

Aus der Abteilung für Gynäkopathologie
des Instituts für Pathologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Lönig

**Expression der Proteinase Urokinase Plasminogen Aktivator
(uPA), dessen Gewebe Typ (tPA) und Inhibitor Plasminogen
Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) in gutartigen und bösartigen
Erkrankungen der weiblichen Brustdrüse**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Nina Masoumi-Grazianski
aus Berlin

Hamburg, 2003

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am : 02.06.2004

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

Dekan: Prof.Dr.C.Wagener

Referent: Prof.Th.Lönning

Korreferent: -----

Meinen Eltern und meinem Ehemann in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1-2
2	Einleitung	3-12
2.1	Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms	3
2.2	Klassifikation der Mammatumoren	4
2.2.1	Anatomie der Brustdrüse	5
2.2.2	Mastopathien	6
2.2.3	Radiäre Narbe	6
2.2.4	<i>In situ</i> -Karzinome	6
2.2.5	Invasive Karzinome	7
2.3	Prognostische Parameter des Mammakarzinoms	9
2.4	Die Proteinase uPA, PAI-1 und tPA	10
2.5	Zielstellung	11
3	Material und Methoden	13-24
3.1	Untersuchungsmaterial	13
3.2	Methoden	
3.2.1	Plasmide	15
3.2.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung: Beschreibung der Versuche und Arbeitsvorschriften	15
3.2.3	Mikroskopische Auswertung der histologischen Schnittpräparate	23
3.2.4	Statistische Auswertung	23
4	Ergebnisse	25-45
4.1	Tumortyp, Differenzierungsgrad	25
4.2	Expression von uPA	
4.2.1	uPA-Transkripte im Normalgewebe, radiäre Narbe, Mastopathien, duktaler Hyperplasie und Papillom	29
4.2.2	uPA-Transkripte in malignen Läsionen	
	▪ DCIS	29
	▪ Invasive Karzinomen	30
4.3	Expression von PAI-1	
4.3.1	PAI-1-Transkripte im Normalgewebe, radiäre Narbe, Mastopathien, duktale Hyperplasie und Papillom	34
4.3.2	PAI-1-Transkripte in malignen Läsionen	
	▪ DCIS	34
	▪ Invasive Karzinome	34
4.4	Expression von tPA	
4.4.1	tPA-Trankripte im Normalgewebe, radiäre Narbe, Mastopathien, duktaler Hyperplasie und Papillom	40
4.4.2	tPA-Transkripte in malignen Läsionen	
	▪ DCIS	40
	▪ Invasive Karzinome	41
4.5	Vergleich der biochemischen Werte (ELISA) von uPA und PAI-1 mit RNA-<i>in situ</i>-Analysen	44
5	Diskussion	46-69
5.1	Methode	
	Theoretischer Hintergrund der RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	46
	Allgemeine Vorbemerkung zur Methode Einführung	47

5.2	Einführung	48
5.2.1	Karzinogenese der Mammaneoplasien	49
5.2.2	Prognostische Parameter des Mammakarzinoms	50
5.2.3	Die Proteinasen uPA, PAI-1 und tPA	56
5.3	<i>In situ</i>-Detektion der untersuchten Proteinasen	
5.3.1	<i>In situ</i> -Detektion der uPA-Expression	60
5.3.2	<i>In situ</i> -Detektion der PAI-1-Expression	64
5.3.3	<i>In situ</i> -Detektion der tPA-Expression	67
5.4	Vergleich der biochemischen Werte (ELISA) von uPA und PAI-1 mit RNA-<i>in situ</i>-Analysen	68
6	Zusammenfassung	70-71
7	Literaturverzeichnis	72-84
8	Anhang	85-93
8.1	Untersuchungsgut	85
8.2	Reagenzien, Lösungen und Verbrauchsstoffe	
8.2.1	Chemikalien und Chemikaliengemische	86
8.2.2	Enzyme, Enzympuffer und Marker	87
8.2.3	Alkohole	87
8.2.4	RNase-freie Lösungen, die autoklaviert werden	88
8.2.5	RNase-freie Lösungen, die nicht autoklaviert werden	89
8.2.6	Lösungen, die nicht RNase-frei sein müssen	91
8.2.7	Radioisotop	91
8.2.8	Photochemikalien	92
8.3	Biochemische Werte von uPA und PAI-1 (ELISA)	93
9	Danksagung	94
10	Lebenslauf	95
11	Erklärung	96

