene zu screenen. Dabei wurden zunächst die Bindungseigenschaften aller Primer mit der Simulationssoftware Oligo geprüft. Entscheidend war hierbei, Primerdimere auszuschließen. Zudem wurden Primer mit möglichst hohem Heterozygotiegrad ausgewählt, um einen verwertbaren Informationsgehalt zu gewährleisten. Zur parallelen Analyse annähernd gleich langer DNA-Fragmente wurden verschiedene Fluoreszenzmarkierungen der Primer am 5'-Ende (FAM, TAM, HEX) verwendet.

Tabelle 2.6. Mikrosatellitenmarker und literaturbezogene Heterozygotiegrade.

Marker	Locus	PCR-Produkt	Typ	Heterozygotie (%)	Literatur
D11S2071	11p15.5	168 bp	CA-repeat	0,85	Karnik et al. (1998)
TH.PCR2	11p15.5	118 bp	Tetra-repeat	0,78	Regitnig et al. (2002)
D11S1338	11p15.4	255-265 bp	CA-repeat	0,74	Karnik et al. (1998)
D11S1323	11p15.4	201-207 bp	CA-repeat	0,46	Karnik et al. (1998)
D11S1999	11p15.4	116 bp	Tetra-repeat	0,83	Smeds et al. (2005)
D11S1349	11p15.3	260-280 bp	CA-repeat	0,84	Nakata et al. (1998)

#### 2.2.2.4.2 Gradienten-PCR zur Optimierung von Primern

Um die Temperaturoptima eigener Primer zu bestimmen, wurden zunächst Gradienten-PCRs vorangestellt, um vor der endgültigen Auswahl der Primer für die Analyse des Tumorkollektivs die PCR-Bedingungen zu optimieren. Bis zum Erreichen bestmöglicher Versuchsbedingungen wurde neben der Testung der Temperaturoptima, wie in Abbildung 2.6 ersichtlich, sowohl die Schmelztemperatur der Primer als auch die Verwendung von MgCl<sub>2</sub> und dNTP wiederholt mengenmäßig variiert. Konnte beispielsweise aufgrund von Primerdimeren kein brauchbares Ergebnis erzielt werden, wurde der Marker nicht verwendet. Prinzipiell erfolgte die Testung der Primer zunächst einzeln und anschließend in variierenden Kombinationen. Letztendlich wurden 6 von ursprünglich 8 Mikrosatellitenmarkern in die Studie aufgenommen, deren Temperaturoptima sich wie in Tabelle 3.2 dargestellt ergaben.



**Abbildung 2.6 Gradienten-PCR.** Primerdimere sind links im Bild (1,2) auf dem Agarosegel ersichtlich, zu schwache Signale dagegen finden sich auf den Positionen 6 und 7. Ausgewählt wurde die Temperatur, welche das Ergebnis auf Position 3 bestimmt hat. In der Mitte befindet sich die Negativprobe mit Wasser.

Tabelle 2.7. Temperaturoptima

Marker	Temperatur
D11S1349	57 °C
D11S1338	62 °C
D11S1323	57 °C
D11S2071	63 °C
D11S1999	63 °C
TH.PCR2	66 °C

Da stets einige Marker annähernd gleiche Temperaturen erforderten, konnten diese entsprechend ihrer Temperatur und Farbmarkierung kombiniert werden. Dies ergab für die PCR-Analysen gemeinsame Durchläufe der Mikrosatellitenmarker D11S1349 und D11S1323,

wie auch der Marker D11S2071 und D11S1999. Mithilfe dieser Multiplex-PCR konnten jeweils 2 Mikrosatellitenmarker kombiniert werden, wodurch eine Material- und Zeitersparnis gelang und identische Untersuchungsbedingungen gewährleistet wurden.

#### **2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

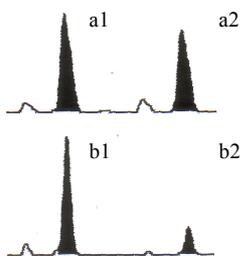
Die Agarose-Gelelektrophorese beruht auf der Migration geladener Substanzen in einem elektrischen Hochspannungsfeld und kam hier zur Reinheitsanalyse der PCR-Produkte zur Anwendung. Dazu wurden in horizontalen Elektrophoreseapparaturen und bei erwartungsgemäß kurzen Fragmentlängen 1,5 %ige Agarose-Gele verwendet. Die hohe Polymervernetzung dient dazu, die Migration größerer Moleküle zu drosseln und bewirkt, dass diese stärker retardiert werden. Zusätzlich werden Molekularsiebeffekte genutzt, um eine bessere Trennung zu gewährleisten. Zur Herstellung wurden 1,5 g Agarose abgewogen, in 98,5 ml 1x TBE gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Es wurde 2,5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben, das Gel in den passenden Gelschlitten gegossen und nach dem Erhärten in eine mit 1x TBE befüllte Elektrophorese-Apparatur eingesetzt. Die aufzutrennende Probe wurde zusammen mit 0,2 Volumen Ladepuffer in eine Geltasche geladen, wobei durch den Glycerinanteil des Ladepuffers die Dichte des Gemisches erhöht und dementsprechend das Beladen der Geltaschen erleichtert wurde. Da die Farbstoffe wie auch die DNA negativ geladen sind und zum Pluspol wandern, kann die Migration der geladenen Proben visuell verfolgt werden. Die DNA-Proben wurden bei einer Spannung von 90 V aufgetrennt und das in der DNA interkalierte Ethidiumbromid im Anschluss über einen Transluminator (Anregungswellenlänge 234 nm) sichtbar gemacht und gleichzeitig dokumentiert (Geldokumentationssystem Gene Genius 2, Syngene, Cambridge, UK). Ein Abschätzen der Molekulargröße der Auftrennungsprodukte wurde über einen in der ersten Geltasche hinzugefügten Molekulargewichtsmarkern (Roche bzw. Invitrogen) ermöglicht.

#### **2.2.2.6 Kapillarelektrophorese**

Zur exakten Größenbestimmung der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte auf ein bp genau dient die Kapillarelektrophorese an automatischen Sequenziergeräten, in diesem Fall am Genescan ABI Prism 3130, Genetic Analyser; Applied Biosystems. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen und Fragmentgrößen konnten jeweils drei PCR-Ansätze in einem Durchlauf kapillarelektrophoretisch untersucht werden. Die Marker D11S1349, D11S1323 und TH.PCR2 mit den entsprechenden Markierungen TAM, FAM und

HEX konnten miteinander kombiniert werden. Ebenso konnte eine simultane Analyse der Marker D11S1999, D11S1338 und D11S2071 mit den jeweiligen Markierungen TAM, FAM und HEX erfolgen.

Die Amplifikationsprodukte werden dabei in unbeschichteten Silikonkapillaren elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Vier-Farben-Argonlasers ausgelesen. Zuvor wurden jeweils 1 µl der drei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte zusammengefügt und mit HPLC-Wasser zu 1:10 verdünnt. Daraufhin wurde eine definierte Injektionslösung des Elektrophoresekalibrierungsstandards, bestehend aus 0,5 µl des verdünnten PCR-Mixes, 40 µl HiDi Formamid und 0,2 µl GenescanRox 500 zusammengestellt, kurz zentrifugiert und für 2 min. bei 94 °C denaturiert. Unter Verwendung des Polymers POP 6® (Performance Optimized Polymer) und des Genetic Analyzer Puffers® mit EDTA wurde die Injektionslösung auf eine Platte mit 96 wells pipettiert. Die einzelnen Proben wurden nach Kalibrierung des Gerätes automatisch in jeweils eine polymergefüllte Kapillare elektrokinetisch injiziert. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern unter der angelegten Spannung zum Ende der Kapillare, das der Anodenrichtung entspricht. Beim Durchlauf durch eine Küvette werden die Fragmente von dem Argonlaser erfasst und zur Fluoreszenz angeregt. Ein Spektrograph fängt das emittierte Licht auf, so dass das Fluoreszenzspektrum auf eine CCD-Kamera (*Charge Coupled Device*) fokussiert und im Anschluss digital verarbeitet werden kann. Dadurch wird ein Elektropherogramm generiert, welches die relative Fluoreszenz (vertikale Achse) und Zeit (horizontale Achse) für jedes einzelne DNA-Fragment in Beziehung setzt. Für jedes Fragmentprofil werden nachfolgend im Auto-Analyzer-Programm die Peakgrößen des Elektropherogramms weiterverarbeitet und hinsichtlich Höhe und Fläche graphisch und tabellarisch dargestellt (siehe Abbildung 2.7). Letztendlich wurden über die ermittelten Daten die Verhältnisse der Peakflächen und des Scores zur Ermittlung Allelischer Imbalancen errechnet.



**Abbildung 2.7 Analyse Allelischer Imbalancen.**

Darstellung der Allele von Leukozyten- oder Normal-DNA im oberen Bild (a1 und a2), im unteren Bild amplifizierte Allele aus Tumor-DNA (b1 und b2). Die x-Achse entspricht der Allelgröße in bp, die y-Achse der Allelhöhe gemessen an relativer Fluoreszenz.

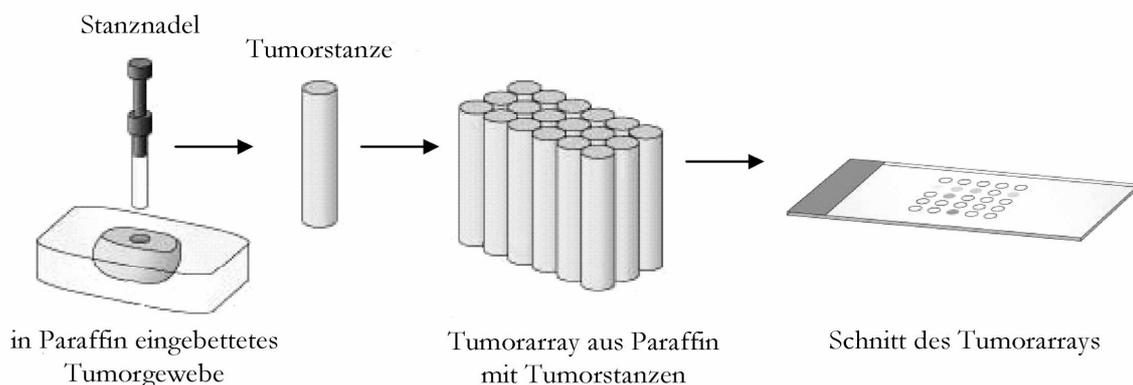
Ein Mikrosatellit wird in der vorliegenden Arbeit als positiv hinsichtlich allelischer Imbalancen betrachtet, wenn der Quotient für das längere Allel  $>1.8$  beträgt. Ein Auftreten

gleicher Allellängen bei homozygoten Merkmalsträgern ist dagegen für die Auswertung der Mikrosatellitenanalyse nicht informativ.

### 2.2.3 Herstellung eines Tissue Microarrays

Die Verwendung von Gewebearrays mit Hunderten von Tumorproben in einem Schnitt ermöglicht ein schnelles Screening auf DNA-, RNA- oder Proteinebene. Dabei steht diese Methode trotz Heterogenität einiger Tumoren und Extraktion kleinster Tumorareale der konventionellen Analyse einzelner Tumorschnitte hinsichtlich repräsentativer Ergebnisse nicht nach [155, 180].

Eine Zusammenstellung von Tumorgeweben des Patientenkollektivs und Festlegung der TMA-Struktur ging der Erstellung des Arrays voran. Mit freundlicher Unterstützung von Dr. Rana Issa (Institut für Pathologie, UKE), wurden auf den Paraffinblöcken entsprechenden HE-Schnitten die Tumorzellareale befundet und markiert, so dass repräsentative Tumorregionen eingegrenzt werden konnten. Aus diesem markierten Bereich wurden aus dem entsprechenden Paraffinblock zylindrische Gewebebiopsien entnommen und in einem Empfänger-Paraffinblock eingebettet. Zwischen den einzelnen Stanzen wurde ein Abstand von 1,75 mm beachtet. Nach diesem Prinzip wurde ein Kollektiv von 124 Patientenproben auf zwei Gewebearrays vereinigt und konnte zur simultanen Analyse verwendet werden (siehe Abbildung 2.8).



**Abbildung 2.8 Schematische Darstellung des Herstellungsverfahrens von Gewebearrays.**

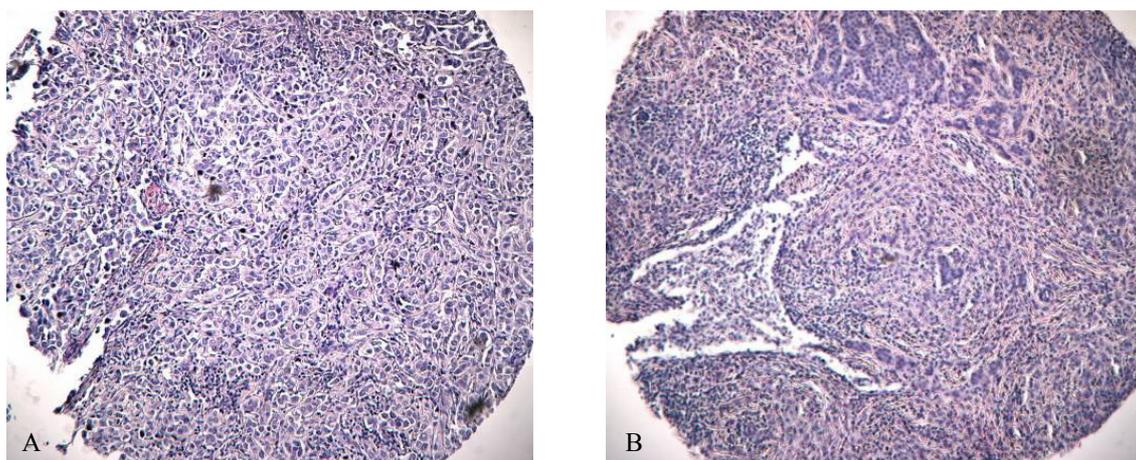
Für den *Tissue Microarray I* (TMAI) wurden jeweils zwei Tumorbezirke eines jeden Tumorgewebes beziehungsweise des entsprechenden Lymphknotengewebes mit einem Durchmesser von 1,0 mm ausgestanzt. Die Stanzen der Kontrollgewebe besaßen einen Durchmesser von 0,6 mm und umfassten maligne wie auch benigne Proben aus Kolon-,

Lungen-, Prostata-, Endometrium- und Uterusgeweben. Für den TMA II wurde aus jedem Tumor jeweils eine Stanze von 0,6 mm entnommen und auch die Kontrollen hatten einen Durchmesser von 0,6 mm.

Nach Fertigstellung der Multigewebeblöcke wurden diese für 30 min bei 37 °C inkubiert, um zu gewährleisten, dass sich das Paraffin der Stanzen mit dem Empfängerparaffin verbindet. Dadurch wird ein Abschwimmen der Stanzen beim Schneiden und anschließendem Färben verhindert. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Multigewebeblock bei 4 °C aufbewahrt. Vor dem Anfertigen von Schnitten wurde mit einem Objektträger ein gleichmäßiger Druck auf den TMA ausgeübt, so dass sich die Gewebebiopsien plan in einer Ebene befanden. Daraufhin wurden die Gewebearrays wie konventionelle Paraffinblöcke mit einem Schlittenmikrotom auf Schichtdicken von 3 µm geschnitten, dann auf einen Objektträger (Superfrost Plus) überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine weitere Inkubation bei 50 °C für 15 min fand unmittelbar vor der Weiterverwendung der Schnitte statt.

### 2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung am *Tissue Microarray*

Entsprechend des unter 2.2.1.3.1. beschriebenen Verfahrens der HE-Färbung von Tumorgewebeschnitten wurden Schnitte vom Multigewebeblock angefertigt und gefärbt, um die Tumorzelllast der einzelnen Proben zu beurteilen. Eine beispielhafte Anfärbung einer Tumorstanze wie auch eines Lymphknotenbezirks ist in der Abbildung 2.9 dargestellt.



**Abbildung 2.9 Hämatoxylin-Eosin-Anfärbung.** Übersicht von zwei Anschnitten aus dem Tissue Microarray. Links im Bild (A) ist ein invasiv duktales Mammakarzinom mit einer Tumorzelllast von ungefähr 90% zu sehen. Im rechten Bild (B) ist ein Lymphknoten mit metastasiertem Tumorbefall einschließlich Nekrosen dargestellt.

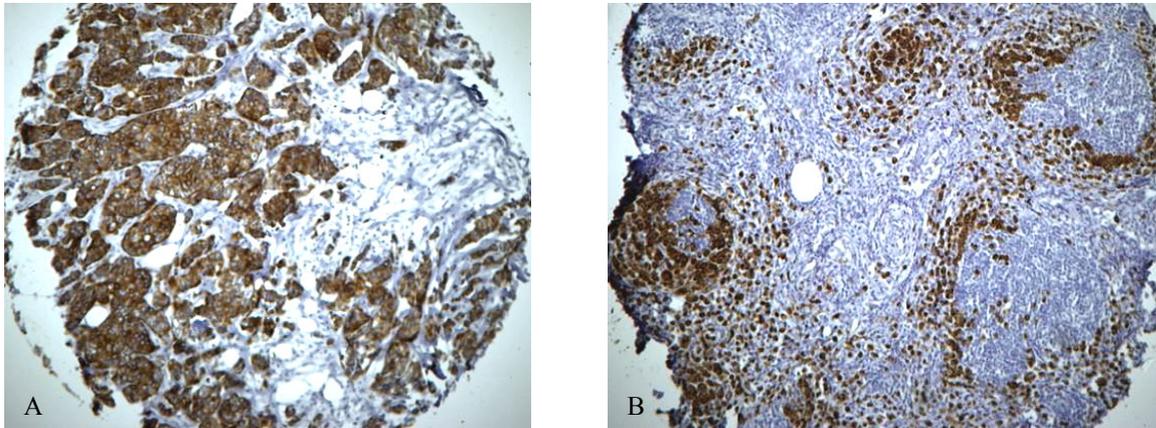
### 2.2.3.2 Immunhistochemische Färbungen

#### 2.2.3.2.1 A45-B/B3-Färbung zur Detektion zytokeratinpositiver Zellen

Als immunhistochemische Färbung erlaubt die Färbung mit dem Panzytokeratinantikörper A45-B/B3 (Mikromet, München) einen indirekten Nachweis zytokeratinexprimierender Zellen [181]. Von besonderer Bedeutung war diese Färbung als ein Nachweis von Mikrometastasen in Lymphknoten, da Lymphknoten mesodermalen Ursprunges sind und keine Zytokeratine exprimieren. Zytokeratine sind demzufolge genuin nicht in Lymphknoten vorzufinden. Zur Detektion dieser disseminierten Tumorzellen kam der monoklonale Anti-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 in Kombination mit der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode zum Einsatz.

Der immunhistochemische Nachweis erfolgte mithilfe des DAB Chromogen (5001) – Kits (DAKO<sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg). Vorab wurde der anzufärbende Schnitt entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.2.1.3.1. durch Xylolbäder entparaffiniert und anschließend für 2 min in TBST (1x) getränkt. In einer darauffolgenden Vorbehandlung in DAKO Citratpuffer (pH 7) für 5 min bei 125 °C im Schnellkochtopf (Druck > 20 psi) wurde der Schnitt erhitzt, um das Gewebe zu lockern und für die Antikörper besser zugänglich zu machen. Danach wurde der Objektträger auf Raumtemperatur abgekühlt und für 3 min in TBST (1x) getränkt. Eine Umrandung des Schnittes mit einem Fettstift auf dem Objektträger sollte eine gezielte Verteilung der zu verwendenden Reagenzien sicherstellen. Im folgenden Schritt wurde der hochaffine Mausantikörper in einer 1:400 verdünnten Lösung mit DAKO ChemMate Antibody Diluent hinzugegeben, um an den Zytokeratinstrukturen der Zellen zu binden. Diese Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer. Danach wurde die Lösung vom Objektträger abgetropft und dieser für 3 min in TBST (1x) getränkt, der Überstand verworfen und der Waschvorgang 2x wiederholt. Gegen den Primärantikörper wiederum fungierte in einem weiteren Schritt ein mit Biotin konjugierter zweiter Anti-Maus-Antikörper, der für 10 min auf den Schnitt gegeben wurde und bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert wurde. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls vom Schnitt abgetropft und der dreimalige Waschvorgang für jeweils 3 min in frischem TBST-Puffer (1x) wiederholt. Der daraufhin für 10 min unter gleichen Bedingungen hinzugegebene Tertiärantikörper ist ein Streptavidin-Meerschweinchen-Peroxidase-Komplex, wobei Streptavidin an das Biotin des Sekundärantikörpers koppelt. Nach einem erneuten, wie bereits beschriebenen, Waschvorgang in TBST-Puffer (1x) ist in bei einer anschließenden Zugabe von DAB (Diaminobenzidin und wasserstoffperoxidhaltiger Substratpuffer in einem Verhältnis von 1:50) letztendlich ein brauner Farbniederschlag entstanden. In destilliertem Wasser wurde der

Schnitt dann für 5 min gewässert und einer Gegenfärbung mit Hämalaun unterzogen. Hierbei wurde der Objektträger für 2 sek in Hämalaun geschwenkt und anschließend für 3 min unter fließendes Leitungswasser gestellt. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (2x 80 %, 2x 96 %, 2x 100 %) für jeweils 2 min und in 2 Xylobädern von jeweils 5 min wurde dem Schnitt Wasser entzogen, um ihn schlussendlich mit Eukitt einzudeckeln. Als Negativkontrolle dienten Schnitte mesenchymaler Gewebe ohne Applikation des Primärantikörpers. Mithilfe des Durchlichtmikroskops wurde die Zytokeratinfärbung hinsichtlich Intensität und Quantität ausgewertet. Eine Veranschaulichung der Tumordinfiltration eines Lymphknotens mit zytokeratinpositiven Zellen findet sich in der Abbildung 2.10 im rechten Bild.



**Abbildung 2.10 Anfärbung zytokeratinpositiver Strukturen.** Im linken Bild (A) ist ein Mammakarzinom als epitheliales Gewebe typischerweise braun angefärbt. Rechts im Bild (B) sind einen Lymphknoten infiltrierende Tumorzellen anhand der Braunfärbung erkennbar.

#### 2.2.3.2.2 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis *STIM1* exprimierender Zellen

Zur immunhistochemischen Detektion des *Stromal interactive molecule 1 (STIM1)*, einem potentiellen Wachstums-Tumorsuppressorgen auf 11p15.5, wurde eine 2-Schritt-Färbemethode mit hoher Sensitivität von Dako REAL™ EnVision™ Detection System (EnVision) (K5007) verwendet. Der Sekundärantikörper trägt in diesem Polymer bereits Enzymmoleküle, so dass ein Inkubationsschritt wegfällt, wie im Antikörperbindungsschema der Abbildung 2.11 ersichtlich ist.