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen:

Tab. 2.1	WHO-Klassifikation der Mammatumoren	4
Tab. 3.1	Absolute Häufigkeiten der im Untersuchungsgut erfassten Diagnosen	14
Tab. 3.2	Sonden nach Plasmidgröße und entsprechenden Endonukleasen und Polymerasen	15
Tab. 4.1	„Grading“ in Abhängigkeit vom Karzinomtyp	25
Tab. 4.2	Lymphknotenstatus in Abhängigkeit vom Karzinomtyp	26
Tab. 4.3	Lymphknotenstatus in Abhängigkeit vom „Grading“	26
Tab. 4.4	mRNA-Expression im Normalgewebe und Radiäre Narbe	26
Tab. 4.5	mRNA-Expression in Mastopathien	26
Tab. 4.6	mRNA-Expression in <i>in situ</i> -Karzinomen (DCIS)	27
Tab. 4.7	mRNA-Expression in invasiven Karzinomen	27
Tab. 4.8	uPA-Expression in Tumor- und Stromazellen nach dem Tumortyp	30
Tab. 4.9	Kreuztabelle uPA-Expression in Stromazellen und Lymphknotenstatus	31
Tab. 4.10	Kreuztabelle uPA-Expression in Tumorzellen und Lymphknotenstatus	32

Tab. 4.11	PAI-1-Expression in Tumor-und Stromazellen nach dem Tumortyp	35
Tab. 4.12	Kreuztabelle PAI-1-Expression in Stromazellen und „Grading“	36
Tab. 4.13	tPA-Expression in Tumor-und Stromazellen nach dem Tumortyp	41
Tab. 4.14	Kreuztabelle tPA-Expression im Läppchen-und Gangepithel und Lymphknotenstatus	42
Tab. 4.15	Analyse der biochemischen uPA und PAI-1 Werte (ELISA)	44
Tab. 5.1	Pathologisches Staging-System	51
Tab. 5.2	Proteinasen und deren Hauptsubstrate	56
Tab. 8.1	Aufstellung des gesamten Untersuchungsgutes	85
Tab. 8.2	Biochemische Werte von uPA und PAI-1 (ELISA)	93

Abbildungen:

Abb. 3.1	Van Nuys Klassifikation (nach Silverstein <i>et al.</i> 1995)	13
Abb. 3.2	Prozentuale Verteilung der im Untersuchungsgut erfassten Diagnosen Polymerasen	14
Abb. 4.1	Prozentuale Verteilung des histologischen „Grading“ im Untersuchungsgut	25
Abb. 4.2	Absolute Häufigkeitsverteilung der uPA-Expression in invasiven Karzinomen	31
Abb. 4.3	Foto uPA-Expression (Fallnr. 101)	33
Abb. 4.4	Foto uPA-Expression (Fallnr. 101)	33
Abb. 4.5	Absolute Häufigkeitsverteilung der PAI-1-Expression in invasiven Karzinomen	35
Abb. 4.6	Foto PAI-1-Expression (Fallnr. 101)	36
Abb. 4.7	Foto PAI-1-Expression (Fallnr. 12)	37
Abb. 4.8	Foto PAI-1-Expression (Fallnr. 46)	37
Abb. 4.9	Foto PAI-1-Expression (Fallnr. 63)	38
Abb. 4.10	Foto PAI-1-Expression (Fallnr. 63)	38
Abb. 4.11	Foto PAI-1-Expression (Fallnr. 101)	39
Abb. 4.12	Foto PAI-1-Expression (Fallnr. 101)	39
Abb. 4.13	Foto PAI-1-Expression (Fallnr. 25)	40
Abb. 4.14	Absolute Häufigkeitsverteilung der tPA-Expression in invasiven Karzinomen	42
Abb. 4.15	Foto tPA- Expression (Fallnr. 12)	43
Abb. 5.1	Invasion eines malignen Tumors nach Böcker	55

1 Abkürzungsverzeichnis

APES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
APMA	<i>4-aminophenylmercuric acetate</i>
BM	Basalmembran
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CLIS	<i>Carcinoma lobulare in situ</i>
DCIS	Duktales <i>Carcinoma in situ</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	duktale Hyperplasie
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithioeritol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LK	Lymphknoten
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
OT	Objektträger
PA	Plasminogenaktivator
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor type 1</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd

PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Standard saline citrate</i>
TAE	<i>Tris-acetic acid-EDTA</i>
TEA	Triethanolamin
TES	<i>Tris-EDTA-saline</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tPA	<i>Tissue-type plasminogen activator</i>
uPA	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
UPA-R	<i>Urokinase plasminogen activator receptor</i>

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom zählt in den westlichen Ländern zu den häufigsten Karzinomen der Frau (19-26%), wobei die Inzidenz der Erkrankung in den letzten 50 Jahren kontinuierlich zugenommen hat. Allein in Deutschland liegt die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen etwa bei 43.000 Fällen, in den Vereinigten Staaten bei 180.000 Fällen (Schmidt-Matthiesen *et al.* 1998; Rubin u. Farber 1999; Meuret 1995). Durch moderne Früherkennungsmaßnahmen und ständige Weiterentwicklung der Hormon- und Pharmakotherapie in den letzten Jahren konnte eine Reduzierung der Mortalität erreicht werden. Dennoch erkrankt auch heute noch jede neunte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs und nahezu jede vierte verstirbt an dieser malignen Systemerkrankung. Zahlreiche klinische Studien und experimentelle Arbeiten spiegeln das weltweite Interesse an der Erforschung des Mammakarzinoms wider (Meuret 1995).

Die Pathogenese des Mammakarzinoms ist nur teilweise verstanden. Durch epidemiologische, molekularbiologische und genetische Studien konnten Faktoren herausgearbeitet werden, die vermutlich mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert sind (Rubin u. Farber 1999). Bei der Entstehung des Mammakarzinoms spielen genetische Faktoren eine bedeutende Rolle, die mit einer Mutation des Tumorsuppressorgens p 53 oder mit Mutationen des BRCA1- oder BRCA2-Gens einhergehen. Zudem ist der hormonelle Status von Bedeutung. So sind eine frühe Menarche und späte Menopause mit einem höheren Mammakarzinomrisiko assoziiert. Aber auch bei Frauen, die in einem höheren Lebensalter erstmalig schwanger wurden und bei kinderlosen Frauen soll das Krankheitsrisiko erhöht sein. Die ungleiche geographische Verteilung der Mammakarzinominzidenz mit einer vier- bis fünffach höheren Rate in westlichen industrialisierten Ländern im Vergleich zu weniger entwickelten Ländern, sowie Migrationsstudien legen nahe, dass der Lebensstil einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat. Hierbei werden vor allem die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten mit einer Zunahme der gesamten Kalorienaufnahme durch eine Steigerung des Fettkonsums sowie ein vermehrter Alkoholkonsum mit einer erhöhten Erkrankungsinzidenz in Zusammenhang gebracht.

Ein erhöhtes Risiko für die Brustkrebsentwicklung besteht zudem bei einer radioaktiven Strahlenexposition vor allem in jungen Jahren und bei Frauen mit mastopathischen Veränderungen, die einer atypischen Hyperplasie entsprechen (Rubin u. Farber 1999).

2.2 Klassifikation der Mammatumoren

Das Mammakarzinom ist eine sehr heterogene Erkrankung und zeigt eine große Variabilität bezüglich seines biologischen und klinischen Verhaltens. Die derzeit gültige WHO Klassifikation der Mammatumoren gibt die Vielzahl maligner und benigner Erkrankungen der weiblichen Brustdrüse wieder (Tab.2.1). Auf Läsionen, die in dieser Studie untersucht wurden, wird im Anschluss näher eingegangen.

Tab. 2.1: WHO-Klassifikation der Mammatumoren (1981)

I. Epitheliale Tumoren

A. Gutartige Tumoren

1. Intraduktales Papillom
2. Adenom der Mamille
3. Adenom: **a.** tubuläres
b. laktierendes
4. Andere

B. Bösartige Tumoren

1. Nichtinfiltrierende Tumoren: **a.** Intraduktales Karzinom (DCIS)
b. Carcinoma lobulare *in situ* (CLIS)
2. Infiltrierende Tumoren : **a.** Infiltrierendes duktales Karzinom
b. Infiltrierendes duktales Karzinom mit dominierender intraduktales Komponente
c. Infiltrierendes lobuläres Karzinom
d. Muzinöses Karzinom
e. Medulläres Karzinom
f. Papilläres Karzinom
g. Tubuläres Karzinom
h. Adenoid-zystisches Karzinom
i. Sekretorisches (juveniles) Karzinom
j. Apokrines Karzinom
k. Karzinom mit Metaplasie
1.Squamöser Typ
2.Spindelzelltyp
3.Kartilaginärer u. ossärer Typ
4.Gemischter Typ
l. Morbus Paget der Mamille

II. Gemischte mesenchymale und epitheliale Tumoren

- A. Fibroadenom**
- B. Phylloider Tumor (Cystosarcoma phylloides)**
- C. Karzinosarkom**

III. Verschiedene Tumoren

- A. Bindegewebstumoren**
- B. Hauttumoren**
- C. Tumoren des hämatopoetischen u. lymphatischen Gewebes**

IV. Unklassifizierte Tumoren

V. Dysplasie/fibrozystische Entartung

VI. Tumorartige Läsionen

- A. Duktale Ektasie**
- B. Entzündlicher Pseudotumor**
- C. Hamartom**
- D. Gynäkomastie**
- E. Andere**

Im folgenden wird auf anatomische Strukturen und pathologische Veränderungen der Mamma eingegangen.

2.2.1 Anatomie der Brustdrüse

Die Brustdrüse besteht aus 15-20 Einzeldrüsen (Lobi), die in radiär divergierender Form angeordnet sind und sich aus einer Vielzahl von Läppchen (Lobuli) zusammensetzen. Als Basisstruktur wird der Lobulus angesehen, der eine unterschiedliche Anzahl von Acini enthält. Acini und terminale Gänge werden von einer inneren Lage sekretorischer Zellen und einer äußeren (basale) Myothelschicht gebildet, die der Basalmembran direkt aufsitzen und von lockerem Mesenchym (intralobuläres Mantelgewebe) umgeben werden. Der gesamte Lobulus wird von einem zirkumlobulären Mantelgewebe umgeben. Dem terminalen Gang folgt ein intralobulärer Ausführungsgang, der in einen interlobulären Gang und schließlich dem Hauptausführungsgang im retromamillären Bereich mündet (Stegner 1986).

2.2.2 Mastopathien

Bei den Mastopathien handelt es sich um die häufigste pathologische Veränderung der Brustdrüse, die durch eine Vielzahl hormonabhängiger, proliferativer und regressiver Veränderungen gekennzeichnet ist. Durch Fibrosklerose kann es zur Entwicklung von Mikro- und Makrozystenbildungen kommen; es gehören aber auch Veränderungen durch Epithelhyperplasien, Adenosen, Papillomatosen und Ödembildungen sowie ein Umbau der mesenchymalen Drüsenstruktur dazu. Eine Schweregradeinteilung erfolgt bezogen auf die Epithelveränderungen nach Tavassoli in Grad I bis III (Martius *et al.* 1996). Nur ein kleiner Teil der proliferativen Mastopathien, die von der WHO als Mammadysplasien bezeichnet werden, neigen zur Entstehung eines Mammakarzinoms. Statistisch wird ein 1,5 bis zweifach erhöhtes Risiko für Patientinnen mit Mastopathien, bei atypischen Mastopathien sogar ein 4 bis 5-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer bösartigen Neoplasie angegeben (Rubin u. Farber 1999).

Als Ursache der Mastopathie gibt es bislang keine endgültige Erklärung; eine hormonelle Imbalance der Östrogene und Gestagene mit einem Überwiegen der Östrogene scheint von zentraler Bedeutung zu sein.

2.2.3 Radiäre Narbe

Bei der radiären Narbe handelt es sich um eine pseudo-infiltrative Läsion ohne Kapsel. Eine Entstehung von Karzinomen durch Proliferation des duktales und tubulären Gewebes radiärer Narben ist möglich, sodass die radiäre Narbe als potentiell präkanzeröse Veränderung angesehen wird (Sloane *et al.* 1993).

2.2.4 *In situ*-Karzinome

Bei dem *Carcinoma in situ* der Mamma handelt es sich definitionsgemäß um einen Tumor, der die Basalmembran der Milchgänge und Acini noch nicht durchbrochen hat und sich ausschließlich innerhalb des Drüsengewebes befindet. Histologisch unterscheidet man zwei Gruppen: die duktales *in situ*-Karzinome (DCIS), die durch die maligne Transformation von Epithelzellen innerhalb des Milchgangssystems entstehen und die wesentlich seltener vorkommenden lobulären *in situ*-Karzinome (CLIS).