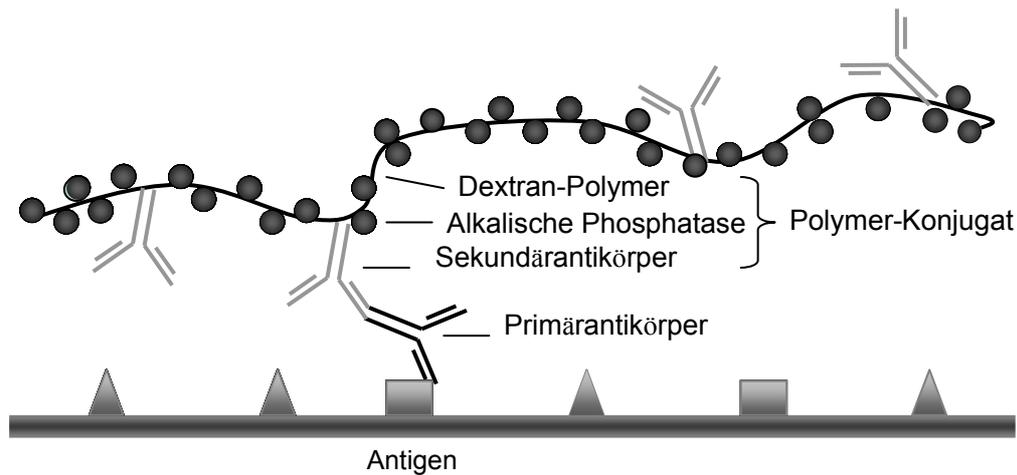
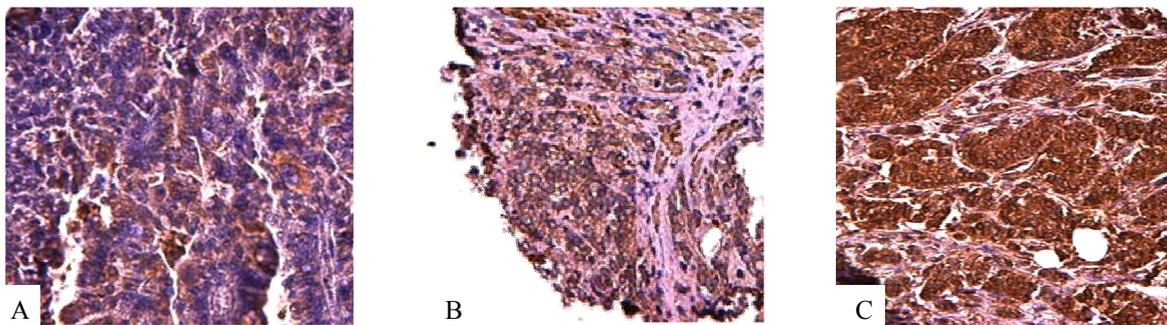


Abbildung 2.11 Antikörperbindungsschema

Vorab wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung bei 56 °C für 20 min inkubiert, um sie daraufhin einer Entparaffinierungsreihe zu unterziehen. Bei Raumtemperatur wurden diese dann 3-malig 5 min in Xylol gebadet, wie auch jeweils 2-malig in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %) hydriert. Anschließend fand eine Waschung für 2 min in TBST-Puffer statt. Danach wurden die Schnitte im DAKO Citratpuffer bei 125 °C für 5 min im Drucktopf vorbehandelt. Nach Abkühlen der Objektträger wurden die Schnitte 3 min in TBST gewaschen und nachdem der Gewebeschnitt mit einem Fettstift umrandet wurde, fand eine Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min statt. Dabei wurde der Primärantikörper in einer Konzentration von 1:100 in DAKO ChemMateAntibody Diluent zu 100 µl pro Schnitt hinzugegeben. Im Anschluss daran erfolgte eine 3-malige Waschung der Objektträger für jeweils 3 min in TBST und daraufhin eine 10-minütige Inkubation mit dem enzymgekoppelten Sekundärantikörper. Die 3-malige Waschung in TBST wurde wiederholt, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren. Im nächsten Schritt wurde für 10 min DAB in einem Verhältnis von 1:50 (Diaminobenzidin und wasserstoffperoxidhaltiger Substratpuffer) auf den Schnitt gegeben, was zu einer kontrastreichen Braunfärbung am Ort des Zielantigens führt. Nach einem wässern in destilliertem Wasser für 5 min erfolgte zur Gegenfärbung ein kurzes Schwenken in Hämalaun, um eine nukleäre Blaufärbung zu erreichen. Zur Beseitigung der überschüssigen Farblösung wurden die Objektträger dann für 3 min unter fließendem Wasser gespült, bis das ablaufende Wasser farblos war. Um den Schnitten wiederum Wasser zu entziehen, wurden diese jeweils 2-malig für 2 min einer aufsteigenden Ethanolreihe (80 %, 96 %, 100 %) unterzogen. Nach einer 2-maligen Behandlung mit Xylol für jeweils 5 min wurden die Schnitte letztendlich mit Eukitt eingedeckelt.

Die Evaluierung der Stim1-Expression erfolgte nach den Kriterien einer vorliegenden membranösen Anfärbung, welche genuin in zahlreichen Körperzellen vorhanden ist und für eine physiologische Expressionsdichte steht, oder einer auch cytoplasmatisch vorhandenen Anfärbung als Zeichen der Überexpression. Bei fehlender Anfärbung der Zellmembran und des Cytoplasmas ist von einer Unterexpression auszugehen, welches durch den Verlust des potentiellen Tumorsuppressorgens *STIMI* bedingt sein kann. Zusätzlich erfolgte eine Einteilung der *STIMI*-Anfärbung in schwache, mittlere und starke Signalintensitäten. Verschiedene Signalintensitäten der *STIMI*-Anfärbung sind in der Abbildung 2.12 dargestellt. Diese wurden über eine Auswertung mit dem Lichtmikroskop ermittelt und dienen der Korrelation von Verlusten des Tumorsuppressorgens in nicht angefärbten Tumorbezirken mit dementsprechend negativer Expression.



**Abbildung 2.12 Signalintensitäten der *STIMI*-Anfärbung.** Links (A) findet sich keine Anfärbung der Tumorzellgruppen. Die mittige Abbildung (B) lässt die für *STIMI* typische Membranfärbung erkennen. Das rechte Bild (C) zeigt eine starke Signalintensität der *STIMI* exprimierenden Tumorzellen.

## 2.2.4 Statistische Methoden

### 2.2.4.1 Chi-square und Fisher's Exact Test

Der Chi-square und der Fisher's Exact Test wurden verwendet, um die Häufigkeit von genomischen Aberrationen in 11p mit klinischen und histopathologischen Parametern in Beziehung zu setzen. Dabei kam das Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für PC (Version 11 für Windows) zur Anwendung.

### 2.2.4.2 Multivariate Analyse

Mit dem Programm SPSS wurden die signifikanten Parameter in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell auf ihre Unabhängigkeit überprüft. Bei p-Werten von kleiner als 0,05 kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer statistischen Signifikanz beider Merkmale ausgegangen werden.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand eines Kollektivs von 34 Mammakarzinompatientinnen allelische Imbalancen (AI) auf dem kurzen Arm von Chromosom 11p untersucht. Diese genomischen Ungleichgewichte können anhand differierender Allellängen detektiert werden und weisen auf chromosomale Verluste oder auch Gewinne hin. Die AI-Muster wurden nachfolgend in Korrelation zu einem Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und weiteren prognostischen Faktoren gesetzt. Anhand der Ergebnisse wäre im Idealfall eine Eingrenzung eines chromosomalen Abschnittes und die Bestimmung eines oder mehrerer spezifischer Gene denkbar.

In der zweiten Analyse wurde eine häufig deletierte Region auf 11p eingegrenzt und ein dort codiertes Tumorsuppressorgen unter Verwendung eines 125 Mammakarzinomproben umfassenden Gewebearrays auf seine Expression hin untersucht.

#### 3.1 Knochenmarkbefall und Lymphknotenstatus in Korrelation zu klinischen und pathologischen Befunden

Der Nachweis von ins Knochenmark disseminierter Tumorzellen erfolgte wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben unter Verwendung von Knochenmark-Aspiraten mithilfe einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und einer darauffolgenden immunhistochemischen Färbung auf Einzelzellebene. Die disseminierten Tumorzellen wurden nach Kopplung an den monoklonalen Antikörper A45-B/B3, welcher gegen ein gemeinsames Epitop verschiedener Zytokeratine gerichtet ist, gefärbt und anschließend unter Verwendung eines automatisierten Scanners (ACIS) nachgewiesen [103]. Als knochenmarkpositiv (KM-positiv) wurden Primärtumore von Patientinnen mit mindestens einer *DTC* im Knochenmark gewertet, wobei Patientinnen ohne nachweisbare *DTC* als KM-negativ betrachtet wurden.

In die Studie flossen aus gezielt gewählten Kollektiven 34 KM-Aspirate ein, so dass 16 KM-positive und 18 KM-negative Proben vorlagen. Zwischen dem Knochenmarkstatus und der Tumorgröße wurden signifikante Korrelationen errechnet. Keine signifikanten Werte dagegen ergaben sich nach Relation des KM-Status mit dem pT-Stadium und dem Grading, ebenso

wenig nach Korrelationen mit dem Alter der Patientinnen, deren Menopausenstatus sowie der Hormonrezeptorsensibilität der Tumoren (siehe Tab. 3.1).

Zur Beurteilung des Lymphknotenbefalls wurden den Mammakarzinompatientinnen bei tastbarem Befund perioperativ Lymphknoten entnommen. Bei kleineren Tumoren ist eine selektive Entnahme und Analyse des ersten vom Tumor drainierten und über Technetium und/oder Patentblau markierten Wächterlymphknotens (*Sentinel, SNL*) in der Regel ausreichend. Ein mikroskopisch erkennbarer Lymphknotenbefall fand sich bei dem vorliegenden Patientenkollektiv jedoch in lediglich drei Fällen. In Abhängigkeit vom Knochenmark- und Lymphknotenstatus wurden die Patientinnen dementsprechend in KM-negative (18), KM-positive (16), LK-negative (31) und LK-positive (3) Gruppen eingeteilt.

Signifikante positive Korrelationen bestanden zwischen dem LK-Status und dem pT-Stadium, dem Grading wie auch der Tumorgöße und dem Hormonrezeptorstatus (siehe Tab. 3.1). Dagegen ergaben Korrelationen von LK-Status mit der Histologie, dem Alter und Menopausenstatus sowie dem Status von *HER2* und dem Auftreten von Rezidiven keine signifikanten Ergebnisse.

Tab. 3.1 Korrelationen von KM- und LK-Status mit klinisch-pathologischen Befunden

	<i>KM-Status</i>			<i>LK-Status</i>		
	negativ (n)	positiv (n)	p-Wert <sup>φ</sup>	negativ (n)	positiv (n)	p-Wert <sup>φ</sup>
<b>Kollektiv</b>	53% (18)	47% (16)		91% (31)	9% (3)	
<b>pT-Stadium</b>			0,221			<b>0,003</b>
pT1	69% (9)	31% (4)		100% (13)	0	
pT2	45% (9)	55% (11)		90% (18)	20% (2)	
pT3	0	100% (1)		0	100% (1)	
<b>Differenzierungsgrad</b>			0,601			<b>0,049</b>
Grad 1	50 % (1)	50 % (1)		100% (2)	0	
Grad 2	60% (12)	40% (8)		100% (20)	0	
Grad 3	42% (5)	58% (7)		75% (9)	25% (3)	
<b>Tumorgröße</b>			<b>0,042</b>			<b>0,041</b>
< Median	68% (13)	32% (6)		100% (19)	0	
> Median	33% (5)	67% (10)		80% (12)	20% (3)	
<b>Erkrankungsalter</b>			0,968			0,107
< Median	53% (10)	47% (9)		84% (16)	16% (3)	
> Median	53 % (8)	47% (7)		100% (15)	0	
<b>Menopausenstatus<sup>υ</sup></b>			0,237			0,983
praemenopausal	67% (2)	33% (1)		3	0	
perimenopausal	100% (3)	0		2	0	
postmenopausal	50% (13)	50% (13)		25	1	
<b>Hormonrezeptorstatus</b>			0,282			<b>0,001</b>
negativ	0	100% (1)		0	100% (1)	
positiv	55% (18)	45% (15)		94% (31)	6% (2)	
<b>HER2</b>			0,588			0,569
negativ	57% (13)	43% (10)		17	2	
positiv	45% (5)	55% (6)		4	1	

<sup>φ</sup> Berechnung des univariaten p-Werts unter Verwendung des Chi-Square-Tests nach Pearson

<sup>υ</sup> Menopausenstatus fehlt bei einem Patienten

Da alle LK-positiven Patientinnen auch KM-positiv waren, ergaben sich nach Kopplung des KM- und LK-Status (doppelpositive Patientinnen) in Korrelation zum pT-Stadium und Grading wie auch zur Tumorgröße und dem Hormonrezeptorstatus hochsignifikante Werte.

### 3.2 Nachweis allelischer Imbalancen (AI) an Mammakarzinomen

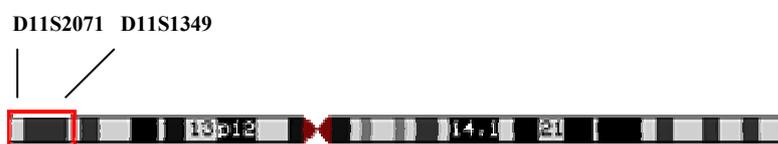
Unter Verwendung auf Chromosom 11p befindlichen sechs Mikrosatellitenmarkern wurde in der vorliegenden Arbeit anhand einer Analyse allelischer Imbalancen (AI) ein Kollektiv von 34 Mammakarzinompatientinnen untersucht.

Beim Vergleich der Tumor-DNA mit der DNA normaler Zellen desselben Patienten können sich allelische Imbalancen seitens der Tumor-DNA zeigen (siehe Kap. 1.3.1). Geht im Bereich eines Mikrosatellitenmarkers im Rahmen einer Deletion genetisches Material verloren, so kann sich dies durch einen Verlust, beziehungsweise eine signifikante Reduktion

eines in der normalen Vergleichs-DNA vorhandenen Fragmentes äußern. Daneben können ebenso Amplifikationen als Folge genetischer Alterationen auftreten, welche sich auch in einer Veränderung der Fragmentverhältnisse äußern. Demzufolge kann auf der Basis einer detektierten allelischen Imbalance weder auf einen Verlust noch einen Gewinn genetischen Materials geschlossen werden. Da die hier untersuchte chromosomale Region jedoch in zahlreichen Studien im Detail und mit weiterführenden Methoden untersucht wurde, kann davon ausgegangen werden, dass vordergründig Deletionen detektiert werden.

Wird mithilfe eines Sets von Mikrosatelliten eine chromosomale Region in regelmäßigen Abständen untersucht, kann festgestellt werden, ob ein chromosomaler Materialverlust oder -gewinn stattgefunden hat. Das über die AI-Analyse eingrenzbare Intervall genetischer Veränderungen ist bedeutend kleiner als eine mit der CGH feststellbare Alterationen und eignet sich dementsprechend zum Eingrenzen wahrscheinlicher Kandidatengene.

Die 6 verwendeten Mikrosatellitenmarker umspannen eine Region von 11,5 Megabasen auf Chromosom 11p. Der dem Telomer am nächsten gelegene Marker ist D11S2071 mit einem Abstand von 23,6 Kilobasen zum Chromosomenende. Der verwendete Marker, welcher sich am weitesten vom Telomer entfernt befindet, ist D11S1349, sein Abstand zum Telomer beträgt 11,71 Megabasen. Eine schematische Darstellung des auf Chromosom 11p15.5-11p15.3 feinkartierten Bereiches einschließlich der flankierenden Mikrosatellitenmarker findet sich in Abb. 3.1. Zur Einsparung kostbaren Patientenmaterials, Reduktion der Arbeitsschritte und weiterhin zur Gewährleistung identischer Untersuchungsbedingungen wurden Multiplex-Mikrosatelliten-PCRs erstellt, um mehrere Primerpaare simultan zu untersuchen (Kap.2.2.2.4).



**Abbildung 3.1 Chromosom 11.** Der Zielbereich 11p15.5-11p15.3 codiert etliche für die Kanzerogenese relevante Tumorsuppressorgene.

### 3.2.1 Einfluss des Referenzmaterials

Da in der vorliegenden Studie zwei unterschiedliche Referenztypen zur Analyse herangezogen wurden, war eine vergleichende Untersuchung notwendig um festzustellen, ob die Wahl des Referenzmaterials Einfluss auf die Ergebnisse hat. Prinzipiell ist im Rahmen der Tumorigenese anzunehmen, dass den Tumor umgebendes Normalgewebe eventuell bereits

von chromosomalen Aberrationen betroffen und Allelungleichgewichte dementsprechend seltener nachweisbar sind.

Die Normal-DNA der 34 Patientinnen, welche der vergleichenden Analyse mit der Tumor-DNA diente, wurde zum einen aus Leukozyten (n=9) gewonnen oder aus außerhalb des Tumors befindlichen normalen Brustepithelzellen (n=25) extrahiert. Eine Auflistung der Fälle mit allelischen Imbalancen unter Berücksichtigung des Referenzmaterials ist in Tab 3.2 ersichtlich.

**Tab. 3.2 Übersicht der Gewebeentitäten, anhand derer allelische Imbalancen ermittelt wurden.**

<i>Tumor</i>	<i>Resultat</i>	<i>Referenzmaterial</i>
1	AI	Normalgewebe
2	AI	Normalgewebe
3	AI	Normalgewebe
4	AI	Normalgewebe
5	AI	Normalgewebe
6	AI	Normalgewebe
7	AI	Normalgewebe
8	AI	Normalgewebe
9	AI	Leukozyten
10	AI	Leukozyten
<b>11</b>	AI	Normalgewebe & Leukozyten

Letztendlich ist eine verhältnismäßig ähnliche Nachweisrate von Allelverlusten beider Gewebeatitäten, nämlich von 36 % unter Verwendung von Normal-DNA im Vergleich zum Gesamtkollektiv und von 33 % mittels Leukozyten-DNA, von Bedeutung. Dementsprechend ist von keinem Einfluss des Referenzmaterials auf die Resultate auszugehen. Dies wird untermauert durch identische Nachweise von signifikant hohen AI-Werten bei einer Patientin, deren DNA aus Leukozyten und Normalgewebe simultan analysiert wurden (Tab.3.3).

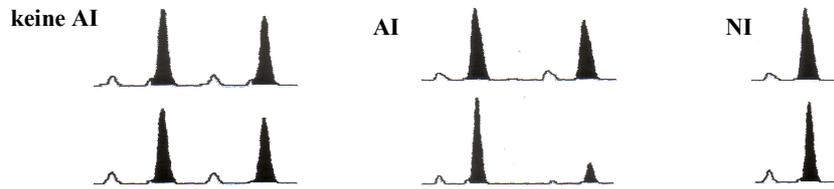
**Tab. 3.3 Gegenüberstellung der AI-Analysewerte verschiedener Probenarten derselben Patientin.**

<i>Tumor-ID</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>TH.PCR2</i>	<i>D11S1338</i>	<i>D11S1349</i>
5412	Leukozyten	<b>6,61</b>	<b>7,58</b>	<b>6,31</b>
	Normalgewebe	<b>3,29</b>	nd <sup>φ</sup>	<b>6,92</b>

<sup>φ</sup> nicht definiert

Zur Ermittlung der in Tabelle 3.3 aufgelisteten AI-Scores wurde das Auto-Analyzer-Programm des Genescan ABI Prism 310 (siehe Kapitel 2.2.2.6.) verwendet, welches nach kapillarelektrophoretischer DNA-Auftrennung die Allelflächen bestimmt. Der Nachweis von

allelischen Imbalancen erfolgt automatisch in tabellarischer und graphischer (siehe Abb. 3.2) Form und basiert auf dem Größenverhältnis der Allele der Normal-DNA geteilt durch das Größenverhältnis der Tumorprobe.



**Abb. 3.2** Graphische Darstellung der Peakgrößen der Ergebnisse einer Patientin ohne allelische Imbalancen (AI) (links), einer Patientin mit AI (mittig), sowie einer Patientin mit homozygotem Chromosomensatz und dementsprechend nicht informativem Ergebnis (rechts).

Da in der vorliegenden Arbeit tumoröse Gewebe mit einem Anteil maligner Zellen ab 80 % verwendet wurden oder bei weniger entarteten Proben eine manuelle Dissektion von Tumorzellen erfolgte, wurde zur Berechnung der allelischen Imbalancen ein Grenzwert von 1,8 festgelegt. Damit wurden alle Tumorproben mit einem Allelverhältnis von 1,8 oder darüber nach Vergleich mit dem normalen Allelverhältnis als Fälle mit genomischen Imbalancen (AI) definiert.

### 3.2.2 Heterozygotiegrad des Gesamtkollektivs

Für die AI-Analyse war der Heterozygotiegrad der Mikrosatellitenmarker von besonderer Bedeutung, um einen ausreichenden Informationsgewinn zu gewährleisten. Die Untersuchung des Heterozygotiegrades ergab im Hinblick auf das Gesamtkollektiv bei den Markern D11S1349 und D11S2071 einen Anteil von 97-100 %. Unter Verwendung der Marker D11S1999, D11S1338 und TH.PCR2 ergaben sich zu 70-82 % heterozygote Ergebnisse. Den weitaus geringsten Anteil heterozygoter Merkmalsträger wies der Marker D11S1323 mit 47,1 % auf (siehe Abb. 3.3). Der Anteil heterozygoter Merkmalsträger dieser Studie zeigte größtenteils vergleichbare Ergebnisse zu der in der NCBI-Datenbank sowie der Geneton genetic maps gegebenen Verteilung.

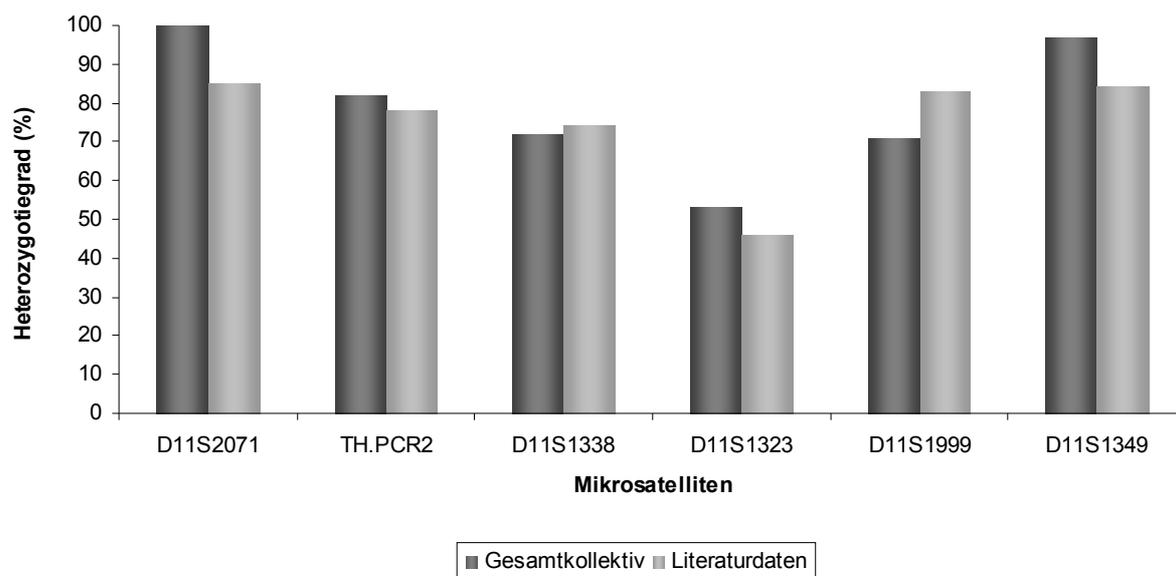
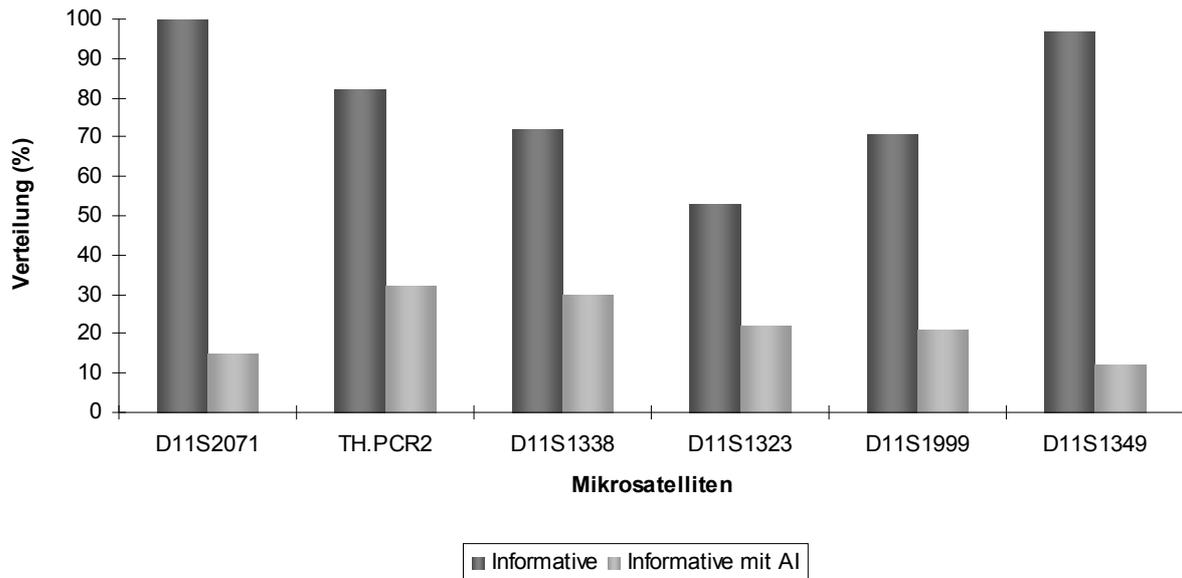


Abb. 3.3 Heterozygotiegrad des Patientenkollektivs.