Bei letzteren liegt eine Kanzerisierung der Lobuli vor, die Zellen sind eher kleiner und zeigen ein einheitlicheres Bild im Vergleich zum DCIS (Meuret 1995; Rubin u. Farber 1999; Martius *et al.* 1996).

Beim DCIS sind die Milchgänge vollkommen oder teilweise mit einem breiten atypischen Epithel ausgefüllt. Histologisch ist die Gruppe der Intraduktalen Karzinome sehr inhomogen, sodass sich zunächst eine weitere Subklassifizierung in 5 Typen etabliert hat. Diese Einteilung in den Komedotyp, kribriformen, mikropapillären, papillären und soliden Typ wurde kürzlich durch die neue prognostische Van-Nuys-Klassifikation ersetzt. Der Vorteil der Van-Nuys-Klassifikation besteht darin, dass sie im Vergleich zu anderen Klassifikationen morphologisch relativ einfach und reproduzierbar durchzuführen ist und prognostische Bedeutung hat (Leitlinien für das DCIS 1998).

Als Voraussetzung für die histologische Diagnose eines DCIS gilt, dass ein Durchbruch der Basalmembran und eine Invasion des Stromas in mehreren Stufenschnitten nicht nachzuweisen sein darf. Es werden dennoch in 1-4% ohne einen mikroskopischen Hinweis auf eine Stromainvasion regionäre Lymphknotenmetastasen festgestellt (Bahnsen *et al.* 1985; Warneke 1985). Da es sich bei dem DCIS in der Regel um einen nicht palpablen Tumor handelt, wird die Diagnose häufig als inzidentieller Befund im Rahmen einer Biopsieentnahme gestellt oder im speziellen Fall des Komedokarzinoms aufgrund mammographischer Mikroverkalkungen. 20-30% aller Patientinnen, die sich mit dieser Läsion präsentieren und sich keiner weiteren Therapie unterziehen entwickeln ein invasives Karzinom (Rubin u. Farber 1999).

2.2.5 Invasive Karzinome

Durchbrechen die Tumorzellen die umgebende Basalmembran und gelangen so in das angrenzende Stroma, so liegt ein invasives Karzinom vor. Durch die Ausbreitung im gefäßführenden Bindegewebe werden Intravasation und Extravasation möglich, wobei die umgebende Basalmembran der Gefäße ebenfalls durchdrungen wird (Liotta *et al.* 1983).

➤ Invasiv duktales Karzinom

Infiltrierende duktales Karzinome ohne spezielle Differenzierung (die auch als *not otherwise specified*, NOS bezeichnet werden) sind mit 65-80% die häufigste Form aller Brustkrebse.

Histologisch zeigt sich in dieser Gruppe eine große morphologische Varianz mit überwiegend soliden und glandulären Wachstumsmustern und unterschiedlich ausgeprägten Fibrosierungen (Meuret 1995).

Die Entstehung erfolgt häufig multizentrisch und die invasiven duktaalen Karzinome sind oft von DCIS-Anteilen umgeben (Martius *et al.* 1996)

➤ **Invasiv lobuläres Karzinom**

Bei den infiltrierenden lobulären Karzinomen handelt es sich, nach dem duktaalen Karzinom, um die zweithäufigste Form infiltrierender Tumoren. Histologisch gekennzeichnet ist der klassische Typ durch kleinzellige, in soliden Strängen, seltener in zeldichten Komplexen wachsende Zellen mit einer starken produktiven Fibrose. Es zeigt sich eine Neigung zur Multizentrität und oft sind auch andere präinvasive und invasive Herde in der Brust nachzuweisen (Martius *et al.* 1996).

➤ **Tubuläres Karzinom**

Das tubuläre Karzinom ist eine seltene Sonderform der invasiven Karzinome. Dennoch gewinnt es zunehmend an Bedeutung, da diese meist kleinen Tumore im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung immer häufiger diagnostiziert werden (Meuret 1995).

Es ist sehr hochdifferenziert und besteht aus infiltrierenden Gängen mit ein bis zweilagigen regelmäßigen Zellen.

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Diagnose bei vielen Patientinnen in einem frühen Stadium gestellt wird und 84-92% einen positiven Östrogenrezeptorstatus haben (Holland *et al.* 2001). Die Prognose des tubulären Karzinoms ist gut und eine Heilung ist meistens durch operative Maßnahmen möglich (Rubin u. Farber 1999).

➤ **Medulläres Karzinom**

Die Zellen des medullären Karzinoms, welches 5-10% der invasiven Karzinome ausmacht, sind sehr pleomorph und zeichnen sich durch einen hohen Mitoseindex, Nekrosen und Hämorrhagien aus. Die Prognose ist trotz der ausgesprochen hohen Proliferationsaktivität günstiger als bei infiltrierenden lobulären oder duktaalen Karzinomen (Meuret 1995; Rubin u. Farber 1999).

➤ **Muzinöses Karzinom**

Das muzinöse Karzinom ist gekennzeichnet durch kleine Ansammlungen epithelialer Zellen, die gelegentlich als Drüsenformation zusammengesetzt sind und sich in extrazellulärem Mucos befinden (Rubin u. Farber 1999).

2.3 Prognostische Parameter des Mammakarzinoms

Eine Einschätzung der Prognose des Mammakarzinoms, welches durch lokale Aggressivität und Neigung zu metastasierendem Wachstum charakterisiert ist, kann allein histologisch nicht gemacht werden. Zur Durchführung einer optimalen und individualisierten Therapie haben sich in den letzten Jahrzehnten prognostische Parameter etabliert, die zusammengenommen den zu erwartenden Krankheitsverlauf annäherungsweise beschreiben können. Zu diesen klassischen, morphologischen prognostischen Parametern gehört die Tumorgraduierung („Grading“), die Größe des Primärtumors und der lokoregionäre Lymphknotenbefall sowie auch die Bestimmung der Steroidrezeptoren (siehe auch Diskussion). In der letzten Zeit wurden intensive Forschungsarbeiten betrieben, mit dem Ziel zuverlässigere prognostische Parameter zu finden, die vor allem für die Patientengruppe der nodalnegativen Fälle angewendet werden können. Für die Patienten der nodalnegativen Mammakarzinome, die zahlenmäßig in etwa Zweidrittel aller neu diagnostizierten Mammakarzinome ausmachen, existieren zur Zeit keine weiteren zuverlässigen prognostischen Marker. Da in der Gruppe der nodalnegativen Mammakarzinome ca. 70% der Patientinnen durch eine operative Therapie geheilt werden können, während 30% mit einem Rezidiv rechnen müssen, sind neue Marker für eine Zuordnung in eine dieser Gruppen dringend notwendig. Für Patientinnen mit einem höheren Rezidivrisiko kommen somit zusätzliche Therapieverfahren (Chemotherapie, Bestrahlung) in Betracht (Duffy 2000). Zahlreiche biochemische Marker, wie uPA, PAI-1, Kathepsin D,B und L, Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF, TGf α , Onkogene (HER-2, p53) und Marker zur Erfassung der Proliferationskinetik (s-Phase-Fraktion, 3HTyminmarkierungsindex, DNA- Flußzytometrie, Ki-67-Gens) wurden als potentielle prognostische Marker für Brustkrebs diskutiert. Hierunter zeigten sich vor allem die Faktoren des Plasminogensystems, der Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) und sein Inhibitor Typ 1 (PAI-1) als besonders vielversprechend (Duffy 2000; Meuret 1995).

2.4 Die Proteinasen uPA, PAI-1 und tPA

Die Proteinasen uPA und PAI-1 und tPA sind Faktoren des Plasminogenaktivierungssystems.

Hierzu gehören außerdem der Urokinaserezeptor (uPAR oder CD) und der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 2 (PAI-2), die in dieser Studie nicht weiter untersucht wurden. Bei uPA und PAI-1 handelt es sich um Schlüsselfaktoren der proteolytischen Kaskade, die an den Prozessen der Tumorinvasion mit Durchbrechen der Basalmembran und Intravasation beteiligt sind. Neben der entscheidenden Rolle, die das fibrinolytische System bei der Pathogenese maligner Erkrankungen spielt, ist es auch an zahlreichen physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Wundheilung, Angiogenese, Gewebeneubildung, Reproduktionsvorgängen und der intravaskulären Auflösung von Fibrinthromben beteiligt (Bell 1996; Duffy 1996; 2000; Harbeck *et al.* 1999,2001).