In Tabelle 3.4 und Abbildung 3.4 ist die Häufigkeit allelischer Imbalancen in Bezug auf das Informationspotential beziehungsweise den Heterozygotiegrad der einzelnen Marker im Gesamtkollektiv der 34 Mammakarzinompatientinnen dargestellt. Homozygote Merkmalsträger wurden als nicht informativ gekennzeichnet.

**Tabelle 3.4. Auftreten von Allelischen Imbalancen der 6 polymorphen Mikrosatellitenmarker.**  
Darstellung der absoluten Anzahl der Patientinnen des Gesamtkollektivs

Primer	D11S2071 11p15.5	TH.PCR2 11p15.5	D11S1338 11p15.5	D11S1323 11p15.4	D11S1999 11p15.4	D11S1349 11p15.3
<b>Informative</b>	33 (100%)	28 (82%)	23 (72%)	18 (53%)	24 (71%)	31 (97%)
<b>Informative mit AI</b>	5 (15%)	9 (32%)	7 (30%)	4 (22%)	5 (21%)	4 (13%)
<b>Informative ohne AI</b>	28 (85%)	19 (68%)	16 (70%)	14 (78%)	19 (79%)	27 (87%)
<b>nicht Informative</b>	0	6 (18%)	9 (28%)	16 (47%)	9 (27%)	1 (3%)
$\Sigma$	33	34	32	34	33	32



**Abb. 3.4 Häufigkeitsverteilung allelischer Imbalancen.** Allelische Imbalancen und Heterozygotiegrad der polymorphen Mikrosatellitenmarker für 34 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom.

Im Allgemeinen stellt sich bei allen polymorphen Mikrosatellitenmarkern eine prozentual deutlich höhere Verteilung der heterozygoten Patientinnen ohne AI im Vergleich zu den heterozygoten Fällen mit AI dar. Insgesamt ergibt sich eine AI-Rate zwischen 13 und 32 % der informativen Fälle. Die niedrigste AI-Nachweisrate trat beim Mikrosatellitenmarker D11S1349 und der häufigste Nachweis von AI unter Verwendung von TH.PCR2 auf.

### 3.2.3 Häufigkeit allelischer Imbalancen

Es erfolgte eine Einteilung der analysierten Werte in eine Gruppe mit Auftreten allelischer Imbalancen und eine Gruppe ohne Vorhandensein von AI, eine Gegenüberstellung der Ergebnisse ist in den Tabellen 3.5 und 3.6 ersichtlich. Es zeigte sich, dass bei allelischen Imbalancen durchgängig hohe Differenzen hinsichtlich der Allellängen vorlagen, am ehesten als Verlust eines Allels zu deuten (MW 3,01, Wertebereich 1,9-6,1). Bei der Gruppe ohne Auftreten allelischer Imbalancen zeigten sich dagegen eindeutige Allelverhältnisse um einen Mittelwert<sup>1</sup> von 1,16.

<sup>1</sup> Der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) errechnet sich aus der Summe aller x-Werte dividiert durch die Anzahl aller x-Werte:  

$$\bar{x} = 1/n(x_1+x_2+\dots+x_n)$$

Tab. 3.5. Gruppe ohne allelische Imbalancen

<i>Tumor- ID</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>AI-Status</i>
1604	1,1	negativ
1774	1,1	negativ
1874	1,5	negativ
1895	1,2	negativ
3740	1,2	negativ
3882	1,1	negativ
1795	1,1	negativ
1854	1,2	negativ
1920	1,1	negativ
1955	1,0	negativ
2025	1,1	negativ
2119	1,1	negativ
2130	1,1	negativ
2245	1,1	negativ
2290	1,1	negativ
2516	1,1	negativ
2717	1,1	negativ
2805	1,1	negativ
3504	1,2	negativ
3642	1,1	negativ
4151	1,3	negativ
4765	1,3	negativ
1852	1,3	negativ
<b>Mittelwert AI</b>	<b>1,16</b>	
Standardabweichung <sup>2</sup>	0,11	

Tab. 3.6. Gruppe mit allelischen Imbalancen

<i>Tumor- ID</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>AI-Status</i>
1710	3,1	positiv
2091	2,6	positiv
2684	2,3	positiv
1844	3,4	positiv
2438	2,7	positiv
5312	2,8	positiv
5372	2,3	positiv
2166	3,7	positiv
2597	2,2	positiv
2382	1,9	positiv
5412	6,1	positiv
<b>Mittelwert AI</b>	<b>3,01</b>	
Standardabweichung	1,16	

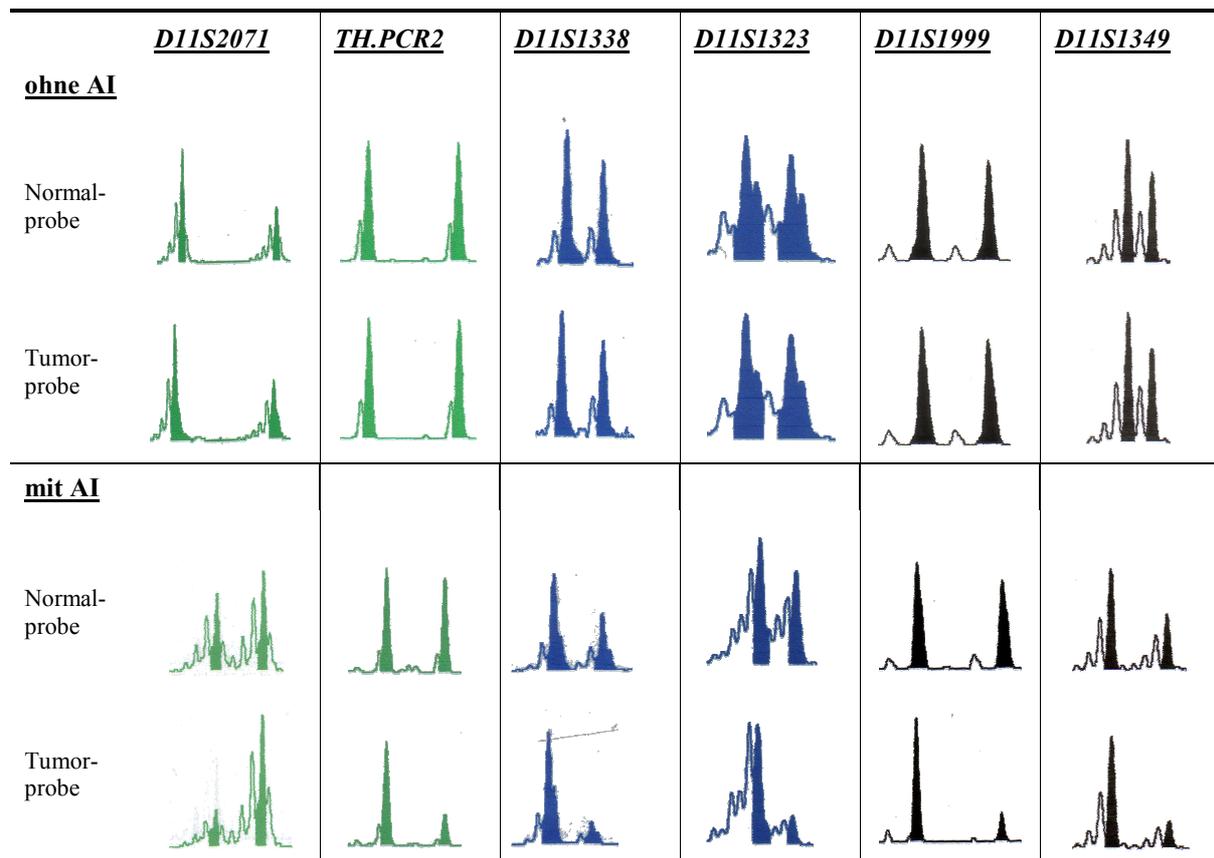
In der vorliegenden Arbeit konnten in 11 von 34 Fällen (32,4 %) allelische Imbalancen auf Chromosom 11p nachgewiesen werden. Dabei wurden pro Mikrosatellitenmarker zwischen 4 und 9 Tumoren mit LOH gefunden. Der sich auf 11p15.5 befindliche Tetranukleotidmarker TH.PCR2 wies mit 32 % die höchste AI-Rate auf, wohingegen sich beim Dinukleotidmarker

<sup>2</sup> Die Standardabweichung ( $s^2$ ) als Streuungsmaß beschreibt die Größe des zufälligen Meßfehlers [182].

$$s = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

D11S1349 (11p15.3) mit 12,9 % das niedrigste Aufkommen von allelischen Imbalancen darstellte.

Im folgenden Abschnitt findet sich eine exemplarische Veranschaulichung der einzelnen Mikrosatellitenmarker und der jeweiligen Allelverluste nach Analyse im Genetic Analyser (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5 Grafische Darstellung der Mikrosatellitenmarker.** In den oberen Abbildungen sind tumorfreie DNA-Proben heterozygoter Merkmalsträgerinnen unter Verwendung der entsprechenden Mikrosatellitenmarker dargestellt. Im unteren Bereich befinden sich Abbildungen der entsprechenden Tumor-DNA der jeweiligen Patientin. Im jeweils oberen Bild weist die Patientin keine AI auf, im unteren Bereich dagegen ist bei einer anderen Patientin eine signifikante allelische Imbalance zu erkennen.

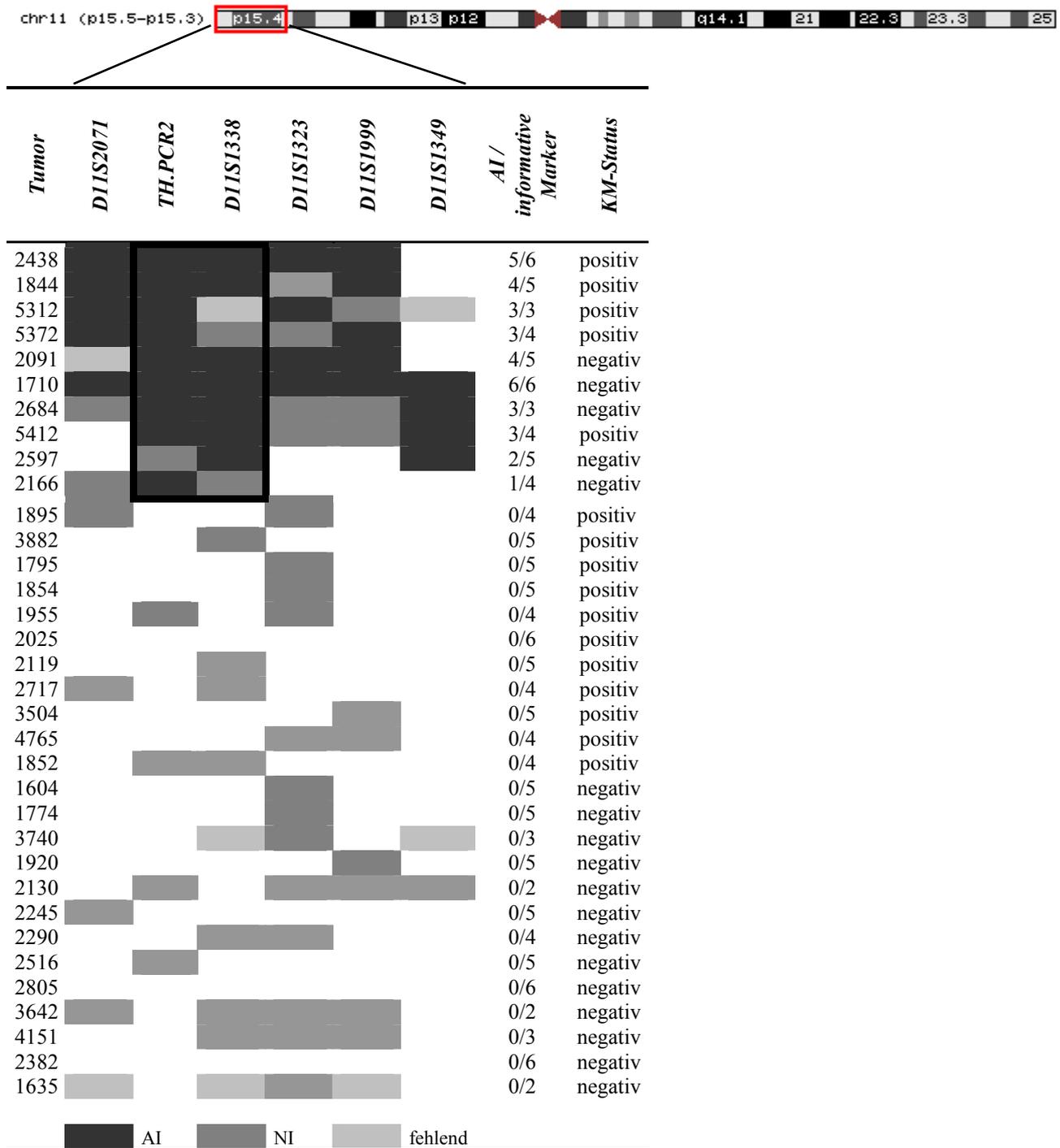
Der Dinukleotidmarker D11S2071 ist der auf Chromosom 11p15.5 dem Telomer am nächsten gelegene Marker und zeichnete sich in der vorliegenden Arbeit durch einen 100 %igen Heterozygotiegrad aus. Bezugnehmend auf Tabelle 3.4 konnten unter den informativen Ergebnissen bei 5 der 33 Tumore (15,2 %) allelische Imbalancen nachgewiesen werden. Mit dem auf Chromosom 11p15.5 befindlichen Tetranukleotidmarker TH.PCR2 wurden in 9 von 28 informativen Fällen (32,2 %) AI nachgewiesen und somit die höchste Nachweisrate unter den verwendeten polymorphen Mikrosatellitenmarkern ermittelt. Weiterhin traten bei dem auf Chromosom 11p15.4 lokalisierten Dinukleotidmarker D11S1338 bei 7 von 23 Tumoren

allelische Imbalancen auf (30,4 %). D11S1323 wies als Dinukleotidmarker mit dem verhältnismäßig geringsten Heterozygotiegrad (52,9%) und Lokalisation auf 11p15.4 allelische Imbalancen in 4 von 18 Fällen (22,2 %) nach. Mithilfe von D11S1999 als weiterem Tetranukleotidmarker konnte in 5 von 24 Fällen (20,8 %) ein Allelverlust im chromosomalen Bereich 11p15.4 detektiert werden. Die insgesamt geringste AI-Frequenz wurden mit dem auf 11p15.3 nach centromer flankierenden Dinukleotidmarker D11S1349 mit 4 von 31 Fällen (12,9 %) nachgewiesen.

Unter Verwendung des Markers D11S2071 gelang in 4 Fällen ein kombinierter Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und allelischer Imbalancen seitens des Primärtumors. Übereinstimmungen mit KM-positiven Befunden und Fällen mit AI fanden sich bei TH.PCR2 in 5 der 9 Fälle. Unter den durch D11S1338 nachgewiesenen 7 Fällen allelischer Imbalancen wiesen 3 der Tumore ebenso einen positiven Knochenmarkbefund auf, beim Marker D11S1323 wiederum stimmten 2 der 4 AI-Fälle mit einem positiven Knochenmarkbefund überein. Beim Marker D11S1999 ergaben sich doppelpositive Werte hinsichtlich Knochenmarkbefall und dem AI-Auftreten sich bei 3 Patientinnen. Ein Aufeinandertreffen KM-positiver Befunde und gleichzeitiger Heterozygotieverluste ergab sich bei dem Dinukleotidmarker D11S1349 lediglich in einem Fall.

Ordnet man die Allelverluste einem, den Mikrosatellitenmarkern entsprechenden, chromosomalen Locus zu, so stellt sich eine Kernregion mit einer hohen Frequenz allelischer Imbalancen heraus. Von telomer nach centromer betrachtet ist der Bereich um den Mikrosatellitenmarker TH.PCR2 und D11S1338 am häufigsten von einem Heterozygotieverlust betroffen. Eine tabellarische Veranschaulichung der Mikrosatellitenmarker mit Bezug zur Lokalisation auf Chromosom 11p ist in Tab. 3.7 dargestellt.

Tab. 3.7 chromosomale Verteilung der Allelverluste



### 3.2.4 Allelische Imbalancen der 11p-Region in Korrelation zu klinischen und pathologischen Parametern

Unter Verwendung des Chi<sup>2</sup>-Testes ergab die Relation allelischer Imbalancen des Gesamtkollektivs (einschließlich nicht informativer Fälle) mit den prä- und postoperativ

erhobenen klinisch-pathologischen Befunden signifikante positive Korrelationen mit dem LK-Status der Patientinnen und dem Staging sowie Differenzierungsgrad der Tumoren (Tab. 3.8).

**Tab. 3.8 Korrelationen des AI-Auftretens im Gesamtkollektiv mit klinisch-pathologischen Parametern**

	<i>Allelische Imbalancen</i>		
	negativ (n)	positiv (n)	p-Wert <sup>φ</sup>
<b>Kollektiv</b>	68% (23)	32% (11)	
<b>Knochenmarkmetastasen</b>			
negativ	67% (12)	33% (6)	0,897
positiv	69% (11)	31% (5)	
<b>Lymphknotenstatus</b>			
negativ	74% (23)	26% (8)	<b>0,009</b>
positiv	0	100% (3)	
<b>pT-Stadium</b>			
pT1	92% (12)	8% (1)	<b>0,028</b>
pT2	55% (11)	45% (9)	
pT3	0	100% (1)	
<b>Differenzierungsgrad</b>			
Grad 1	100% (2)	0	<b>0,049</b>
Grad 2	80% (16)	20% (4)	
Grad 3	42% (5)	58% (7)	
<b>Tumorgröße</b>			
< Median	79% (15)	21% (4)	0,113
> Median	53% (8)	47% (7)	
<b>Erkrankungsalter</b>			
< Median	63% (12)	37% (7)	0,529
> Median	73% (11)	27% (4)	
<b>Hormonrezeptorstatus</b>			
negativ	0	100% (1)	0,142
positiv	70% (23)	30% (10)	

<sup>φ</sup> Berechnung des univariaten p-Werts unter Verwendung des Chi-Square-Tests nach Pearson

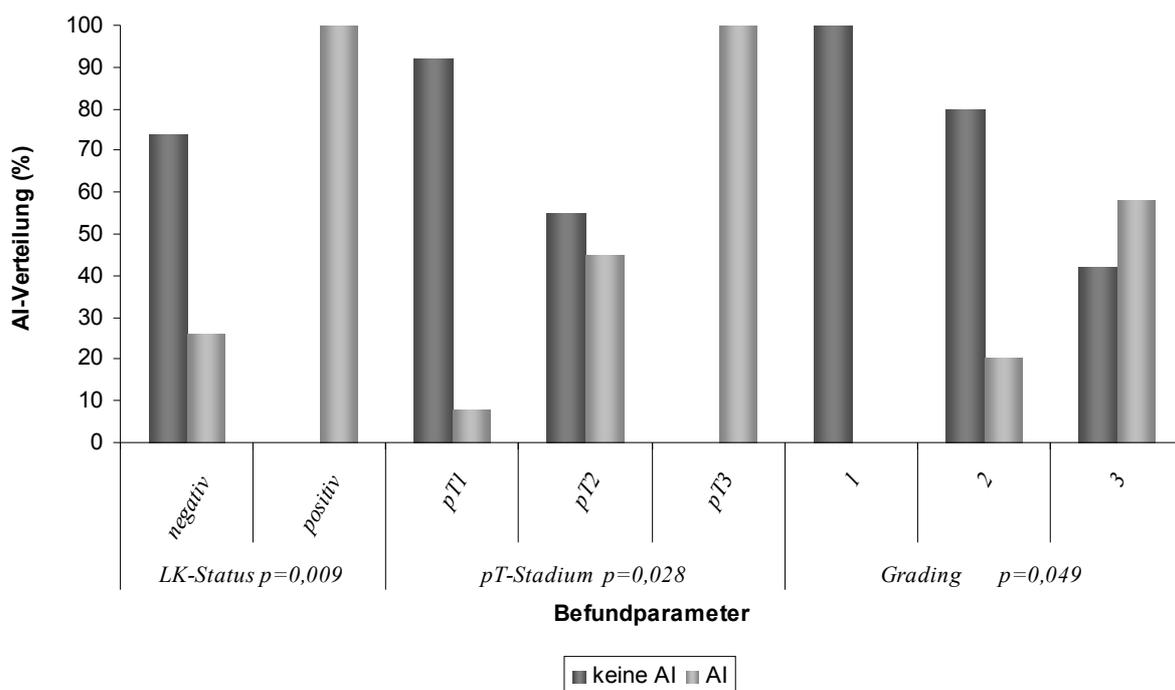
Deutliche Unterschiede mit einem höher frequentiertem Aufkommen von allelischen Imbalancen und statistisch signifikanten Werten zeigten sich bei Korrelation mit dem LK-Status ( $p=0,009$ ) und dem pT-Stadium ( $p=0,028$ ). In beiden Fällen steigt das Aufkommen allelischer Imbalancen mit positivem LK-Status wie auch höherem pT-Stadium und demzufolge fortschreitendem Tumorprogress. Im Hinblick auf den LK-Status zeigt sich bei einem p-Wert von 0,009 eine eindeutige statistische Verteilung, wobei darauf hinzuweisen ist, dass in diese Studie lediglich 3 LK-positive Fälle zur Verfügung standen (siehe Tab. 3.8).