1988 stellten Duffy *et al.* erstmals einen Zusammenhang zwischen erhöhter enzymatischer Aktivität von uPA im Tumorgewebe von Mammakarzinomen und einer signifikant ungünstigeren Prognose mit einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit fest. Diese Ergebnisse konnten durch viele andere Studien, die den Proteasennachweis mit ELISA durchführten bestätigt werden (Jänicke *et al.* 1990; Foekens *et al.* 1992; Spyrtos *et al.* 1992; Grondahl-Hansen *et al.* 1993; Ferno *et al.* 1996; Sumiyoshi *et al.* 1991). Vor allem wurde deutlich, dass uPA als prognostischer Marker bei Patientinnen ohne axilläre Lymphknotenbeteiligung, für die neue prognostische Marker notwendig sind, angewandt werden kann (Jänicke *et al.* 1990,1993; Foekens *et al.* 1992; Duffy *et al.* 1992,1994; Ferno *et al.* 1996). Für die Protease PAI-1 als prognostischen Marker konnten Jänicke *et al.* 1993 erstmals einen Zusammenhang mit einer aggressiven Erkrankung in lymphknotennegativen und positiven Patientinnen feststellen (Jänicke *et al.* 1993).

Für die andere Form des Plasminogen Aktivators, der *tissue-type-plasminogen activator* (tPA) konnten Chappuis *et al.* (2001) und Yamashita *et al.* (1993) ebenfalls einen prognostischen Zusammenhang beim Mammakarzinom feststellen. Andere Studien beurteilten die tPA-Expression im Mammakarzinom als zufällig, da maligne und benigne Mammatumore gleiche tPA-Expressionsintensitäten aufwiesen (Jankun *et al.* 1993; Sumiyoshi *et al.* 1991).

Obwohl die bedeutende Rolle von uPA und PAI-1 in malignem Geschehen durch zahlreiche Studien als bewiesen betrachtet werden kann, so ist die präzise zelluläre Lokalisation der Proteasen und deren mRNA weiterhin spekulativ.

Die Proteine wurden in Tumorzellen, Endothelzellen, normalem duktalem Epithel, Fibroblasten und Makrophagen detektiert (Umeda *et al.* 1997).

Die Ergebnisse von immunhistochemischen und *in situ*-Hybridisierungsarbeiten (ISH-Studien), die dieser Fragestellung nachgingen, sind teilweise diskrepant (Nielsen *et al.* 1996; Fisher *et al.* 2000; Tetu *et al.* 1998,1999; Umeda *et al.* 1997; Escot *et al.* 1996).

Diese Arbeit verfolgt als Ziel, die zelluläre Lokalisation der Proteasen uPA, PAI-1 und tPA in gut- und bösartigen Mammaläsionen mittels RNA-*in situ*-Hybridisierung festzustellen, da gerade diese Studien in der Literatur spärlich vertreten sind.

Die Zielstellung soll im folgenden näher erläutert werden.

2.5 Zielstellung

Die zelluläre Lokalisation von Gentranskripten der Komponenten des Plasminogenaktivierungssystems kann durch die RNA:RNA-*in situ*-Hybridisierung festgestellt werden. Die RNA:RNA-*in situ*-Hybridisierung ermöglicht die Darstellung von Gentranskripten (mRNA) und ihren Vorstufen in Zellen direkt im Gewebe (Leitch *et al.* 1994). Da mRNA extrazellulär durch Ribonukleasen abgebaut wird, kommt sie ausschließlich in der Synthesezelle vor.

In situ-Analysen zum Nachweis von Transkripten proteolyserelevanter Faktoren wie uPA, PAI-1 und tPA sind wie schon erwähnt nicht nur sehr selten, sondern haben auch noch teilweise diskrepante Ergebnisse (Nielsen *et al.* 1996; Fisher *et al.* 2000; Tetu *et al.* 1998,1999; Umeda *et al.* 1997; Escot *et al.* 1996).

Ziel der vorgestellten Untersuchung ist die Betrachtung der zellulären Herkunft und Expressionsmuster der uPA, PAI-1 und tPA kodierender Gene in benignen und malignen Brustdrüsenveränderungen durch semiquantitative Auswertung. Hierbei wird nicht ein Nachweis der eigentlichen Enzyme und deren Aktivität geführt.

Es wurde folgenden *Fragen* nachgegangen:

- Welche Zelltypen exprimieren uPA, PAI-1 und tPA hauptsächlich?
- Welche Expressionsmuster zeigen benigne Mammaläsionen?
- Gibt es Unterschiede der Expressionsintensität zwischen malignen und benignen Veränderungen?
- Zeigte das Expressionsmuster und die Expressionsintensität Unterschiede zwischen nodalnegativen und nodalpositiven Mammakarzinomen und benignen Mammaläsionen?
- Ist ein Zusammenhang zwischen der Expressionsintensität in der *in situ*-Analyse mit biochemisch ermittelten Werten für die Enzyme uPA und PAI-1 (ELISA) festzustellen?