Bei Betrachtung der Anzahl allelischer Imbalancen wurde mit  $p=0,049$  ebenso ein statistischer Unterschied zum Grading ermittelt. Entsprechend der signifikanten Ergebnisse hinsichtlich des LK-Status und der pT-Stadien findet sich hier dieselbe Assoziationsrichtung:

unter den gut differenzierten Tumoren traten keine allelischen Imbalancen auf, wohingegen mit zunehmender Entdifferenzierung und dementsprechend höherem Malignitätsgrad die Fälle von AI proportional zunahmen. Auch hinsichtlich der Tumorgöße findet sich ein verhältnismäßig höheres Aufkommen von allelischen Imbalancen bei über dem Median liegenden Tumoren. Inverse Verteilungen finden sich bei dem Ersterkrankungsalter und Hormonrezeptorstatus. Allelische Imbalancen traten hier häufiger bei Patientinnen auf, deren Ersterkrankungsalter unter dem Median lagen, also bei prämenopausalen Patientinnen und bei negativem Hormonrezeptorstatus, beides Kennzeichen höherer Malignität. Besonders Tumore mit negativem Hormonrezeptorstatus sind durch die eingeschränkte Therapierbarkeit mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Auch hier ist jedoch darauf hinzuweisen, dass lediglich ein hormonrezeptornegativer Fall vorlag.

Die Alternativhypothese konnte letztendlich durch fehlende signifikante Ergebnisse nach Korrelation des Auftretens allelischer Imbalancen mit positiven KM-Befunden nicht bestätigt werden.

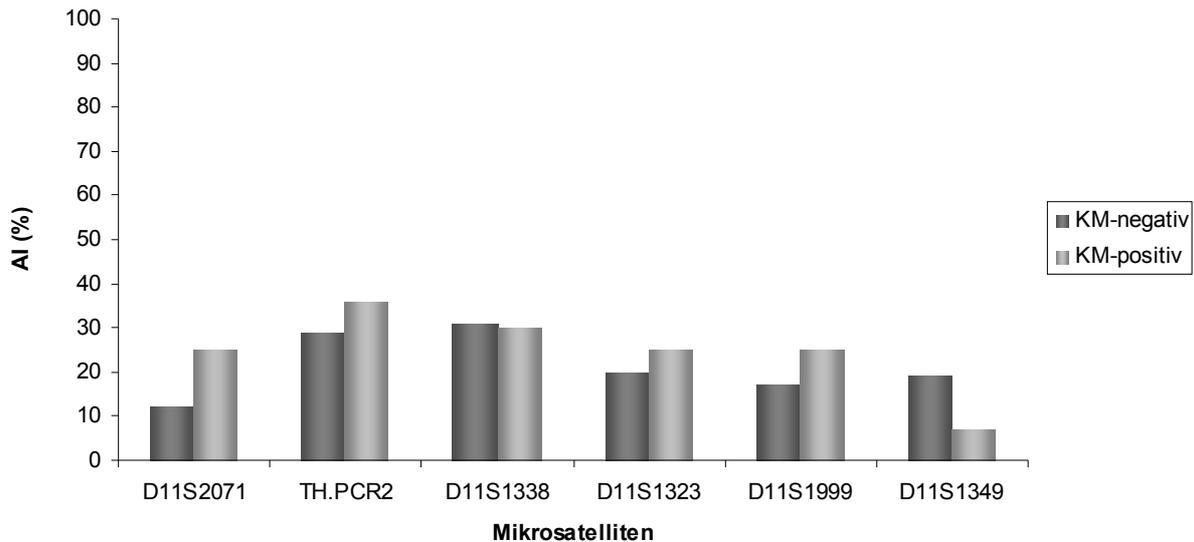
Eine Veranschaulichung der signifikanten Ergebnisse des Gesamtkollektives findet sich in Abb. 3.6, welche die Verteilung der allelischen Ungleichgewichte in Relation zum LK-Status, pT-Stadium und Grading darstellt.



**Abb. 3.6** Auftreten von AI im Gesamtkollektiv in Korrelation zu klinischen und pathologischen Befunden.

### 3.2.4.1 AI-Frequenz der einzelnen Mikrosatellitenmarker in Korrelation zum Knochenmarkstatus

Entsprechend der Aufteilung der Patientengruppe in ein KM-negatives und ein KM-positives Kollektiv wurden die einzelnen Mikrosatellitenmarker hinsichtlich ihrer Detektionsrate von AI in Relation zum KM-Status betrachtet (Abb. 3.7). Dabei erfolgte in der vorliegenden Analyse alleinig die Verwertung heterozygoter Merkmalsträger.



**Abb. 3.7** prozentuale Verteilung von AI der Mikrosatelliten in Korrelation zum KM-Status.

Mit einer Gesamtverteilung informativer Ergebnisse von n=33 für den Marker D11S2071, n=28 für TH.PCR2, n=23 für D11S1338, n=18 für D11S1323, n=24 für D11S1999 und n=31 für D11S1349.

Für die einzelnen Mikrosatellitenmarker wurden keine statistisch signifikanten Werte nach Korrelation der Anzahl der Fälle mit AI mit dem KM-Status ermittelt. Es zeigt sich für die Verteilung des Anteils an AI für den Marker D11S2071 ( $p=0,325$ ) jedoch ein höherer Anteil an allelischen Imbalancen in der KM-positiven Gruppe (2 KM-negative Fälle versus 4 KM-positiv Fälle). Die Marker TH.PCR2, D11S1999 und D11S1323 folgen diesem Trend mit geringeren Unterschieden. Für die restlichen Marker ergaben sich keine verwertbaren Unterschiede.

### 3.2.4.2 AI-Frequenz der einzelnen Mikrosatellitenmarker in Korrelation zu klinisch-pathologischen Befunden

Nachfolgend werden Graphiken dargestellt, in denen das Auftreten allelischer Imbalancen für jeden Mikrosatellitenmarker aufgeschlüsselt und mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern korreliert wurde (Abb. 3.8-3.13). Dies erfolgte unter Ausschluss des nicht informativen Patientenkollektivs, so dass sich eine Gesamtverteilung informativer Ergebnisse

von n=33 für den Marker D11S2071, n=28 für TH.PCR2, n=23 für D11S1338, n=18 für D11S1323, n=24 für D11S1999 und n=31 für D11S1349 ergab.

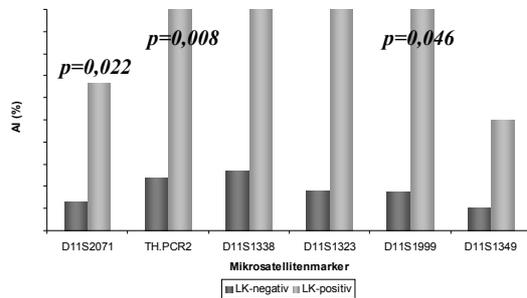


Abb. 3.8 Relation des Auftretens allelischer Imbalancen mit dem LK-Befund.

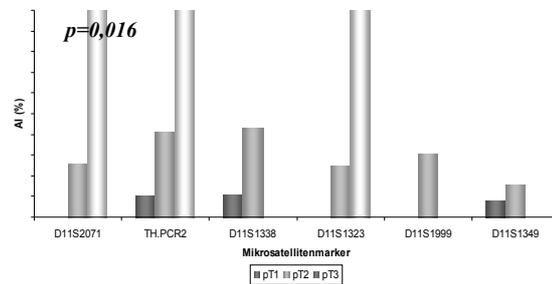


Abb. 3.9 Relation des Auftretens allelischer Imbalancen mit dem Tumor-Staging.

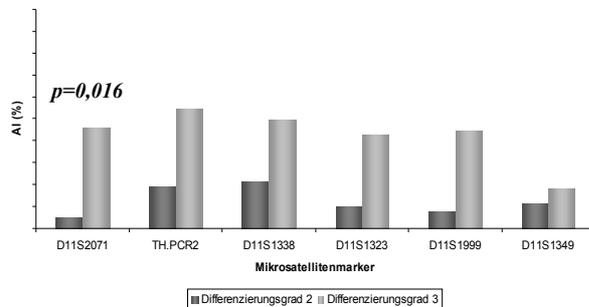


Abb. 3.10 Relation des Auftretens allelischer Imbalancen mit dem Differenzierungsgrad.

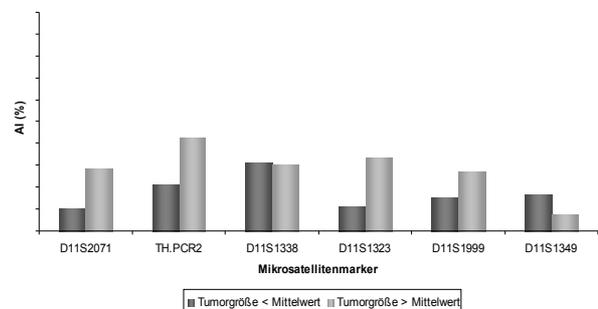


Abb. 3.11 Relation des Auftretens allelischer Imbalancen mit der Tumorgröße.

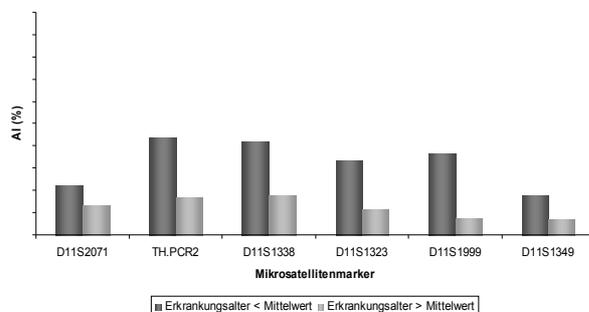


Abb. 3.12 Relation des Auftretens allelischer Imbalancen mit dem Erkrankungsalter.

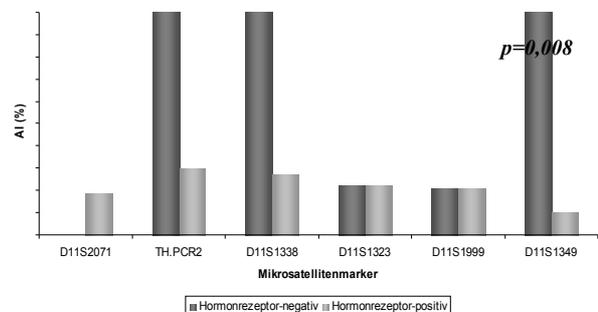


Abb. 3.13 Relation des Auftretens allelischer Imbalancen mit dem Hormonrezeptorbefund.

Bei Korrelation der AI-Frequenz mit dem LK-Status stellte sich ein statistisch signifikanter Befund insbesondere bei den Markern D11S2071 und TH.PCR2 heraus. Ebenso lagen bei D11S1999 signifikante Ergebnisse vor, wobei auch die übrigen Marker stets deutlich höhere AI-Aufkommen unter den LK-positiven Proben aufwiesen (siehe oben).

Die Korrelationen mit dem Staging und Differenzierungsgrad zeigten unter allen Mikrosatellitenmarkern denselben Trend eines häufigeren AI-Vorkommens in einer höheren Staging- und Gradingkategorie. Als hochsignifikant ergab sich alleinig der Marker D11S2071

mit einem p-Wert von jeweils 0,016 nach Korrelation mit dem Tumor-Staging und dem Grading.

Im Hinblick auf die Tumorgöße fanden sich wenige nennenswerte Unterschiede. Ähnliches gilt für die Relation der AI-Fälle mit dem Erkrankungsalter. Hier zeigt sich bei allen Markern eher der Trend zu einem häufigerem Auftreten allelischer Imbalancen bei Patientinnen mit unter dem Median auftretendem Erkrankungsbeginn (siehe oben).

Zu den Mammakarzinomen mit höherer Malignität und schlechterer Therapierbarkeit zählen die hormonnegativen Tumoren, so dass ein höher frequentiertes Auftreten allelischer Imbalancen zu erwarten wäre. In dieser Untersuchung folgten die Marker TH.PCR2, D11S1338 und D11S1349 diesem Trend, wobei eine deutliche Signifikanz lediglich bei D11S1349 ( $p=0,008$ ) anzutreffen war.

### 3.2.5 Vergleichende AI-Analysen von karzinomatösen Arealen und Bezirken mit Carcinoma *in situ*

Von 5 Patientinnen konnten im Tumorresektat sowohl Bereiche mit malignen Karzinomzellen als auch mit duktales Carcinoma *in situ* (DCIS) ausgemacht werden. Nach getrennter DNA-Isolation waren die Gewebe unterschiedlicher Malignitätsgrade einer AI-Analyse zugänglich und wurden vergleichend interpretiert (Tab. 3.9).

Tab. 3.9 AI-Analyse der Tumor- & DCIS-Proben

Tumor-ID	Zelltyp	D11S2071	TH.PCR2	D11S1338	D11S1323	D11S1999	D11S1349
1955	Tumor	1,05	NI	1,01	NI	1,01	1,01
1955	DCIS	1,05	NI	1,43	NI	1,09	1,17
2166	Tumor	NI*	3,73	NI	1,01	1,26	1,04
2166	DCIS	NI	3,45	NI	1,12	1,05	1,08
2516	Tumor	1,02	NI	1,07	1,17	1,15	1,15
2516	DCIS	1,04	NI	1,69	1,06	1,06	1,23
2717	Tumor	NI	1,04	NI	1,64	1,09	1,20
2717	DCIS	NI	1,04	NI	1,51	1,05	1,25
2805	Tumor	1,02	1,06	1,11	1,09	1,06	1,10
2805	DCIS	1,12	1,07	1,43	1,07	1,05	1,10

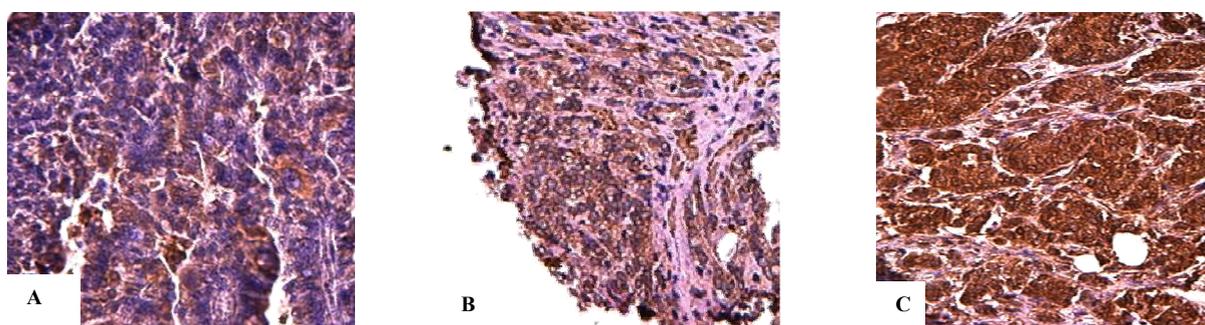
\* nicht informativ

Unter den Tumor- und DCIS-Proben ergaben sich einheitlich vergleichbare Analysewerte, darunter eine allelische Imbalance mit nahezu identischen Allelverhältnissen.

### 3.3 Expressionsanalyse des Kandidatengens *STIMI*

Das *Stromal interactive molecule 1 (STIMI)* gilt als potentiell Wachstums-Tumorsuppressorgen auf 11p15.5 und nachweislicher Relevanz hinsichtlich der Metastasierung bei Mäusen [162]. Da es sich als Phosphoprotein auf der Zelloberfläche befindet, kann die Expression über immunhistochemische Färbungen verfolgt werden. Ein Verlust dieses Wachstums-Tumorsuppressorgens würde dementsprechend durch eine schwache Signalintensität der Tumorzellen verglichen mit den Kontrollgeweben erkennbar werden. Eventuelle Zusammenhänge einer verminderten Expression von *STIMI* mit klinisch-pathologischen Parametern und mit dem Gesamtüberleben sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft werden.

Bei Verwendung der Tissue-Micro-Arrays konnten alle Patientengewebe materialschonend in einem Arbeitsschritt immunhistochemisch angefärbt und entsprechend der *STIMI*-Expression untersucht werden. Nach Ausschluss der nicht verwertbaren, gefalteten und abgeschwemmten Areale ergab dies ein Kollektiv von 90 Patienten, darunter befanden sich 24 Tumore mit positivem Knochenmarkbefund, wobei in 33 Fällen simultane Lymphknotengewebe vorhanden waren. Die *STIMI*-Intensität wurde entsprechend der Anfärbestärke in negativ, schwach und stark gruppiert. Bei nichtentartetem Brustdrüsengewebe würde physiologischerweise lediglich eine Membrananfärbung zur Darstellung kommen. Eine Überexpression ist desweiteren durch eine zusätzliche cytoplasmatische Anfärbung abgrenzbar. Zur Veranschaulichung der Färbeergebnisse dienen die nachfolgenden Ausschnitte (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12 Signalintensitäten der *STIMI*-Anfärbung.** In Abbildung A findet sich eine keine Anfärbung der Tumorzellgruppen. Die mittige Abbildung B lässt die für *STIMI* typische Membrananfärbung erkennen. Das rechte Bild C zeigt eine starke Signalintensität der *STIMI* exprimierenden Tumorzellen.

Eindeutig zu erkennen ist die signalstarke Braunfärbung des rechten Bildes. Derartig starke Signalintensitäten weisen eher auf eine Überexpression hin, wohingegen eine negative

Anfärbung, wie in der linken Abbildung dargestellt, den Verlust des Tumorsuppressorgens *STIMI* vermuten lässt.

### **3.3.1 *STIMI*-Expression in Korrelation zu Knochenmarkbefall und klinischen und pathologischen Befunden**

Die *STIMI*-Expressionen differenzieren im Folgenden die klinisch-pathologischen Parameter entsprechend ihrer immunhistochemischen Farbtintensität (negativ, mittel und stark positiv) (Tab. 3.10). Abweichende Fallzahlen sind auf fehlende Daten hinsichtlich der klinisch-pathologischen Befunde zurückzuführen. Unter den auswertbaren Gewebespots befanden sich 25 Fälle (28 %) mit einer negativen *STIMI*-Expression, 50 (56 %) besaßen eine schwache und 15 (17 %) eine starke Signalintensität. Die Anfärbestärke der Lymphknotenanschnitte und der Primärtumore differierte zum größten Teil, bei nicht simultaner Expression zeigte sich jedoch in nahezu allen Fällen eine verminderte Anfärbung der Tumorzellen im Lymphknoten im Vergleich zu den signalstärkeren Primärtumoren.

Tab. 3.10 Korrelationen von *STIMI*-Intensitäten und Prognoseparametern

	<i>STIMI</i> -Intensität (n)			p-Wert <sup>φ</sup>
	negativ	mittel	stark	
<b>Anzahl</b>	27,8% (25)	55,6% (50)	16,7% (15)	
<b>Knochenmarkstatus<sup>υ</sup></b>				
negativ	30,8% (20)	53,8% (35)	15,4% (10)	0,399
positiv	16,7% (4)	62,5% (15)	20,8% (5)	
<b>Lymphknotenstatus<sup>σ</sup></b>				
negativ	22,6% (12)	62,3% (33)	15,1% (8)	0,239
positiv	36,1% (13)	44,4% (16)	19,4% (7)	
<b>pT-Stadium</b>				
pT1	20,5% (8)	64,1% (25)	15,4% (6)	0,543
pT2	30,2% (13)	48,8% (21)	20,9% (9)	
pT3	50,0% (3)	50,0% (3)	0	
pT4	50,0% (1)	50,0% (1)	0	
<b>Differenzierungsgrad</b>				
Grad 1	14,3% (1)	57,1% (4)	28,6% (2)	0,84
Grad 2	29,5% (13)	56,8% (25)	13,6% (6)	
Grad 3	28,2% (11)	53,8% (21)	17,9% (7)	
<b>Tumorgroße</b>				
< Median	25,6% (11)	60,5% (26)	14,0% (6)	0,649
> Median	29,8% (14)	51,1% (24)	19,1% (9)	
<b>Erkrankungsalter</b>				
< Median	33,3% (15)	57,8% (26)	8,9% (4)	0,135
> Median	22,2% (10)	53,3% (24)	24,4% (11)	
<b>Menopausenstatus<sup>τ</sup></b>				
praemenopausal	25,0% (7)	67,9% (19)	7,1% (2)	0,425
perimenopausal	28,6% (2)	57,1% (4)	14,3% (1)	
postmenopausal	28,3% (15)	49,1% (26)	22,6% (12)	
<b>Hormonrezeptorstatus</b>				
negativ	33,3% (4)	58,3% (7)	8,3% (1)	0,687
positiv	26,9% (21)	55,1% (43)	17,9% (14)	
<b>HER2</b>				
negativ	28,4% (21)	59,5% (44)	12,2% (9)	<b>0,044</b>
positiv	25% (4)	37,5% (6)	37,5% (6)	

<sup>φ</sup> Berechnung des univariaten p-Werts unter Verwendung des Chi-Square-Tests nach Pearson

<sup>υ</sup> KM-Status fehlt bei einem Patienten

<sup>σ</sup> LK-Status fehlt bei einem Patienten

<sup>τ</sup> Menopausenstatus fehlt bei einem Patienten

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation des Metastasierungsverhaltens und der *STIMI*-Expression festgestellt. Ein Zusammenhang einer Tumorsuppression durch *STIMI* und dem Vorliegen einer Minimal invasiven Erkrankung kann dementsprechend nicht bestätigt werden. Negative *STIMI*-Expressionen traten bei lediglich 4 (17 %) Patienten mit tumorinfiltriertem Knochenmark auf, versus 20 (31 %) Patienten ohne Knochenmarkmikrometastasen. Eine mittlere Signalintensität von *STIMI* war bei positivem

Knochenmarkbefund mit 15 Fällen (63 %), wie auch negativem Status mit 35 Fällen (54 %) am häufigsten vertreten.

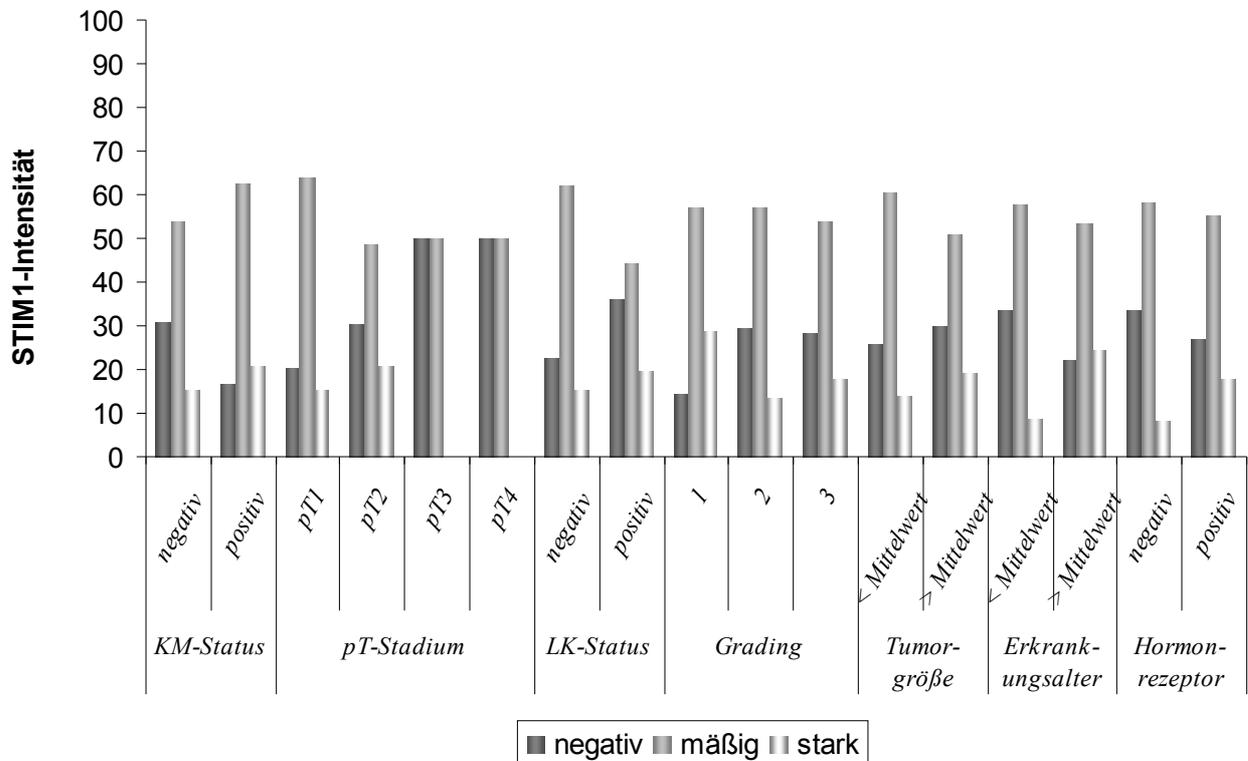
Signifikante Korrelationen der *STIMI*-Intensität ergaben sich mit dem *HER2*-Status, wobei eine erhöhte Expression (starke Signalintensität) bei *HER2*-positivem Status häufiger vorzufinden ist. Eine mittlere Signalintensität ist beim *HER2*-negativem wie auch -positivem Status am häufigsten vertreten, eine verminderte Expression ist wiederum annähernd gleichverteilt. Darüber hinaus fanden sich keine statistisch signifikanten Relationen der *STIMI*-Intensität mit den weiteren klinisch-pathologischen Befunden. Im Rahmen der Korrelationen der *STIMI*-Expression mit dem Lymphknotenbefund ergaben sich keine Nachweise einer signifikant differierenden *STIMI*-Expression. Bei den lymphknotenpositiven Befunden trat in 13 Fällen (36 %) im Vergleich zu 12 Fällen (23 %) der lymphknotennegativen Befunde ein Verlust der *STIMI*-Expression auf. Dahingegen zeigte sich eine mittelstarke Anfärbung weitaus häufiger unter den lymphknotennegativen Fällen mit 62 % als unter den lymphknotenpositiven Fällen mit 44 %.

Des Weiteren war eine mittlere Signalintensität von *STIMI* unter den Primärtumorstadien pT1 und pT2 am häufigsten nachzuweisen. Dennoch traten unter den lediglich 8 Tumoren der Stadien pT3/4 keine signalstarken Anfärbungen auf, sondern verteilten sich zu jeweils 50 % auf negative oder mittlere Signalintensitäten.

Interessanterweise lässt sich beim Differenzierungsstadium ein ansteigendes Auftreten von negativen *STIMI*-Signalen in den höheren Stadien beobachten. Von den 25 Fällen mit negativer Anfärbung ist 1 Fall (14 %) dem gut differenzierten Grad 1 zuzurechnen, wohingegen in 13 Fällen (30 %) dem Grad 2 und in 11 Fällen (28 %) dem schlecht differenzierten Grad 3. Mittelstarke Farbintensitäten sind dagegen nahezu gleich häufig mit Schwankungsbreiten von 54-57 % in allen drei Differenzierungsgraden vertreten. Eine starke Anfärbung fand sich im Gegensatz dazu mit 29 % eher beim Grad 1 als beim Grad 2 und 3 mit jeweils 14 % und 18 %.

Auch hinsichtlich der Tumorgröße, Erkrankungsalters und Menopausenstatus lässt sich kein Hinweis auf den Einfluss von *STIMI* auf die Tumoreigenschaften erkennen. Es ist lediglich im Hinblick auf den Hormonrezeptorstatus eine fehlende *STIMI*-Anfärbung in 33 % (4 Fälle) häufiger bei den aggressiveren Tumoren mit negativem Hormonrezeptor im Vergleich zu 21 Fällen (27 %) mit positivem Hormonrezeptor zu verzeichnen. Die Verteilungen verhalten sich hinsichtlich der starken Farbintensität mit 8 % (1 Fall) bei hormonrezeptornegativem Status und 18 % (14 Fälle) bei positivem Status invers.

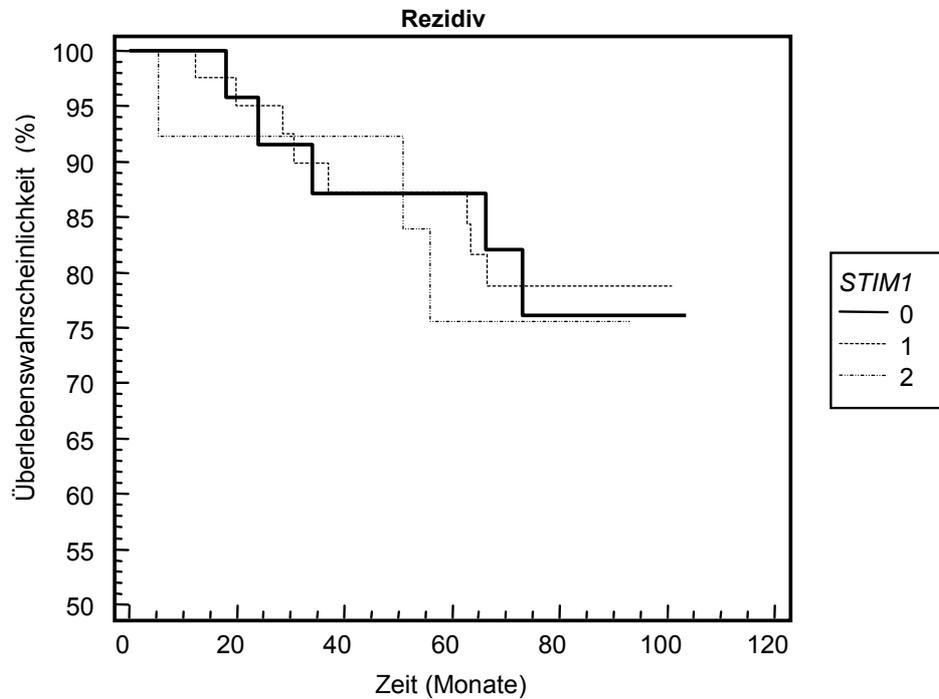
Zur graphischen Veranschaulichung dient die Abbildung 3.13, welche die *STIM1*-Intensität in Relation zu dem Knochenmarkbefund und klinisch-pathologischen Parametern setzt.



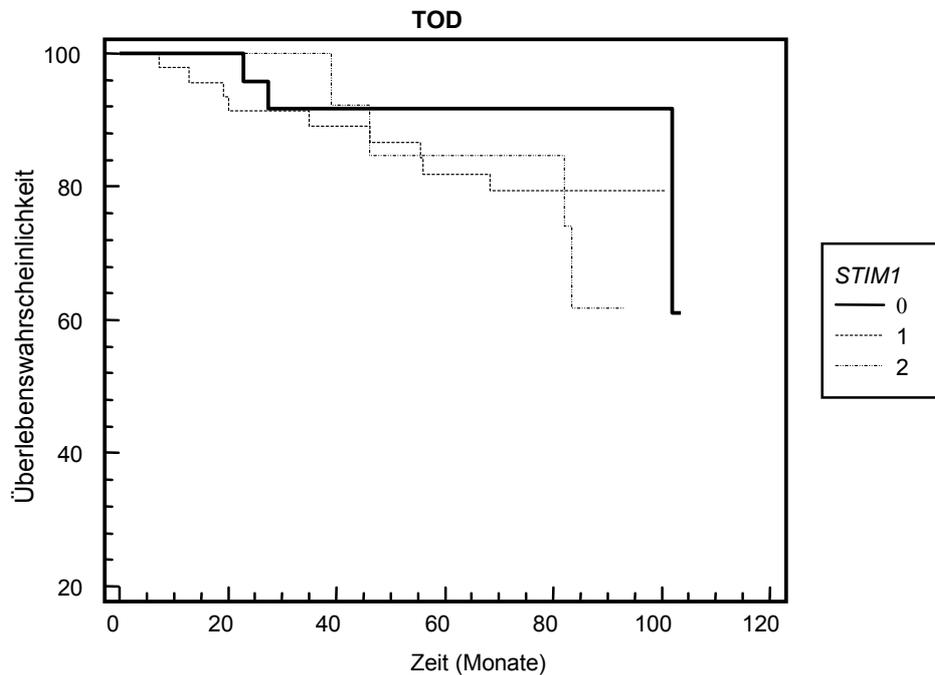
**Abb. 3.13 *STIM1*-Expression in Relation zum Knochenmarkstatus und klinisch-pathologischen Befunden.** Im Rahmen des Korrelationstests nach Pearson ergaben sich unter allen untersuchten Parametern keine statistisch signifikanten Werte.

### 3.3.2 Relation von *STIM1*-Expression und Überleben

Mithilfe der Regressionsanalyse nach Kaplan-Meier konnte überprüft werden, ob eine fehlende *STIM1*-Expression im Zusammenhang mit einer verminderten Überlebenszeit oder einem Rezidiv besteht. Durch Zusammenführen der vorhandenen Daten über Überlebensdauer und Rezidivfreiheit wurden Überlebens- und Rückfallkurven, wie in den Abbildungen 3.14 und 3.15 veranschaulicht, errechnet.



**Abb. 3.14 Rezidivfreiheit im Vergleich der *STIM1*-Expressionsmuster (n=79).** Unter Ausschluss der knochenmarkpositiven Patienten stellen die Überlebenskurven die unterschiedlichen rückfallfreien Zeiten hinsichtlich der *STIM1*-Expression gesondert dar. Eine fehlende *STIM1*-Expression (0) entspricht am ehesten dem Verlust des Tumorsuppressorgens. Die mittlere *STIM1*-Intensität (1) ist vergleichbar mit einer normalen Expression und die starke Intensität (2) am ehesten mit einer Überexpression.



**Abb. 3.15 Gesamtüberleben im Vergleich der *STIM1*-Expressionsmuster (n=86).** Darstellung des Gesamtüberlebens in Relation zur fehlenden *STIM1*-Expression (0), zur physiologischen (1) und gesteigerten (2) Expression.

Die rezidivfreie 2-Jahres-Überlebensrate beträgt für die fehlende *STIM1*-Expression 91,5 %, eine mittlere dagegen 95 % und die starke *STIM1*-Expression 92 %. Innerhalb der Patientengruppen mit der fehlenden und der mittleren *STIM1*-Expression haben 5 Jahre nach Diagnosestellung 87 % der Patienten kein Rezidiv entwickelt, lediglich 75,5 % überlebten rezidivfrei bei gleichzeitig vorhandener Überexpression von *STIM1*. Das gesamte Nachbeobachtungsintervall, zu welchem Informationen aus allen drei Patientengruppierungen vorlagen, erstreckte sich auf einen Zeitraum von insgesamt 90 Monaten. Am Ende der *Follow-up*-Untersuchungen nach dementsprechend 7,5 Jahren, trat bei 76 % der Patienten mit fehlender *STIM1*-Expression kein Rezidiv auf. In 83,5 % der Fälle mit mittlerer Ausprägung der *STIM1*-Intensität trat ebenfalls kein Rezidiv auf und in 75,5 % der Fälle in der Gruppe mit starken Expressionsmustern. Insgesamt lassen die beschriebenen Überlebenskurven keine Tendenz zu einer *STIM1*-Expression erkennen und sind nicht signifikant.

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens verstarben in der Gruppe mit negativer *STIM1*-Ausprägung 2 Jahre nach Diagnosestellung 4 % der Patienten, die Überlebenswahrscheinlichkeit betrug entsprechend 96 %. Im gleichen Beobachtungszeitraum

überlebten ungefähr 91 % der Patienten in der Gruppe mit mittlerer *STIMI*-Expression und ebenfalls 96 % bei gleichzeitig starker Expression. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug bei fehlender, mittlerer und starker Expression von *STIMI* jeweils 92 %, annähernd 82 % und 84 %. Am Endpunkt der Nachbeobachtungsphase wurde innerhalb der Gruppe mit negativer *STIMI*-Ausprägung eine 7,5-Jahres-Überlebensrate von circa 91 % ermittelt, dagegen überlebten 79 % der Patienten bei mittlerer Expressionsstärke und lediglich 62 % der Patienten bei starker Ausprägung von *STIMI*. Auch anhand dieser Daten stellte sich keine Signifikanz heraus.

Abschließend lässt sich feststellen, dass im Hinblick auf die ermittelten Werte dieser Studie ein Verlust des Tumorsuppressorgens *STIMI* in keiner Relation mit einer verminderten rezidivfreien Überlebenszeit oder mit dem Gesamtüberleben überhaupt steht.

## 4 Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Fragestellung, ob Allelungleichgewichte auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 bei Mammakarzinompatientinnen mit einer frühen Metastasierung ins Knochenmark korrelieren und sich als klinisch relevant und prognostisch wegweisend ergeben.

Obwohl Früherkennungsmaßnahmen und insbesondere stetig neue Fortschritte der Therapierichtlinien die Prognose des Mammakarzinoms wesentlich verbessert haben, bleibt Brustkrebs bei Frauen der westlichen Welt die am häufigsten diagnostizierte Krebsart und eine der häufigsten Todesursachen. Charakteristisch für das Mammakarzinom ist hierbei, dass vergleichsweise spät Rezidive auftreten können [98, 183].

Diese Spätrezidive stehen vermutlich im Zusammenhang mit einzeln metastasierten und im Knochenmark als präferiertem Homingorgan eingewanderten Tumorzellen [40, 95, 98, 112]. Durch ihren dormanten und dementsprechend nichtproliferierenden Zustand bieten derartige Tumorzellen der zytostatischen Therapie keinen Angriffspunkt und können für längere Zeit im Knochenmark überdauern. Diese Tumorresiduen scheinen kein spätes Ereignis in der Metastasen-kaskade des Mammakarzinoms darzustellen, sondern entwickeln sich vielmehr in einem sehr frühen Stadium der Tumourprogression [40, 86, 95, 98, 100, 183-185]. Dadurch liegt bei Diagnosestellung oftmals bereits eine minimale residuelle Krebserkrankung (MRD) vor, die die Entstehung von Metastasen im Knochenmark und anderen Organen begünstigt [39, 95].

Da die Krankheitsverläufe der Brustkrebserkrankten stark differieren, ist es von Bedeutung anhand prognostischer Faktoren hochmaligne Tumorentitäten von weniger malignen herauszufiltern und einer intensiven Therapie zuzuführen. Demgegenüber bietet dies die Möglichkeit bei Patientinnen mit geringem statistischem Risiko eines Rezidivs Übertherapien zu vermeiden und die Toxizität der Therapieregimes zu vermindern. Um derartige Unsicherheiten über eine bei Diagnosestellung bereits vorhandene Streuung von Krebszellen abzubauen, wären neben den etablierten Hauptprognosefaktoren zudem prognostische Parameter hilfreich, die einen metastatischen Phänotyp der Tumorzellen detektieren und eine individuelle Prognose zulassen.

Ein potentiell interessanter Marker der Mikrometastasierung wurde in dieser Studie eingehender untersucht, nachdem sich in vorangegangenen institutsinternen CGH-Analysen Verluste auf Chromosom 11p15 bei einer kleinen Population knochenmarkpositiver Brustkrebspatientinnen zeigten. Von besonderer Bedeutung ist, dass diese chromosomale

Region ein Domizil mehrerer Tumorsuppressorgene darstellt und als Imprinting-Region gilt (Kap. 1.2.1, 1.3.3).

Zur Untersuchung der allelischen Imbalancen im Detail und bei einer größeren Population wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Studienkollektiv von 34 Patientinnen hinsichtlich allelischer Imbalancen analysiert und ein chromosomaler Abschnitt von 11p15.3 bis 11p15.5 mithilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker feinkartiert. Im weiteren Verlauf wurde ein Tumorsuppressorgen dieses chromosomalen Abschnittes als mögliches Kandidatengen bestimmt und eine Mutationsanalyse auf Proteinebene mithilfe von Multigewebeblöcken (TMA) mit Tumorproben von 124 Mammakarzinompatientinnen angeschlossen.

#### **4.1 Methodischer Kontext**

Da der Großteil der Krebserkrankungen des Menschen genomisch instabil ist und genetische Veränderungen wie auch allelische Ungleichgewichte im Laufe der Tumorprogression akkumulieren, haben sich Reihenuntersuchungen mittels Mikrosatellitenmarkern zum Screening auf genomische Imbalancen bewährt [186].

Diese allelischen Ungleichgewichte können sich zum einen im Rahmen von Heterozygotieverlusten (LOH) beispielsweise durch Deletion oder Non-Disjunction mit Reduplikation des verbleibenden Chromosoms manifestieren und sich in einem Tumorsuppressorgenverlust äußern. Im Gegensatz zu einem Verlust eines der beiden Allele zählen demgegenüber auch relative Erhöhungen der Kopienzahl eines Allels zu den genomischen Imbalancen [187]. Dabei können durch eine Mikrosatellitenanalyse chromosomale Veränderungen und Rearrangements ebenso wie Ungleichgewichte auf Allelebene aufgedeckt und eventuelle Kandidatengene eingegrenzt werden. Im Genom sind Mikrosatelliten ubiquitär als kurze hochrepetitive DNA-Sequenzen vorzufinden, welche sich größtenteils als Dinukleotide darstellen. Vorwiegend in nichtkodierenden DNA-Abschnitten gelegen, treten Mikrosatelliten im Gegensatz zu kodierenden Genen in hochpolymerer Form auf. Diese sind meist auf beiden Allelen nicht identisch, sondern besitzen variable Längen durch eine unterschiedliche Anzahl von Tandem-Repeats, was wiederum eine Diskrimination beider Allele ermöglicht. Zu berücksichtigen ist, dass bei Mikrosatellitenanalysen die Marker für eine chromosomale Imbalance einer spezifischen Region stehen. Das heißt, die mutmaßliche Kernregion umfasst oftmals eine Vielzahl von Genen, deren Assoziation mit Tumorprogression und Prognose sich kompliziert gestalten kann.

Wie bei anderen Mutationsanalysen erschwert zudem die Heterogenität der Karzinome die Detektion genomischer Veränderungen. Auch eine eventuelle Verunreinigung der Tumorproben mit DNA aus Normalgewebe könnte zu einer verminderten Erkennbarkeit von Allelungleichgewichten führen und demzufolge weniger Mutationsereignisse erkennen lassen [188].

Ob darüber hinaus die Wahl des Referenzmaterials Einfluss auf die Ergebnisse habe, wurde bereits in Kapitel 3.2.1 ausgeführt. Anders als bei der Kontamination mit Normal-DNA geht man hier von dem Gedanken aus, dass im Laufe der Tumorprogression bereits Mutationen in dem Tumor umgebenden Normalgewebe auftreten [189] und Allelungleichgewichte seltener nachweisbar sein könnten. Da sowohl DNA aus Leukozyten als auch aus Normalgewebe für diese Arbeit vorlagen, wurden somit die AI-Analysewerte gegenübergestellt. Dabei zeigten sich prozentual nahezu identische Nachweisraten genomischer Imbalancen bei beiden Gewebeentitäten. Bei einer Patientin lagen darüber hinaus Leukozyten und Normalgewebe zur Analyse vor, so dass auch in diesem Fall simultane Ergebnisse mit signifikant hohen AI-Werten nachgewiesen werden konnten (Kap. 3.2.1). Dementsprechend scheint die Wahl dieser Referenzmaterialien insgesamt gesehen keinen diagnostischen Einfluss auf die Analysen allelischer Imbalancen auf Chromosom 11p zu haben.

Bei der Verwendung von *Tissue Micro Arrays* (TMA) ist ein methodisch bedeutender Aspekt, ob der ausgestanzte Bezirk repräsentativ für die gesamte Tumorprobe ist, da gerade aufgrund der potentiellen Heterogenität von Tumoren innerhalb der Stanzebene unter Umständen keine Tumorzellen angeschnitten wurden. Weiterhin zu berücksichtigen sind eventuelle Probenverluste durch abgeschwemmte Tumorproben oder mangelnde Beurteilbarkeit beim Vorliegen gefalteter Anschnitte. Jedoch insbesondere die Möglichkeit eines schnellen Tumorscreenings mit einer hohen Anzahl an Datensätzen macht Gewebearrays zu einem wichtigen Instrument bei der Analyse genetischer Alterationen und deren Expressionsmuster [155, 180]. Wesentlicher Vorteil dieser Untersuchungsmethode ist dabei der geringe Material- und Reagenzienverbrauch bei simultaner Untersuchung einer Vielzahl von Patientengeweben in lediglich einem Arbeitsgang.

## **4.2 Nachweis allelischer Imbalancen auf 11p15 in Relation zu klinisch-pathologischen Parametern**

Das Chromosom 11 ist mit seiner relativ hohen Gendichte und dem häufigen Aufkommen von Mutationen bei vielen Erkrankungen involviert und insbesondere aufgrund der genomischen Prägung eine der am meisten untersuchten Abschnitte des humanen Genoms (Kap 1.3.2). Da institutsintern Deletionen auf Chromosom 11p15 mittels CGH nachgewiesen werden konnten, wurden im Anschluss Mikrosatellitenmarker mit möglichst hoher Frequenz allelischer Imbalancen oder LOH beim Mammakarzinom aus Publikationen recherchiert [119, 145-153, 156, 190, 191]). Somit konnte eine Gruppe von Mikrosatellitenmarkern zusammengestellt werden, welche sich auf eine Kandidatenregion von 11p15.3 bis 11p15.5 erstreckt und sich damit in einer bedeutenden Tumorsuppressorregion befindet.

Für Mikrosatellitenanalysen im Allgemeinen eignen sich insbesondere Tetrarepeat-Marker, welche aufgrund einer höheren Trennschärfe leichter zu analysieren sind. Diese kommen jedoch vergleichsweise selten vor, in der vorliegenden Untersuchung beispielsweise bestanden zwei der sechs Mikrosatellitenmarker aus Tetra-Nukleotiden. Schwieriger zu interpretieren sind dagegen die häufiger vorkommenden Dinukleotide, so dass bei Auswahl der Marker auf ein geringes Auftreten von Primerdimeren, Heteroduplex oder anderen Interferenzen geachtet wurde. Des Weiteren war ein hoher Heterozygotiegrad wegen des Informationsgehaltes von Bedeutung für die Ergebnisauswertung. Dabei lagen die Prozentsätze der Heterozygotieverteilung unseres Mikrosatellitenpanels (Kap. 3.2.2) bei annähernd ähnlichen Werten im Vergleich zu bereits publizierten Studienergebnissen europäischer Populationen [145, 149, 151].

Im Rahmen des Screenings auf allelische Imbalancen wurde ein Kollektiv von 34 Patientinnen mit Mammakarzinomen anhand von 6 Mikrosatellitenmarkern untersucht, welche einen circa 11,5 Mbp umfassenden chromosomalen Abschnitt von 11p15.3 bis 11p15.5 flankieren. Unter den Tumorproben befanden sich 13 pT1-Karzinome in einem frühen Stadium der Erkrankung, weiterhin 20 Tumore im pT2-Stadium und lediglich ein Karzinom wies als fortgeschrittenes Tumorstadium pT3 auf. Dagegen kam ein gut differenzierter Grad der Tumoren bei 2 Tumorproben vor, ein mäßig differenziertes Stadium bei 20 Karzinomen und eine schlechte Differenzierung wiesen 12 Tumore auf (Kap. 3.1 mit Tab. 3.1).

Insgesamt zeigte sich ein allelisches Ungleichgewicht bei 11 der 34 Fälle (32 %), den verbleibenden 23 Proben (68 %) wurde kein Ereignis einer genomischen Imbalance zugeordnet. Die höchste Nachweisfrequenz allelischer Imbalancen wies nach Ausschluss homozygoter und dementsprechend nicht informativer Proben der auf 11p15.5 lokalisierte Marker TH.PCR2 auf. Dieser Tetranukleotidmarker konnte in 9 von 28 informativen Fällen, demnach in circa 32 %, ein genomisches Ungleichgewicht detektieren. In 9 von 28 Fällen konnten mit 30 % ähnlich hohe Werte bei dem TH.PCR2 centromerseitig angrenzenden Marker D11S1338 nachgewiesen werden. In absteigender Reihenfolge ergaben sich dann zum Centromer hin geringer werdende Aufkommen allelischer Imbalancen. Der Mikrosatellitenmarker D11S1323 grenzt an D11S1338 und wies mit 4 von 18 AI-Fällen (22 %) deutlich weniger Aberrationen nach. Auch ergaben sich beim Marker D11S1999 in 5 von 24 Fällen (21 %) und beim am weitesten centromer gelegenen Marker D11S1349 in 4 von 31 informativen Fällen (13 %) absteigende Werte. Da sich ebenso telomerseitig geringere Nachweise genomischer Imbalancen durch den Marker D11S2071 mit 5 von 34 Fällen (15 %) zeigen, erstreckt sich das Kerngebiet des Untersuchungsabschnittes auf die Mikrosatellitenmarker TH.PCR2 und D11S1338 mit zu beiden Seiten des Chromosoms hin kontinuierlich abfallenden genetischen Alterationen (Kap. 3.2.3 mit Tab. 3.8).

Diese Kernregion der bei Tumorprogression und Metastasenentstehung mutmaßlich relevanten Gene beinhaltet einen der interessantesten Funde dieser Studie. Wir konnten ein Intervall detektieren, welches durch ein besonders hohes Auftreten genomischer Imbalancen auf Chromosom 11p15 gekennzeichnet ist, womit sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit bereits veröffentlichten Resultaten decken. Karnik et al. [150] beschreibt hinsichtlich des Markers D11S1338 der hier vorliegenden Kernregion ein Auftreten von Heterozygotieverlusten in 60 % der informativen Fälle bei einem untersuchten Kollektiv von 94 Brusttumoren. Auch den Mikrosatellitenmarker D11S1338 betreffend, konnte Nakata et al. [151] unter 105 informativen Mammakarzinomen 38 Fälle (36 %) mit Heterozygotieverlust nachweisen. Zudem weist diese Forschergruppe geringer frequentierte Alterationen anderer chromosomaler Lokalisationen nach und bestärkt die Bedeutung genetischer Alterationen auf 11p15 bei der Brustkrebsprogression. Ähnliche Ergebnisse zu Heterozygotieverlusten auf 11p15.5 im Allgemeinen liefern Winqvist et al. [152], hier liegen bei 30 von 86 Brustkrebspatientinnen (35 %) Alterationen vor. Interessante Differenzierungen früher Stadien des Mammakarzinoms von progressiven Formen präzisieren Kim et al. [147], indem das Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) auf 11p15.5 bei intraduktalen und

invasiven Tumoren gegenübergestellt wird. Dies ergab bei allen Mikrosatellitenmarkern, darunter TH.PCR2 und benachbarte Marker, stets deutlich weniger Fälle von MSI in nicht-invasiven Karzinomen als invasiven Tumoren und auch weniger Alterationen in nicht-invasiven Tumoranteilen im Vergleich zu den angrenzenden invasiven Kompartimenten desselben Karzinoms. Han et al. [220] verdeutlichen die Assoziation von CGH ermittelten Kopienverlusten auf Chromosom 11p15.5 mit dem Auftreten von Rezidiven innerhalb von 5 Jahren und einem signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben. Hier wird davon ausgegangen, dass diese Alterationen als prädiktive Marker einer erhöhten Tumoraggressivität und auch verminderten Therapieansprechbarkeit fungieren können.

Insgesamt gesehen veranschaulicht die vorliegende Arbeit vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Auftretens genomischer Aberrationen auf 11p15, bei Gegenüberstellung anderer Publikationen (siehe oben) liegen jedoch meist geringere Prozentsätze vor. Dies kann vorwiegend infolge unseres Kollektivs mit Patienten vor allem früher Stadien der Brustkrebserkrankung bedingt sein. Außerdem könnte die hier vorliegende kleinere Studienpopulation Einfluss auf die Nachweisfrequenz nehmen. Nicht auszuschließen ist weiterhin, dass in den verschiedenen Studien die Grenzwerte für allelische Imbalancen differieren. In anderen Veröffentlichungen werden nahezu durchgehend geringere Grenzwerte beschrieben, beispielsweise 1,43 [150, 152] oder 1,5 [119]. Da der Großteil der Tumorproben dieser Arbeit nicht mikrodisektiert wurde, ist hier dagegen eine stringent hohe Ratio von 1,8 (Kap. 2.2.2.6) festgelegt worden, um falsch negative Ergebnisse zu minimieren.

Nach den Analysen genomischer Imbalancen auf Chromosom 11p15 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch kein molekulares Profil detektiert werden, welches mit einer frühen Metastasierung ins Knochenmark korreliert. Die Ergebnisse zeigen ein nahezu simultanes Auftreten allelischer Imbalancen in der Gruppe ohne Knochenmarkbefall, wie auch in der Gruppe mit Mikrometastasierung (Kap. 3.1).

Trotz der Restriktion der nicht bestätigten Alternativhypothese ergaben sich nach Korrelation der AI-Frequenz mit den klinisch-pathologischen Parametern hochinformativ Zusammenhänge. So waren in allen Fällen mit lymphknotenpositivem Befund allelische Imbalancen nachzuweisen ( $p=0,009$ ). Auch hinsichtlich des pT-Stadiums konnten signifikante Werte ermittelt werden ( $p=0,028$ ). Hier trat lediglich in einem Fall eine allelische Imbalance beim pT1-Stadium auf, dagegen jedoch 9 AI bei pT2-Stadien. Da zwar nur in einem Fall ein

pT3-Stadium vorlag, dies jedoch in Kombination mit AI, lässt sich aufgrund des Trends einer höheren AI-Frequenz in prognostisch maligneren Stadien eine Bedeutung von AI auf Chromosom 11p15 für die Tumorprogression vermuten. Somit sind genomische Aberrationen dieser Lokalisation wohlmöglich als spätes Ereignis der Tumorigenese beim Mammakarzinom zu werten und führen zu einer zunehmenden Malignität des Zellklons. Ein proportional ansteigendes AI-Aufkommen bei mittel und schlecht differenzierten Tumoren ( $P=0,049$ ) unterstreicht diese Schlussfolgerung. Diese Ergebnisse einschließlich Relationen progressiver Krankheitsverläufe gehen einher mit Auswertungen diverser Arbeitsgruppen [119, 152, 153, 156] wie auch um Karnik [150], in welcher die Fälle mit Heterozygotieverlust (LOH) auf Chromosom 11p15.4-15.5 in zwei Gruppen eingeteilt werden. In der zentromerischen Gruppe, welche die Marker D11S1338 und D11S1323 dieser Studie umfasst, ist ein häufigeres Auftreten von Heterozygotieverlusten (LOH) bei progressiveren Stadien nachzuweisen. Vielmehr zeigen laut Karnik et al. die Fälle mit Verlust der zentromerischen Region dieselben klinischen und pathologischen Merkmale wie Fälle mit Verlust des gesamten kurzen Arms von Chromosom 11 oder mit Verlust beider Regionen.

In summa wiesen jedoch lediglich 3 der 34 Patientinnen des untersuchten Kollektivs einen Lymphknotenbefall auf, was zum einen keine grundlegenden Hypothesen zulässt, andererseits durch das ausschließlich simultane Auftreten von Mikrometastasen im Knochenmark und in den Lymphknoten jedoch interessante Relationen aufzeigt. Dass eine hohe Tumorzelllast, ein Zusammenspiel aus Tumorzellgröße und Lymphknotenbefall, mit einer frühen Disseminierung von Tumorzellen korreliert, wurde bereits anhand weitaus größerer Kollektive in zurückliegenden Veröffentlichungen beschrieben [75, 105, 192]. Betrachtet man weiterhin den Lymphknotenbefall des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs, ergeben sich signifikante Werte bei Korrelation mit dem pT-Stadium ( $p=0,003$ ), dem Differenzierungsgrad ( $p=0,049$ ), der Tumorzellgröße ( $p=0,041$ ) und dem Hormonrezeptorstatus ( $p=0,001$ ). Alle Ergebnisse stehen in Relation mit einer prognostisch höheren Malignität der Mammakarzinome. Dahingehend treten die drei lymphknotenpositiven Fälle ausschließlich beim schlecht differenzierten Grad beziehungsweise bei größeren Tumoren auf. Auch in Bezug auf das pT-Stadium finden sich 2 Fälle in Gruppe mit pT2 und wiederum 1 Fall mit pT3. Bei dem prognostisch schlechteren Status mit hormonrezeptornegativer Expression traten keine lymphknotennegativen Fälle auf, sondern lediglich ein lymphknotenpositiver. Wiederum unter den 33 hormonrezeptorpositiven Proben fanden sich 2 Fälle mit Lymphknotenmetastasierung.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen standen bei fünf Patientinnen sowohl Tumor-DNA, wie auch DNA aus deren vorherigen duktalem Carcinoma *in situ* (DCIS) zur Verfügung. Diese Oberflächenkarzinome stellen nicht-obligate Präkanzerosen dar, welche die Basalmembran nicht überschritten haben, jedoch in ein invasives Mammakarzinom übergehen können [25, 193]. Bei Betrachtung der Allelverhältnisse der Tumor- und DCIS-Proben im Vergleich zeigten sich durchgehend analoge Werte. Darunter trat in einem Fall eine genomische Imbalance mit nahezu identischen AI-Ergebnissen auf (Kap. 3.2.5). Dies lässt angesichts der einzigen Stichprobe und dem Auftreten der AI bei nur einem Mikrosatellitenmarker im Gegensatz zu den übrigen Fällen genomischer Imbalancen dieser Studie prinzipiell jedoch keine Schlussfolgerungen zu.

Laut einigen Publikationen wird diesbezüglich weniger von Veränderungen genetischer Expressionsmuster bei Übergang eines DCIS in ein invasives Mammakarzinom ausgegangen, als vielmehr von einigen tiefgreifenden genetischen Veränderungen bei Entwicklung eines DCIS aus normalen Brustepithelien und vor dem Auftreten morphologischer Veränderungen [188, 194, 195]. Darüber hinaus lassen sich Hinweise einer frühen Tumorzellstreuung durch Detektion disseminierter Tumorzellen (DTC) im Knochenmark ebenso bei Patientinnen mit DCIS finden, also offenbar bereits bei prä- oder minimal invasiven Brustkrebstumoren [100].

Da in etwa ein Drittel der Fälle mit AI sich auf das Intervall zwischen TH.PCR2 und D11S1338 verdichten, ist dieser Abschnitt vermutlich als „kleinste überlappende Einheit“ anzusehen. Dieses im Telomerbereich gelegene Intervall auf 11p15.4 bis 11p15.5 ist eine häufig analysierte und in der Literatur beschriebene Kernregion, in der wichtige Tumorsuppressorgene codiert werden [150, 152, 153]. Beide Mikrosatellitenmarker umspannen mit einer 3,8 Mb großen Region *STIMI*, wie auch *CDK NIC* [163, 196] und der Matrix-Metalloprotease *MMP26* [75, 94] als Kandidatengene der Karzinomentstehung im Allgemeinen. Bei diversen Tumorentitäten einschließlich Brustkrebs sei das für die DNA-Synthese bedeutende Gen *RRM1* [164, 197] genannt. Dagegen speziell für Leukämien relevant zeigt sich *NUP98* [198, 199]. Da jedoch auf Chromosom 11p15 eine besonders hohe Gendichte vorzufinden ist [157] und die AI-Intervalle der vorliegenden Arbeit relativ groß sind, ist eine genaue Eingrenzung entsprechender Kandidatengene schwierig.

Eine Bedeutung bei der Proliferationshemmung und Metastasierung kommt insbesondere *STIMI* laut vorangegangener Publikationen zu [162, 169], so dass im Rahmen der

vorliegenden Arbeit die Expression dieses Tumorsuppressorgens auf Proteinebene untersucht werden sollte.

### 4.3 Genexpressionsanalyse von *STIMI* in Relation zu klinisch-pathologischen Parametern

Mit *STIMI* stand ein Biomarker zur Verfügung, welcher ubiquitär, und für diese Arbeit interessant, insbesondere in Tumorzellen differentiell exprimiert wird. *STIMI* wird mit *Orai1* koexprimiert und ist bedeutsam für die Funktion kapazitiver Calciumkanäle (*store operated calcium channel, SOCC*), die bei Depletion intrazellulärer Speicher einen Calciumeinstrom bewirken. Während *STIMI* als luminaler Calciumsensor innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums fungiert, stellt *Orai1* die notwendige kanalbildende Untereinheit dar [200]. Bereits beschrieben wurde die essentielle Bedeutung von Calciumströmen bei der Zellmigration, Tumorzellen mit inbegriffen [161, 175, 190, 201, 202].

Somit kam zur Validierung der ermittelten genomischen Ungleichgewichte anhand eines umfassenderen Patientenkollektivs die Erstellung von *Tissue Micro Arrays* zur immunhistochemischen Analyse der *STIMI*-Expression zum Einsatz.

Insgesamt 90 der ursprünglich 124 Tumorgewebsstanzen und im Paraffinblock eingebetteten Proben wiesen letztendlich eindeutig verwertbare, gut angeschnittene Tumorbezirke auf.

Darunter befanden sich 24 Fälle mit knochenmarkpositivem Befund, in 65 Fällen dagegen wurden keine disseminierten Tumorzellen im Knochenmark detektiert. Einen lymphknotenpositiven Status erhielten 36 Fälle, wohingegen 53 der Proben einen lymphknotennegativen Befund besaßen. Hinsichtlich der Tumorhistologie wurden dem niedrigmalignen pT1-Stadium 39 Fälle zugeordnet und 43 Fälle dem pT2-Stadium. Spätstadien traten lediglich bei jeweils 6 und 2 Fällen entsprechend im pT3- und pT4-Stadium auf. In Bezug auf den Differenzierungsgrad kamen im Gegensatz dazu häufiger fortgeschrittene Stadien vor. Einen gut differenzierten Grad zeigten 7 der 90 Tumorstanzen, 44 Fälle dagegen waren mäßig und 39 schlecht differenziert.

Nach immunhistochemischer Untersuchung der Expression von *STIMI* und Einordnung der Anfärbestärke in signal schwache Tumore und solcher mit mäßiger und hoher Signalintensität, wurden die Resultate mit den klinisch-pathologischen Parametern korreliert (siehe 3.2). Die Tumoren mit knochenmarkpositivem Befund standen jedoch in keiner Relation zu einer verminderten oder auch vermehrten *STIMI*-Expression. Schwache Signale, vergleichbar mit dem Verlust eines Tumorsuppressorgens auf DNA-Ebene, waren in 20 Fällen (31 %) bei

knochenmarknegativen Proben zu finden, lediglich in 4 Fällen (17 %) jedoch bei knochenmarkpositivem Status. Signale mittlerer Intensität traten in 35 Fällen (54 %) bei negativem und in 15 Fällen (63 %) bei positivem Knochenmarkstatus auf. Eine erhöhte Expression von *STIMI* dagegen lag bei 10 Proben (15 %) mit dem Befund eines negativen und bei 5 Proben (21 %) eines positiven Knochenmarkstatus vor. Hinsichtlich des Lymphknotenstatus zeigte sich ein positiver Befund bei 13 (36 %), 16 (44 %) und 7 (19 %) Tumoren, jeweils mit schwacher, mittlerer und starker Anfärbung. Lymphknotennegativ dagegen waren jeweils 12 (23 %), 33 (62 %) und 8 (15 %) der Tumorstanzen bei entsprechend schwacher, mittlerer und starker Signalintensität.

Auch die Korrelationen der *STIMI*-Expression mit dem Großteil der klinisch-pathologischen Parameter ergaben keine statistische Signifikanz (Kap. 3.3). Einzig hinsichtlich des *HER2*-Status zeigte sich eine signifikant differierende *STIMI*-Expression. Insbesondere standen starke Signalintensitäten von *STIMI* in 38 % (6 Fälle) in Zusammenhang mit einem *HER2*-positivem Status, dagegen jedoch nur in 12 % (9 Fälle) mit einem *HER2*-negativem Befund.

Eine schwache Signalintensität fand sich annähernd gleichverteilt in 28 % (21 Fälle) bei *HER2*-negativem Status und in 25 % (4 Fälle) bei *HER2*-positivem Status. Mittlere Signalintensitäten waren mit 60 % (44 Fälle) häufiger unter den *HER2*-negativen Befunden vertreten, dahingegen in 38 % (6 Fälle) unter den *HER2*-positiven Fällen.

Weiterhin ist hinsichtlich des pT-Stadiums lediglich ein Trend zu einer verminderten *STIMI*-Expression mit ansteigendem pT-Stadium zu verzeichnen. Dabei ist eine schwache *STIMI*-Signalintensität bei pT1-Tumoren in knapp 21 % (12 Fälle), bei pT2-Stadien in circa 30 % (13 Fälle) und im pT3/4-Stadium wiederum in jeweils 50 % (3 und 1 Fall) erkennbar. Zusätzlich ist bei allen Tumoren der pT-Stadien eine starke Expression von *STIMI* selten vertreten und eher in den Anfangsstadien pT1/2 anzutreffen. Insgesamt würde dies eine Ausschaltung von *STIMI* in voranschreitenden Stadien der Tumorprogression vermuten lassen und die Rolle von *STIMI* als Tumorsuppressorgen unterstreichen. Ein vergleichbarer Trend ist in Bezug auf das Differenzierungsstadium ersichtlich, wobei insgesamt selten eine hohe Signalintensität vertreten ist. Mittelstarke Signalintensitäten sind häufig zu verzeichnen und schwanken um 54-57 % in allen Differenzierungsgraden. Interessant ist das geringe Aufkommen einer schwachen *STIMI*-Expression bei gut differenzierten Karzinomen in nur einem Fall (14 %). Je entdifferenzierter und dementsprechend maligner die Tumore jedoch sind, desto häufiger kommt eine schwache *STIMI*-Anfärbung vor, so dass der Verdacht eines Tumorsuppressorgenverlustes in diesen Fällen aufkommt. Dies ist als Tendenz erkennbar durch häufigere Verteilung der Tumore auf die Differenzierungsstadien 2 mit 13 Fällen (29 %)

und 3 mit 11 Fällen (28 %). Ein weiterer Trend ist im Vergleich der Tumor- und Lymphknotenanschnitte untereinander erkennbar. Da die Anfärbestärke der Lymphknotenanschnitte zum größten Teil von der Farbintensität der zugehörigen Primärtumoren differierte, sich jedoch in nahezu allen nicht-simultanen Fällen eine verminderte Anfärbung der Tumorzellen im Lymphknoten im Vergleich zu den signalstärkeren Primärtumoren zeigte, könnte dies einen Trend zu einem Tumorsuppressorgenverlust bei lymphogener Metastasierung aufzeigen.

Im Hinblick auf die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier, liegen ebenso keine statistisch signifikanten Unterschiede bei Karzinompatienten mit verminderter *STIMI*-Expression vor. Die Gründe einer fehlenden Signifikanz können hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit vor allem auch durch die kurzen Beobachtungsintervalle bedingt sein, denn in diese Studie flossen Daten zu einem Nachbeobachtungszeitraum von ungefähr 34 bis zu höchstens 64 Monate ein. Weiterhin fällt bei kritischer Betrachtung des Patientenkollektivs auf, dass die Mehrzahl der Fälle sich im Anfangs- und pT2-Stadium befand und man von einer geringeren Zahl von Aberrationen ausgehen kann.

Prinzipiell führen chromosomale Veränderungen im Allgemeinen nicht notwendigerweise auch zu einer Veränderung der Genexpression. Laut Knudsons *Zwei-Treffer-Modell* [203] werden zur Stilllegung von Tumorsuppressorgenen zwei Ereignisse benötigt, die beide Allele funktionell ausschalten (Kap. 1.2.1).

Interessant für diese Arbeit ist, dass das untersuchte Chromosom 11p physiologischerweise häufig einer DNA-Hypermethylierung durch *Imprinting* in der Embryonalperiode unterworfen ist und es lediglich zur Expression von Genen eines elterlichen Allels kommt. Dies könnte zur Folge haben, dass eine einzige Genmutation auf dem aktiven Allel in einen vollständigen Verlust eines Tumorsuppressorgens münden kann. Jedoch beschreiben Overall et al. [204], dass speziell *STIMI* betreffend dessen Inaktivierung trotz der Lokalisation auf 11p nicht durch genomische Prägung reguliert sein soll. Dies würde bedeuten, dass eine Ausschaltung von *STIMI* wiederum eine Veränderung auf beiden Allelen voraussetzt.

Auch zu den Pathomechanismen von *STIMI* gibt es Unklarheiten. Yang et al. [221] konnten insbesondere Belege für die Zelladhäsion bei der Tumorzellmigration finden und durch Blockade der *SOCC* mittels siRNA für *STIMI* und *Orai1* bei der Brustkarzinomzelllinie MDA-MB-231 die Tumormetastasierung im Mausmodell inhibieren. Damit könnte ein progressiver therapeutischer Ansatzpunkt zur Metastasenbekämpfung in einer Hemmung

dieser Calciumkanäle durch Antikörper gegen *STIMI* und *Orai1* oder auch mittels Applikation von siRNAs bestehen.

Größtenteils finden sich jedoch diskrepante Ergebnisse. Beispielsweise laut einer Analyse von Suyama et al. [162], in welcher die Suppression von *STIMI* in Melanomzellen, wiederum mithilfe von siRNA-Vektoren, eine Verdopplung der Zellmigration bewirkte. Auch weiter zurückliegende Studien folgen demselben Trend und gehen von einem Wachstumsarrest oder von Apoptose bei Überexpression von *STIMI* beim Rhabdomyosarkom und rhabdoiden Tumorzelllinien aus [205, 206]. In ähnlicher Weise wird hinsichtlich der Proliferationsrate dieser Tumoren, nicht jedoch bei einer untersuchten Brusttumorzelllinie, eher eine Herunterregulation von *STIMI* durch Hypermethylierung beschrieben und *STIMI* als Tumorsuppressorgen eine wachstumssupprimierende Rolle zugesprochen [207]. Neuere Studien gehen von keinem Widerspruch hinsichtlich einer Hochregulation oder Suppression von *STIMI* aus. Vielmehr deutet dies auf eine plastische Änderung des Phänotyps der Tumorzellen hin und kann gegebenenfalls auch in prognostische Überlegungen einbezogen werden. Beispielsweise werden hohe Expressionsmuster von *STIMI/Orai1* infolge der Migrationsinduktion mit einer vermehrten Metastasierung in Verbindung gebracht. Dies würde im Einklang mit der in der vorliegenden Studie signifikant höheren Expressionsdichte von *STIMI* bei *HER2*-positiven Tumoren stehen. Dagegen wurde bei verminderter *Orai1*-Expression beobachtet, dass Prostatakarzinomzellen vermehrt fähig waren die Apoptose zu umgehen. Zu bedenken ist hinsichtlich der zum Teil ungeklärten Mechanismen dementsprechend der potentielle Einsatz von Therapeutika. Grundsätzlich ist eine Inhibition der mit *STIMI* in Verbindung stehenden kapazitiven Calciumkanäle mittels Zytostatika oder Antikörper vorstellbar. Vorteil wäre dabei die Blockade des Tumorwachstums, der Migration und Metastasierung, wobei jedoch im Hinblick auf Nebenwirkungen die ubiquitäre Verteilung in den Körperzellen zu berücksichtigen ist.

#### **4.4 Potentielle Tumorsuppressorgene auf 11p15**

Da trotz der häufig auftretenden genomischen Aberrationen auf Chromosom 11p15 bei Brustkrebskrankungen ein spezifisches Zielgen unklar bleibt, wird im Folgenden auf einige der zahlreichen Gene im chromosomalen Bereich 11p15.3-15.5 eingegangen, welche laut vorangegangener Veröffentlichungen eine Rolle bei der Pathogenese des Mammakarzinoms und anderen Tumoren spielen könnten.

Im telomerseitig auf 11p15.5 von den Markern D11S2071 und TH.PCR2 flankierten und über 2 Mb umfassenden Bereich befinden sich mehrere Gene, die mit der Tumorigenese assoziiert sind und ferner die extensiv erforschte Beckwith-Wiedemann-Region 1A umfasst. Für Neoplasien relevante Gene scheinen laut einiger Publikationen *SCL22A1L*, *BWSCRIA* und *IMPT1* zu sein, welche eine Rolle beim Brust- und Lungenkrebs wie auch dem Rhabdomyosarkom spielen [157, 158]. Weitere Studien belegen die Bedeutung einer Vielzahl von Genen auf Chromosom 11p15 bei Krebserkrankungen im Allgemeinen und dem Mammakarzinom im Besonderen. Darunter befinden sich Tumorsuppressorgene wie *TSPAN32* und *TSSC5* und *TSSC6*, welche in der Tumorprogression involviert sind, zudem haematopoetische Funktionen ausüben und allesamt der genomischen Prägung entgehen [190, 208, 209, 210]. Für die Kanzerogenese außerdem bedeutsam, scheint nach Herunterregulierung des Imprintings *IGF-2* beim Wilms Tumor [211, 212] und beispielsweise beim kolorektalem Karzinom [213] zu sein. Dabei wird häufig eine enge Kopplung von *IGF-2* und *H19* mit gleichzeitiger Assoziation eines Verlustes der genomischen Prägung und dem Auftreten von Karzinomen gefunden [214, 215]. Zum Centromer hin folgt die eingegrenzte Kernregion der vorliegenden Arbeit (siehe oben) zwischen 11p15.5 und 15.4, welche sich über einen 3,8 Mbp großen Bereich erstreckt und zwischen TH.PCR2 und D11S1338 befindet. Neben dem in dieser Studie extensiv untersuchten Oberflächenprotein *STIMI* ist für Karzinome im Allgemeinen, *CDK NIC* [163, 196] und *MMP26* [75, 94] zu nennen, zusätzlich ist insbesondere für Brustkrebs *RRMI* [133, 164] beschrieben worden.

Derzeit häufen sich die Ergebnisse zu dem auf 11p15.4 lokalisiertem Gen *ILK*, welches für eine Integrin-gebundene Proteinkinase kodiert. Dieser kommt eine bedeutende Rolle bei hormonabhängigen Tumoren wie dem Mammakarzinom zu und stellt sich hinsichtlich der Tumorprogression einschließlich Metastasenentstehung, und der Therapieansprechbarkeit insbesondere bei Medikation mit *HER2*-Antikörpern, als maßgeblich heraus [167, 168, 216, 217]. Eine Überexpression von *SCUBE2* bei Mammakarzinomen ist mit einer Suppression der Tumorprogression verbunden und als prognoseweisend anzusehen [169]. Wiederum beim Mammakarzinom beschrieben, erweist sich die Tyrosinkinase *WEE1* bei dem Übergang zwischen DNA-Replikation und Mitose als relevant, da eine *WEE1*-Inhibition eine deutlich niedrigere Proliferationsrate oder den apoptotischen Zelltod zur Folge hatten [170]. Von einer maßgeblichen Beteiligung an der Kanzerogenese unter anderem beim Mamma- und Bronchialkarzinom scheint zudem das auf 11p15.5-15.4 lokalisierte Protein *hSRBC* zu sein, welches in entarteten Zellen infolge DNA-Hypermethylierung zu hohen Prozentsätzen downreguliert vorliegt [165, 166, 218]. Als potentiell bedeutendes Gen hinsichtlich der

Prognose des Mammakarzinoms hat sich *LYVE1* ergeben [171], welchem eine Bedeutung bei der Tumorzelladhäsion durch Interaktion mit auf der Zelloberfläche exprimiertem Hyaluron zukommt und dementsprechend Relevanz bei der Metastasierung beigemessen wird [173].

Ob sich ein oder mehrere der beschriebenen Tumorsuppressorgene für die Tumorigenese von Mammakarzinomen und gegebenenfalls deren Einfluss auf eine frühe Metastasierung als maßgeblich herausstellen, oder lediglich in Assoziation anderer chromosomaler Aberrationen auftreten, ist derzeit nicht hinreichend geklärt.

#### 4.5 Resümee

Die heutigen Früherkennungsmaßnahmen von Brustkrebs haben mitsamt der histopathologischen Charakterisierung des Hormonrezeptor- und *HER2*-Status zu einer wesentlichen Therapieverbesserung geführt. Obwohl ein eindeutiger Rückgang der Gesamtmortalität infolge von Früherkennungsmaßnahmen und differenzierten Therapiestrategien fortwährend diskutiert wird, ist zur besseren Therapieansprechbarkeit und Reduktion der Toxizität eine gezielte Charakterisierung der Tumoren und gegebenenfalls Genotypisierung des Patienten von enormem Vorteil. Belegt ist beispielsweise eine Untersuchung von Karzinompatienten hinsichtlich der Enzymaktivität der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) zum Abbau von 5'-Fluorouracil, um die Toxizität der Therapieregimes zu senken [198, 219]. Ebenso kann eine Differenzierung aggressiver Karzinome eine Übertherapie vermeiden und prognostisch maligne Tumore herausfiltern. Auch diese Studie steht durch die Untersuchung genetischer Grundlagen des Mammakarzinoms im Kontext eines zielgerichteten und individualisierten Therapieanspruches.

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist die Detektion potentieller Tumorsuppressorgene und ihr Einfluss auf das Disseminieren einzelner Tumorzellen. Diese stehen im Zusammenhang mit einer minimal residuellen Erkrankung, einer oft bereits bei Diagnosestellung des Brustkrebses bestehenden Systemerkrankung, welche eng mit der Gesamtüberlebenszeit korreliert (Kap. 1.2.5.1). Aufgrund der vorbeschriebenen Relevanz des mutmaßlichen Tumorsuppressorgens *STIMI* bei der Tumormigration und Metastasierung erfolgte im Rahmen dieser Studie wurde eine Korrelation der Expressionsstärke von *STIMI* mit der Knochenmarkmetastasierung, welche jedoch keine signifikanten Ergebnisse ergab. Es ist jedoch der Nachweis hochfrequentierter allelischer Imbalancen auf 11p15 mit signifikanten Relationen hinsichtlich der Lymphknoteninfiltration, einem erhöhten pT-

Stadium und Differenzierungsgrades gelungen. Diese Resultate fanden Eingang in eine Veröffentlichung zur klinischen Relevanz von Materialverlusten auf Chromosom 11p15 beim primären und metastasierten Mammakarzinom, insbesondere im Hinblick auf einen weiterführend untersuchten Expressionsverlust von PRKCDBP in Hirnmetastasen [222]. Damit unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung genetischer Aberrationen auf 11p15 im Rahmen der Karzinogenese des Mammakarzinoms. Eine Herausarbeitung von potentiellen Kandidatengenen auf 11p15 und weitergehende Charakterisierung von Tumoren zur Optimierung der Therapieselektivität bleibt abzuwarten.

## 5 Zusammenfassung

Die mit Abstand häufigste Neoplasie der Frau in der westlichen Welt stellt das Mammakarzinom dar, welches trotz verbesserter Diagnose- und Therapieverfahren nach wie vor eine der höchsten Raten an malignomassoziierten Todesfällen aufweist. Da bereits früh in der Tumorigenese eine Zelldisseminierung stattfinden kann, steht die Prognose des Mammakarzinoms in direktem Zusammenhang mit der Früherkennung der Erkrankung. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass vergleichsweise spät Rezidive auftreten können, wobei dies vermutlich im Zusammenhang mit einzeln metastasierten und im Knochenmark als präferiertem Homingorgan eingewanderten Tumorzellen steht. Da diese Tumorresiduen kein spätes Ereignis in der Metastasenkaskade des Mammakarzinoms darstellen, sondern sich vielmehr in einem sehr frühen Stadium der Tumourprogression entwickeln, liegt bei Diagnosestellung oftmals bereits eine minimale residuelle Krebserkrankung (MRD) vor, die die Entstehung von Metastasen im Knochenmark und anderen Organen begünstigt.

Nachdem sich in vorangegangenen institutsinternen CGH-Analysen Verluste auf Chromosom 11p15 bei einer kleinen Population knochenmarkpositiver Brustkrebspatientinnen zeigten, wurde Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Kollektiv von 34 Patientinnen mit Mammakarzinomen anhand von 6 Mikrosatellitenmarkern (D11S2071, TH.PCR2, D11S1338, D11S1323, D11S1999 und D11S1349) auf allelische Imbalancen untersucht. Diese genomischen Ungleichgewichte flankieren einen circa 11,5 Mbp umfassenden chromosomalen Abschnitt von 11p15.3 bis 11p15 und können anhand differierender Allellängen detektiert werden und demzufolge auf chromosomale Verluste oder auch Gewinne hinweisen. In Abhängigkeit vom Knochenmark- und Lymphknotenstatus wurden die Patientinnen in KM-negative (18), KM-positive (16), LK-negative (32) und LK-positive (3) Gruppen eingeteilt. In summa zeigte sich ein allelisches Ungleichgewicht in 11 von 34 Fällen (32 %), wobei die höchste Nachweisfrequenz allelischer Imbalancen der auf 11p15.5 lokalisierte Marker TH.PCR2 (9 von 28 Fälle, 32%) aufwies. In 9 von 28 Fällen konnten mit 30 % ähnlich hohe Werte bei dem TH.PCR2 centromerseitig angrenzenden Marker D11S1338 nachgewiesen werden. D11S1338 wies mit 4 von 18 AI-Fällen (22 %) deutlich weniger Aberrationen nach. Anhand des Markers D11S1999 ergaben sich in 5 von 24 Fällen (21 %) und beim am weitesten centromer gelegenen Marker D11S1349 in 4 von 31 informativen Fällen (13 %) absteigende Werte. Da sich ebenso telomerseitig geringere Nachweise genomischer Imbalancen durch den Marker D11S2071 mit 5 von 34 Fällen (15 %) zeigten, erstreckt sich das Kerngebiet des Untersuchungsabschnittes auf die

Mikrosatellitenmarker TH.PCR2 und D11S1338 mit zu beiden Seiten des Chromosoms hin kontinuierlich abfallenden genetischen Alterationen. Dieses Intervall auf 11p15.4 bis 11p15.5 ist eine häufig analysierte und in der Literatur beschriebene Kernregion, in der wichtige Tumorsuppressorgene codiert werden und die als Imprinting-Region gilt. Nach den Analysen genomischer Imbalancen auf Chromosom 11p15 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch kein molekulares Profil detektiert werden, welches mit einer frühen Metastasierung ins Knochenmark korreliert. Signifikante positive Korrelationen dagegen bestanden zwischen dem LK-Status ( $p=0,009$ ), dem pT-Stadium ( $p=0,028$ ) sowie dem Grading ( $p=0,049$ ).

In dem zweiten Abschnitt der Arbeit wurde die am häufigsten deletierte Region auf 11p eingegrenzt und ein dort codiertes Tumorsuppressorgen unter Verwendung eines 125 Mammakarzinomproben umfassenden Gewebearrays auf seine Expression hin untersucht. Diesem auf Chromosom 11p15.4 vorkommenden potentiellen Tumorsuppressorgen *STIMI* als essentiellen Bestandteil kapazitiver Calciumkanäle (*store operated calcium channel, SOCC*), wird zunehmend eine grundlegende Relevanz hinsichtlich der Migration von Tumorzellen und Ausbildung metastatischer Tumoreigenschaften beigemessen. Die Tumoren mit knochenmarkpositivem Befund standen jedoch in keiner Relation zu einer verminderten oder auch vermehrten *STIMI*-Expression. Auch die Korrelationen der *STIMI*-Expression mit dem Großteil der klinisch-pathologischen Parameter ergaben keine statistische Signifikanz. Einzig hinsichtlich des *HER2*-Status zeigte sich eine signifikant differierende *STIMI*-Expression, hier standen starke Signalintensitäten von *STIMI* in 38 % (6 Fälle) in Zusammenhang mit einem *HER2*-positivem Status, dagegen jedoch nur in 12 % (9 Fälle) mit einem *HER2*-negativem Befund ( $p=0,044$ ).

Obwohl sich im Rahmen dieser Studie keine eindeutigen Ergebnisse zu genetischen Determinanten auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 hinsichtlich einer frühen Metastasierung ergaben, ist jedoch der Nachweis hochfrequenter allelischer Imbalancen auf 11p15 mit signifikanten Relationen zu Lymphknoteninfiltration, einem erhöhten pT-Stadium sowie einem fortgeschrittenem Grading als Prädiktoren einer schlechten Prognose gelungen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sandberg, A.A. and A.M. Meloni-Ehrig, *Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010. 203[[2]: p. 102-26.
2. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. *Nat Med*, 2004. 10(8): p. 789-99.
3. Stratton, M.R., *Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise*. *Science*, 2011. 331(6024): p. 1553-8.
4. Dockhorn-Dworniczak, B., et al., *Molekularbiologie maligner Tumorerkrankungen*. *Onkologe*, 1998. 4: p. 671-681.
5. Haber, D.A. and E.R. Fearon, *The promise of cancer genetics*. *Lancet*, 1998. 351 Suppl 2: p. SIII-8.
6. *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin,, 2010. 7. Ausgabe.
7. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, H., *Brustkrebs*. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft, d. epidemiologischen, and Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin.
8. Brewster, A.M., et al., *Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(16): p. 1179-83.
9. Tonin, P.N., *Genes implicated in hereditary breast cancer syndromes*. *Semin Surg Oncol*, 2000. 18(4): p. 281-6.
10. DeVita, V.T., T.S. Laawrence, and S.A. Rosenberg, *DeVita, Hellman and Rosenberg's cancer: principles and practice of oncology*. 9. ed. ed. *Cancer of the Breast*, ed. G. Conzen. 2011.
11. Lippman, M.E., *Breast Cancer*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2005. p. 516-523.
12. Hulka, B.S. and P.G. Moorman, *Breast cancer: hormones and other risk factors*. *Maturitas*, 2001. 38(1): p. 103-13; discussion 113-6.
13. Dumitrescu, R.G. and I. Cotarla, *Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?* *J Cell Mol Med*, 2005. 9(1): p. 208-21.
14. Feigelson, H.S. and B.E. Henderson, *Estrogens and breast cancer*. *Carcinogenesis*, 1996. 17(11): p. 2279-84.
15. Parkin, D.M. and L.M. Fernandez, *Use of statistics to assess the global burden of breast cancer*. *Breast J*, 2006. 12 Suppl 1: p. S70-80.

16. Shah, N.R., J. Borenstein, and R.W. Dubois, *Postmenopausal hormone therapy and breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Menopause*, 2005. 12(6): p. 668-78.
17. Beral, V., E. Banks, and G. Reeves, *Effects of estrogen-only treatment in postmenopausal women*. *Jama*, 2004. 292(6): p. 684; author reply 685-6.
18. *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer*. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 1997. 350(9084): p. 1047-59.
19. Farquhar, C., et al., *Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(2): p. CD004143.
20. Hemel, D. and S.M. Domchek, *Breast cancer predisposition syndromes*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010. 24(5): p. 799-814.
21. Oesterreich, S. and S.A. Fuqua, *Tumor suppressor genes in breast cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 1999. 6(3): p. 405-19.
22. de Jong, M.M., et al., *Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility*. *J Med Genet*, 2002. 39(4): p. 225-42.
23. Malkin, D., *Germline p53 mutations and heritable cancer*. *Annu Rev Genet*, 1994. 28: p. 443-65.
24. Garber, J.E., et al., *Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome*. *Cancer Res*, 1991. 51(22): p. 6094-7.
25. Bombonati, A. and D.C. Sgroi, *The molecular pathology of breast cancer progression*. *J Pathol*, 2010. 223(2): p. 307-17.
26. Kuerer, H.M., et al., *Ductal carcinoma in situ: state of the science and roadmap to advance the field*. *J Clin Oncol*, 2009. 27(2): p. 279-88.
27. Buerger, H., et al., *Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways*. *J Pathol*, 1999. 187(4): p. 396-402.
28. Simpson, P.T., et al., *The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ*. *Breast Cancer Res*, 2003. 5(5): p. 258-62.
29. Harris, L., et al., *American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(33): p. 5287-312.
30. Hayes, D.F., et al., *Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. 88(20): p. 1456-66.
31. Singletary, S.E. and F.L. Greene, *Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification*. *Semin Surg Oncol*, 2003. 21(1): p. 53-9.

32. Böcker, W., P.U. Heitz, and A. Aguzzi, *Pathologie*. Vol. 4., vollst. überarb. Aufl. 2008.
33. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *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*, 1991. 19(5): p. 403-10.
34. Bloom, H.J. and W.W. Richardson, *Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years*. *Br J Cancer*, 1957. 11(3): p. 359-77.
35. Cotlar, A.M., J.J. Dubose, and D.M. Rose, *History of surgery for breast cancer: radical to the sublime*. *Curr Surg*, 2003. 60(3): p. 329-37.
36. van Dongen, J.A., et al., *Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(14): p. 1143-50.
37. Fisher, B., *From Halsted to prevention and beyond: advances in the management of breast cancer during the twentieth century*. *Eur J Cancer*, 1999. 35(14): p. 1963-73.
38. van Dongen, J.A., et al., *Randomized clinical trial to assess the value of breast-conserving therapy in stage I and II breast cancer, EORTC 10801 trial*. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 1992(11): p. 15-8.
39. Janni, W., et al., *Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis*. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(9): p. 2967-76.
40. Bartkowiak, K., et al., *Discovery of a novel unfolded protein response phenotype of cancer stem/progenitor cells from the bone marrow of breast cancer patients*. *J Proteome Res*, 2010. 9(6): p. 3158-68.
41. Riethdorf, S. and K. Pantel, *Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. 1210: p. 66-77.
42. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005. 353(8): p. 793-802.
43. R. Kreienberg, I.K., U. Albert, H. H. Bartsch, and M.W.B. etc., *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. 2008: Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG).
44. Gnant, M., *Anticancer Activity of Bisphosphonates in Breast Cancer*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011.
45. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. *Ann Oncol*, 2011. 22(8): p. 1736-47.

46. EBCTCG, *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. 365(9472): p. 1687-717.
47. Joensuu, H., et al., *Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer*. N Engl J Med, 2006. 354(8): p. 809-20.
48. Slamon, D.J., E.H. Romond, and E.A. Perez, *Advances in adjuvant therapy for breast cancer*. Clin Adv Hematol Oncol, 2006. 4(3 Suppl 7): p. suppl 1, 4-9; discussion suppl 10; quiz 2 p following suppl 10.
49. Solomayer, E.F., et al., *Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2006. 98(2): p. 179-84.
50. Powles, T., et al., *Reduction in bone relapse and improved survival with oral clodronate for adjuvant treatment of operable breast cancer [ISRCTN83688026]*. Breast Cancer Res, 2006. 8(2): p. R13.
51. Powles, T., et al., *Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer*. J Clin Oncol, 2002. 20(15): p. 3219-24.
52. Neudert, M., et al., *Site-specific human breast cancer (MDA-MB-231) metastases in nude rats: model characterisation and in vivo effects of ibandronate on tumour growth*. Int J Cancer, 2003. 107(3): p. 468-77.
53. Wood, J., et al., *Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 302(3): p. 1055-61.
54. Morgan, G. and A. Lipton, *Antitumor effects and anticancer applications of bisphosphonates*. Semin Oncol, 2010. 37 Suppl 2: p. S30-40.
55. Page, D.L., *Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types*. Am J Surg Pathol, 1991. 15(4): p. 334-49.
56. Jones, R.L., et al., *Relationship between oestrogen receptor status and proliferation in predicting response and long-term outcome to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2010. 119(2): p. 315-23.
57. Weigel, M.T. and M. Dowsett, *Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction*. Endocr Relat Cancer, 2010. 17(4): p. R245-62.
58. Colzani, E., et al., *Prognosis of Patients With Breast Cancer: Causes of Death and Effects of Time Since Diagnosis, Age, and Tumor Characteristics*. J Clin Oncol, 2011.
59. Harbeck, N., *Never too late: reducing late breast cancer relapse risk*. Curr Med Res Opin, 2008. 24(12): p. 3295-305.
60. Pakkiri, P., S.R. Lakhani, and C.E. Smart, *Current and future approach to the pathologist's assessment for targeted therapy in breast cancer*. Pathology, 2009. 41(1): p. 89-99.

61. Sekine, I., et al., *A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with breast cancer*. Int J Clin Oncol, 2009. 14(2): p. 112-9.
62. Petitjean, A., et al., *TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes*. Oncogene, 2007. 26(15): p. 2157-65.
63. Malinowsky, K., et al., *UPA and PAI-1 analysis from fixed tissues - new perspectives for a known set of predictive markers*. Curr Med Chem, 2010. 17(35): p. 4370-7.
64. Janicke, F., et al., *Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1*. J Natl Cancer Inst, 2001. 93(12): p. 913-20.
65. Zaczek, A., B. Brandt, and K.P. Bielawski, *The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches*. Histol Histopathol, 2005. 20(3): p. 1005-15.
66. Urruticoechea, A., I.E. Smith, and M. Dowsett, *Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. 23(28): p. 7212-20.
67. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. 319(9): p. 525-32.
68. Osborne, C., P. Wilson, and D. Tripathy, *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. Oncologist, 2004. 9(4): p. 361-77.
69. Weinberg, R.A., *Oncogenes and tumor suppressor genes*. CA Cancer J Clin, 1994. 44(3): p. 160-70.
70. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
71. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. 68(4): p. 820-3.
72. Murken, J., *Taschenlehrbuch Humangenetik*. Kap. 5.11.2.1. Vol. 7, Aufl. 2006: Thieme.
73. Berger, A.H., A.G. Knudson, and P.P. Pandolfi, *A continuum model for tumour suppression*. Nature, 2011. 476(7359): p. 163-9.
74. van der Pluijm, G., *Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation*. Bone, 2011. 48(1): p. 37-43.
75. Banys, M., et al., *Disseminated tumor cells in bone marrow may affect prognosis of patients with gynecologic malignancies*. Int J Gynecol Cancer, 2009. 19(5): p. 948-52.
76. Folkman, J., *Angiogenese*, in *Harrisons Innere Medizin*, Charite, Editor. 2009.

77. Ferrara, N., et al., *Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries*. Am J Pathol, 2003. 162(6): p. 1881-93.
78. Banerjee, S., et al., *Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2007. 4(9): p. 536-50.
79. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(6): p. 449-58.
80. Pierceall, W.E., et al., *Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines*. Oncogene, 1995. 11(7): p. 1319-26.
81. Wicki, A. and G. Christofori, *The potential role of podoplanin in tumour invasion*. Br J Cancer, 2007. 96(1): p. 1-5.
82. Dvorak, H.F., et al., *Tumor microenvironment and progression*. J Surg Oncol, 2011. 103(6): p. 468-74.
83. Nabeshima, K., et al., *Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration*. Pathol Int, 2002. 52(4): p. 255-64.
84. Hoon, D.S., et al., *Molecular mechanisms of metastasis*. J Surg Oncol, 2011. 103(6): p. 508-17.
85. Pantel, K., C. Alix-Panabieres, and S. Riethdorf, *Cancer micrometastases*. Nat Rev Clin Oncol, 2009. 6(6): p. 339-51.
86. Riethdorf, S., H. Wikman, and K. Pantel, *Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients*. Int J Cancer, 2008. 123(9): p. 1991-2006.
87. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 563-72.
88. Ewing, *A treatise on tumors*. 3rd edn. ed. 1928: Philadelphia: Saunders, W.B.
89. Kaufmann, *Chirurgie des Mammakarzinoms*, in *Atlas der Brustchirurgie*, S.M.V. Heidelberg, Editor. 2008: Berlin, Heidelberg.
90. Weiss, L., et al., *Organ vascularity and metastatic frequency*. Am J Pathol, 1980. 101(1): p. 101-13.
91. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. Cancer Metastasis Rev, 1989. 8(2): p. 98-101.
92. Juarez, P. and T.A. Guise, *TGF-beta in cancer and bone: implications for treatment of bone metastases*. Bone, 2011. 48(1): p. 23-9.
93. Mundy, G.R., *Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 584-93.
94. Deng, Y., et al., *Expression of Matrix Metalloproteinase-26 promotes human glioma U251 cell invasion in vitro and in vivo*. Oncol Rep, 2010. 23(1): p. 69-78.

95. Alix-Panabieres, C., S. Riethdorf, and K. Pantel, *Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis*. Clin Cancer Res, 2008. 14(16): p. 5013-21.
96. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. 410(6824): p. 50-6.
97. Kim, M.Y., et al., *Tumor self-seeding by circulating cancer cells*. Cell, 2009. 139(7): p. 1315-26.
98. Janni, W., et al., *Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen*, in *Deutsches Ärzteblatt*. 2004. p. A3498-A3502.
99. Fidler, I.J. and M.L. Kripke, *Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor*. Science, 1977. 197(4306): p. 893-5.
100. Saenger, N., et al., *Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ*. International Journal of Cancer UICC, 2011.
101. Dearnaley, D.P., et al., *Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen*. Br J Cancer, 1981. 44(1): p. 85-90.
102. Effenberger, K.E., et al., *Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern*. Breast Cancer Res Treat, 2011. 125(3): p. 729-38.
103. Braun, S., et al., *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. N Engl J Med, 2000. 342(8): p. 525-33.
104. Bidard, F.C., et al., *A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis?* Cancer Metastasis Rev, 2008. 27(1): p. 5-10.
105. Wiedswang, G., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer*. J Clin Oncol, 2003. 21(18): p. 3469-78.
106. Soltanian, S. and M.M. Matin, *Cancer stem cells and cancer therapy*. Tumour Biol, 2011. 32(3): p. 425-40.
107. Clarke, M.F., et al., *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. Cancer Res, 2006. 66(19): p. 9339-44.
108. Al-Ejeh, F., et al., *Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities*. Carcinogenesis, 2011. 32(5): p. 650-8.
109. Uhr, J.W. and K. Pantel, *Controversies in clinical cancer dormancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(30): p. 12396-400.
110. Polyak, K. and R.A. Weinberg, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(4): p. 265-73.

111. Lianidou, E.S., et al., *What's new on circulating tumor cells? A meeting report*. Breast Cancer Res, 2010. 12(4): p. 307.
112. Muller, V., C. Alix-Panabieres, and K. Pantel, *Insights into minimal residual disease in cancer patients: implications for anti-cancer therapies*. Eur J Cancer, 2010. 46(7): p. 1189-97.
113. Roth, C., et al., *Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. 12(6): p. R90.
114. Iwasaki, H. and T. Suda, *Cancer stem cells and their niche*. Cancer Sci, 2009. 100(7): p. 1166-72.
115. Essers, M.A., et al., *IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo*. Nature, 2009. 458(7240): p. 904-8.
116. Pathak, S., et al., *Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells, and cancer (review)*. Int J Oncol, 2002. 20(3): p. 637-41.
117. van Beers, E.H. and P.M. Nederlof, *Array-CGH and breast cancer*. Breast Cancer Res, 2006. 8(3): p. 210.
118. Climent, J., et al., *Characterization of breast cancer by array comparative genomic hybridization*. Biochem Cell Biol, 2007. 85(4): p. 497-508.
119. O'Connell, P., et al., *Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci*. J Natl Cancer Inst, 1998. 90(9): p. 697-703.
120. Wessels, L.F., et al., *Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors*. Cancer Res, 2002. 62(23): p. 7110-7.
121. Petrides, P.E., *Gendiagnostik & Genterapie*, in *Biochemie & Pathobiochemie*, Springer, Editor. 2003.
122. Karran, P., *Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer*. Semin Cancer Biol, 1996. 7(1): p. 15-24.
123. Schwarzenbach, H., et al., *Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1022: p. 25-32.
124. Janatova, M. and P. Pohlreich, *Microsatellite markers in breast cancer studies*. Prague Med Rep, 2004. 105(2): p. 111-8.
125. Wong, K.K., et al., *Allelic imbalance analysis by high-density single-nucleotide polymorphic allele (SNP) array with whole genome amplified DNA*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(9): p. e69.
126. Eggermann, T., *Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes: opposite (epi)mutations in 11p15 result in opposite clinical pictures*. Horm Res, 2009. 71 Suppl 2: p. 30-5.

127. Sait, S.N., et al., *Localization of Beckwith-Wiedemann and rhabdoid tumor chromosome rearrangements to a defined interval in chromosome band 11p15.5*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. 11(2): p. 97-105.
128. Mannens, M., et al., *Regional localization of DNA probes on the short arm of chromosome 11 using aniridia-Wilms' tumor-associated deletions*. Hum Genet, 1987. 75(2): p. 180-7.
129. Koufos, A., et al., *Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumour*. Nature, 1984. 309(5964): p. 170-2.
130. Wiedemann, H.R., *[Familial Malformation Complex with Umbilical Hernia and Macroglossia--a "New Syndrome"?)*. J Genet Hum, 1964. 13: p. 223-32.
131. Viel, A., et al., *Chromosomal localisation of two putative 11p oncosuppressor genes involved in human ovarian tumours*. Br J Cancer, 1992. 66(6): p. 1030-6.
132. Kiechle, M., et al., *Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation*. Cancer, 2001. 91(3): p. 534-40.
133. Bepler, G., et al., *Prognostic significance of molecular genetic aberrations on chromosome segment 11p15.5 in non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2002. 20(5): p. 1353-60.
134. Bepler, G., et al., *A 1.4-Mb high-resolution physical map and contig of chromosome segment 11p15.5 and genes in the LOH11A metastasis suppressor region*. Genomics, 1999. 55(2): p. 164-75.
135. Fong, K.M., P.V. Zimmerman, and P.J. Smith, *Correlation of loss of heterozygosity at 11p with tumour progression and survival in non-small cell lung cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. 10(3): p. 183-9.
136. Fornari, D., et al., *Transitional cell bladder tumor: predicting recurrence and progression by analysis of microsatellite loss of heterozygosity in urine sediment and tumor tissue*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. 167(1): p. 15-9.
137. Mertens, F., et al., *Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms*. Cancer Res, 1997. 57(13): p. 2765-80.
138. Rigaud, G., et al., *High resolution allelotype of nonfunctional pancreatic endocrine tumors: identification of two molecular subgroups with clinical implications*. Cancer Res, 2001. 61(1): p. 285-92.
139. Chung, D.C., et al., *Localization of putative tumor suppressor loci by genome-wide allelotyping in human pancreatic endocrine tumors*. Cancer Res, 1998. 58(16): p. 3706-11.
140. Hessman, O., et al., *Multiple allelic deletions and intratumoral genetic heterogeneity in men1 pancreatic tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(3): p. 1355-61.

141. Demars, J., et al., *Epigenetic and genetic mechanisms of abnormal 11p15 genomic imprinting in Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes*. *Curr Med Chem*, 2011. 18(12): p. 1740-50.
142. Smith, A.C., et al., *Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5*. *Pediatr Res*, 2007. 61(5 Pt 2): p. 43R-47R.
143. Pavelic, K., D. Bukovic, and J. Pavelic, *The role of insulin-like growth factor 2 and its receptors in human tumors*. *Mol Med*, 2002. 8(12): p. 771-80.
144. Feinberg, A.P., *Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction*. *Cancer Res*, 1999. 59(7 Suppl): p. 1743s-1746s.
145. Smeds, J., et al., *Ductal carcinoma in situ of the breast with different histopathological grades and corresponding new breast tumour events: analysis of loss of heterozygosity*. *Acta Oncol*, 2005. 44(1): p. 41-9.
146. Ellsworth, D.L., et al., *Genomic patterns of allelic imbalance in disease free tissue adjacent to primary breast carcinomas*. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. 88(2): p. 131-9.
147. Kim, D.J., et al., *The role of microsatellite instability at chromosome 11p15.5 in the progression of breast ductal carcinoma*. *J Korean Med Sci*, 2004. 19(5): p. 698-703.
148. Lerebours, F., et al., *Evidence of chromosome regions and gene involvement in inflammatory breast cancer*. *Int J Cancer*, 2002. 102(6): p. 618-22.
149. Regitnig, P., et al., *Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding local recurrences*. *J Pathol*, 2002. 198(2): p. 190-7.
150. Karnik, P., et al., *Two distinct tumor suppressor loci within chromosome 11p15 implicated in breast cancer progression and metastasis*. *Hum Mol Genet*, 1998. 7(5): p. 895-903.
151. Nakata, T., et al., *Identification of a new commonly deleted region within a 2-cM interval of chromosome 11p11 in breast cancers*. *Eur J Cancer*, 1998. 34(3): p. 417-21.
152. Winqvist, R., et al., *Loss of heterozygosity for chromosome 11 in primary human breast tumors is associated with poor survival after metastasis*. *Cancer Res*, 1995. 55(12): p. 2660-4.
153. Negrini, M., et al., *Definition and refinement of chromosome 11 regions of loss of heterozygosity in breast cancer: identification of a new region at 11q23.3*. *Cancer Res*, 1995. 55(14): p. 3003-7.
154. Gallagher, E., et al., *Gain of imprinting of SLC22A18 sense and antisense transcripts in human breast cancer*. *Genomics*, 2006. 88(1): p. 12-7.
155. Schraml, P., *[Tissue banks for molecular diagnostics]*. *Ther Umsch*, 2006. 63(4): p. 267-71.

156. Dellas, A., et al., *DNA sequence losses on chromosomes 11p and 18q are associated with clinical outcome in lymph node-negative ductal breast cancer*. Clin Cancer Res, 2002. 8(5): p. 1210-6.
157. Taylor, T.D., et al., *Human chromosome 11 DNA sequence and analysis including novel gene identification*. Nature, 2006. 440(7083): p. 497-500.
158. Schwienbacher, C., et al., *Transcriptional map of 170-kb region at chromosome 11p15.5: identification and mutational analysis of the BWR1A gene reveals the presence of mutations in tumor samples*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(7): p. 3873-8.
159. Inaguma, S., K. Kasai, and H. Ikeda, *GLII facilitates the migration and invasion of pancreatic cancer cells through MUC5AC-mediated attenuation of E-cadherin*. Oncogene, 2010. 30(6): p. 714-23.
160. Yamada, N., et al., *Expression of MUC5AC, an early marker of pancreatobiliary cancer, is regulated by DNA methylation in the distal promoter region in cancer cells*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010. 17(6): p. 844-54.
161. Ritchie, M.F., Y. Zhou, and J. Soboloff, *WT1/EGR1-mediated control of STIM1 expression and function in cancer cells*. Front Biosci, 2011. 17: p. 2402-15.
162. Suyama, E., et al., *Identification of metastasis-related genes in a mouse model using a library of randomized ribozymes*. J Biol Chem, 2004. 279(37): p. 38083-6.
163. Larson, P.S., et al., *CDKN1C/p57kip2 is a candidate tumor suppressor gene in human breast cancer*. BMC Cancer, 2008. 8: p. 68.
164. Metro, G., et al., *In situ protein expression of RRMI, ERCC1, and BRCA1 in metastatic breast cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy*. Cancer Invest, 2010. 28(2): p. 172-80.
165. Ko, B.S., et al., *Risk Factor for Axillary Lymph Node Metastases in Microinvasive Breast Cancer*. Ann Surg Oncol, 2011.
166. Zochbauer-Muller, S., et al., *Expression of the candidate tumor suppressor gene hSRBC is frequently lost in primary lung cancers with and without DNA methylation*. Oncogene, 2005. 24(41): p. 6249-55.
167. Fielding, A.B., et al., *A critical role of integrin-linked kinase, ch-TOG and TACC3 in centrosome clustering in cancer cells*. Oncogene, 2011. 30(5): p. 521-34.
168. Kalra, J., et al., *Suppression of Her2/neu expression through ILK inhibition is regulated by a pathway involving TWIST and YB-1*. Oncogene, 2010. 29(48): p. 6343-56.
169. Cheng, C.J., et al., *SCUBE2 suppresses breast tumor cell proliferation and confers a favorable prognosis in invasive breast cancer*. Cancer Res, 2009. 69(8): p. 3634-41.
170. Murrow, L.M., et al., *Identification of WEE1 as a potential molecular target in cancer cells by RNAi screening of the human tyrosine kinome*. Breast Cancer Res Treat, 2010. 122(2): p. 347-57.

171. Bono, P., et al., *High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2004. 10(21): p. 7144-9.
172. Bandyopadhyay, K. and R.A. Gjerset, *Protein kinase CK2 is a central regulator of topoisomerase I hyperphosphorylation and camptothecin sensitivity in cancer cell lines*. Biochemistry, 2011. 50(5): p. 704-14.
173. Chen, Y.F., et al., *Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(37): p. 15225-30.
174. Cunnick, G.H., et al., *Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis*. Histol Histopathol, 2002. 17(3): p. 863-70.
175. Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba, *Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors*. Nat Rev Cancer, 2011. 11(8): p. 609-18.
176. Pantel, K., et al., *Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow*. J Hematother, 1994. 3(3): p. 165-73.
177. Bauer, K.D., et al., *Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging*. Clin Cancer Res, 2000. 6(9): p. 3552-9.
178. Borgen, E., et al., *Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells*. Cytotherapy, 1999. 1(5): p. 377-88.
179. Decarlo, K., et al., *Laser capture microdissection: methods and applications*. Methods Mol Biol, 2011. 755: p. 1-15.
180. Schraml, P., et al., *Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types*. Clin Cancer Res, 1999. 5(8): p. 1966-75.
181. Braun, S. and K. Pantel, *Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance*. Med Oncol, 1999. 16(3): p. 154-65.
182. Harms, V., *Physik für Mediziner und Pharmazeuten*. 16. Auflage ed. 2004: Lindhöft.
183. Willis, L., et al., *Breast cancer dormancy can be maintained by small numbers of micrometastases*. Cancer Res, 2010. 70(11): p. 4310-7.
184. Husemann, Y., et al., *Systemic spread is an early step in breast cancer*. Cancer Cell, 2008. 13(1): p. 58-68.
185. Fehm, T., et al., *Tumor cell dormancy: implications for the biology and treatment of breast cancer*. Apmis, 2008. 116(7-8): p. 742-53.
186. Slebos, R.J., et al., *Analytical and statistical methods to evaluate microsatellite allelic imbalance in small amounts of DNA*. Lab Invest, 2004. 84(5): p. 649-57.
187. Mei, R., et al., *Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays*. Genome Res, 2000. 10(8): p. 1126-37.

188. Schwarzenbach, H., et al., *Microsatellite analysis of allelic imbalance in tumour and blood from patients with prostate cancer*. *BJU Int*, 2008. 102(2): p. 253-8.
189. Heaphy, C.M., et al., *Telomere DNA content and allelic imbalance demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors*. *Int J Cancer*, 2006. 119(1): p. 108-16.
190. Lee, J., et al., *Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels*. *Nature*, 1999. 400(6742): p. 382-6.
191. Garcia, I., et al., *Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 11 (11p15) in human milk epithelial cells immortalized by microinjection of SV40 DNA*. *Cancer Res*, 1991. 51(1): p. 294-300.
192. Naume, B., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics*. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(12): p. 4122-9.
193. Wellings, S.R. and H.M. Jensen, *On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. 50(5): p. 1111-8.
194. Castro, N.P., et al., *Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma*. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(5): p. R87.
195. Hilson, J.B., S.J. Schnitt, and L.C. Collins, *Phenotypic alterations in ductal carcinoma in situ-associated myoepithelial cells: biologic and diagnostic implications*. *Am J Surg Pathol*, 2009. 33(2): p. 227-32.
196. Gramantieri, L., et al., *MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality*. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(16): p. 5073-81.
197. Kim, D., W. Jung, and J.S. Koo, *The expression of ERCC1, RRMI, and BRCA1 in breast cancer according to the immunohistochemical phenotypes*. *J Korean Med Sci*, 2011. 26(3): p. 352-9.
198. Amstutz, U., T.K. Froehlich, and C.R. Largiader, *Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity*. *Pharmacogenomics*, 2011. 12(9): p. 1321-36.
199. Kaltenbach, S., et al., *NUP98-MLL fusion in human acute myeloblastic leukemia*. *Blood*, 2010. 116(13): p. 2332-5.
200. Prakriya, M., et al., *Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel*. *Nature*, 2006. 443(7108): p. 230-3.
201. Yang, S. and X.Y. Huang, *Ca<sup>2+</sup> influx through L-type Ca<sup>2+</sup> channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration*. *J Biol Chem*, 2005. 280(29): p. 27130-7.
202. Nishiyama, M., et al., *Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> channels sets the polarity of nerve growth-cone turning*. *Nature*, 2003. 423(6943): p. 990-5.

203. Knudson, A.G., *Chasing the cancer demon*. Annu Rev Genet, 2000. 34: p. 1-19.
204. Overall, M.L., et al., *Murine Stim1 maps to distal chromosome 7 and is not imprinted*. Mamm Genome, 1998. 9(8): p. 657-9.
205. Manji, S.S., et al., *STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1481(1): p. 147-55.
206. Sabbioni, S., et al., *GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development*. Cancer Res, 1997. 57(20): p. 4493-7.
207. Sabbioni, S., et al., *Exon structure and promoter identification of STIM1 (alias GOK), a human gene causing growth arrest of the human tumor cell lines G401 and RD*. Cytogenet Cell Genet, 1999. 86(3-4): p. 214-8.
208. Lee, M.P., et al., *Somatic mutation of TSSC5, a novel imprinted gene from human chromosome 11p15.5*. Cancer Res, 1998. 58(18): p. 4155-9.
209. Yamada, H.Y. and G.J. Gorbsky, *Tumor suppressor candidate TSSC5 is regulated by UbcH6 and a novel ubiquitin ligase RING105*. Oncogene, 2006. 25(9): p. 1330-9.
210. Robb, L., et al., *Molecular characterisation of mouse and human TSSC6: evidence that TSSC6 is a genuine member of the tetraspanin superfamily and is expressed specifically in haematopoietic organs*. Biochim Biophys Acta, 2001. 1522(1): p. 31-41.
211. Rainier, S., et al., *Relaxation of imprinted genes in human cancer*. Nature, 1993. 362(6422): p. 747-9.
212. Ogawa, O., et al., *Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour*. Nature, 1993. 362(6422): p. 749-51.
213. Cui, H., et al., *Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk*. Science, 2003. 299(5613): p. 1753-5.
214. Ulaner, G.A., et al., *Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site*. Hum Mol Genet, 2003. 12(5): p. 535-49.
215. Sandovici, I., et al., *Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/H19 and IGF2R differentially methylated regions*. Hum Mol Genet, 2003. 12(13): p. 1569-78.
216. Cortez, V., et al., *Integrin-linked kinase 1: role in hormonal cancer progression*. Front Biosci (Schol Ed), 2011. 3: p. 788-96.
217. Durbin, A.D., et al., *The oncogenic and growth-suppressive functions of the integrin-linked kinase are distinguished by JNK1 expression in human cancer cells*. Cell Cycle, 2010. 9(10): p. 1951-9.
218. Xu, X.L., et al., *Inactivation of human SRBC, located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region, in breast and lung cancers*. Cancer Res, 2001. 61(21): p. 7943-9.

219. van Kuilenburg, A.B., *Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil*. Eur J Cancer, 2004. 40(7): p. 939-50.
220. Han, W., et al., *Genomic alterations identified by array comparative genomic hybridization as prognostic markers in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer*. BMC Cancer, 2006; 6:92
221. Yang, S., et al., *Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis*. Cancer Cell, 2009. 3;15(2):124-34
222. Wikman, H., et al., *Clinical relevance of loss of 11p15 in primary and metastatic breast cancer: association with loss of PRKCDBP expression in brain metastases*. PLoS One, 2012; 7(10)

## 7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel für die Überlassung des überaus interessanten sowie aktuellen Promotionsthemas und die uneingeschränkte Unterstützung bedanken.

Frau Dr. habil Harriet Wikman gilt mein besonderer Dank für die intensive und konstruktive Betreuung während dieser Arbeit, die mit einer außerordentlichen Fachkompetenz und mannigfachen Anregungen erfolgte.

Prof. Dr. Guido Sauter aus dem Institut für Pathologie und Prof. Dr. Fritz Jänicke aus der Klinik für Gynäkologie danke ich für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials einschließlich der klinischen Daten. Desweiteren danke ich Frau Dr. Rana Issa für die histopathologische Befundung der Gewebeschnitte.

Ganz besonderer Dank gilt dem gesamten ITB-Team für die angenehme Atmosphäre und freundliche Unterstützung, insbesondere Dr. Michaela Wrage für ihre umfassende Hilfe und Unterstützung sowie Kathrin Eylmann und Jolante Kropidlowski, dank derer die Arbeit stets Spass gemacht hat.

Jenny Voth danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit und ihre wissenschaftlichen Anregungen.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann, ohne dessen liebevolle Unterstützung und Geduld ich mit zwei Kindern das Studium mitsamt der Erstellung dieser Arbeit nicht geschafft hätte. Gleichzeitig möchte ich mich für die in aller Hinsicht uneingeschränkte Hilfestellung meiner Familie und insbesondere meiner Mutter bedanken, vor allem für die stete Bereitschaft den Nachwuchs zu betreuen.

## 8 Lebenslauf

## 9 Anhang: Wissenschaftliche Veröffentlichung

Harriet Wikman<sup>1</sup>, **Bettina Sielaff-Frimpong**<sup>1</sup>, Jolanthe Kropidlowski<sup>1</sup>, Isabell Witzel<sup>2</sup>, Karin Milde-Langosch<sup>2</sup>, Guido Sauter<sup>3</sup> Manfred Westphal<sup>4</sup>, Katrin Lamszus<sup>4\*</sup>, Klaus Pantel<sup>1\*</sup>:

*Clinical relevance of loss of 11p15 in primary and metastatic breast cancer: association with loss of PRKCDBP expression in brain metastases.* PLoS One, 2012; 7(10). PMID: 23118876

[222]

## **10 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....