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Die Grundlage der Untersuchung bildeten 108 Mammaexzisate („wide excision“, Exzisionsbiopsien) und Mastektomiepräparate, die aus dem Archiv der Abteilung für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf stammten und in dem Zeitraum von 1985 bis 1998 entnommen wurden. Das Alter der Patientinnen zur Zeit der Probenentnahme lag zwischen 29 und 85 Jahren (Mittelwert 56,4 Jahre).

An den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde in der Routinediagnostik am HE-gefärbten Präparat eine Klassifizierung nach histomorphologischen Gesichtspunkten in Anlehnung an Azzopardi durchgeführt (Azzopardi 1979).

Im Untersuchungsgut enthalten sind 73 Fälle, von denen Daten durch eine standardisierte biochemische Untersuchung von uPA und PAI-1 (Imubind UPA, PAI-1, Elisa kit; American diagnostica inc., Greenwich, USA) zur Verfügung standen.

Die Einteilung der Mastopathien wurde nach ihrem Schweregrad in einfache, fibrös-zystische Mastopathie und duktale Hyperplasie vorgenommen.

Die Einteilung der Intraduktalen Karzinome (DCIS) erfolgte nach der Van-Nuys Klassifikation, die 1995 von Silverstein und Mitarbeitern erarbeitet wurde. Die Van Nuys Klassifikation stützt sich auf die beiden morphologischen Kriterien des „Kerngrading“ und Komedo-Nekrosen, eine Beurteilung, die im Vergleich zu anderen Klassifikationen morphologisch relativ einfach zu reproduzieren und durchführbar ist.

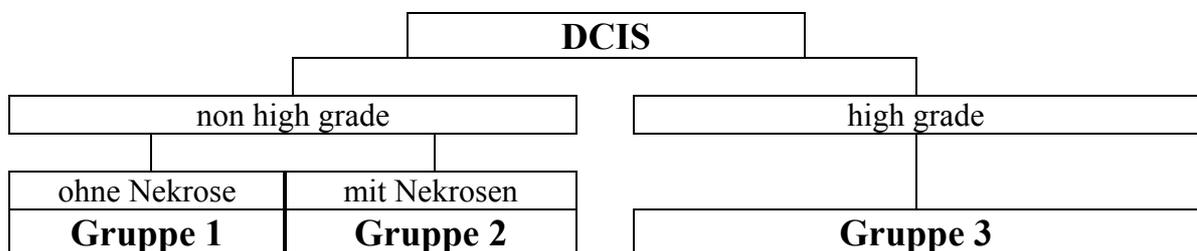


Abb. 3.1: Van Nuys Klassifikation (nach Silverstein *et al.* 1995)

Eine Einteilung des DCIS erfolgt nach der Van Nuys-Klassifikation in 3 Typen, im Gegensatz zu der alten Klassifikation, die das DCIS in vier Subgruppen, das Komedokarzinom, das kribriforme, das solide und das papilläre Karzinom aufteilt (Leitlinien für das DCIS 1998).

Die invasiven Karzinome wurden in Anlehnung an Bloom und Richardson hinsichtlich des Tumortyps und Differenzierungsgrades („Grading“) reklassifiziert (Bloom u. Richardson 1957).

Tabelle 3.1 gibt die absoluten Häufigkeiten der im Untersuchungsgut erfassten Diagnosen wieder. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 3.1 die prozentuale Verteilung der im Untersuchungsgut erfassten Diagnosen graphisch dargestellt.

Im Anhang ist in Tabelle 8.1 das gesamte Untersuchungsgut aufgelistet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien (Lösungen und Reagenzien) sind ebenfalls im Anhang aufgeführt.

Tab. 3.1: Absolute Häufigkeiten der im Untersuchungsgut erfassten Diagnosen

Diagnose	Anzahl der Fälle
Normalgewebe	3
Radiäre Narbe	1
Mastopathie	7
DCIS	10
Duktales Karzinom	65
Lobuläres Karzinom	15
Muzinöses Karzinom	4
Tubuläres Karzinom	2
Medulläres Karzinom	1
Gesamtzahl der Fälle	108

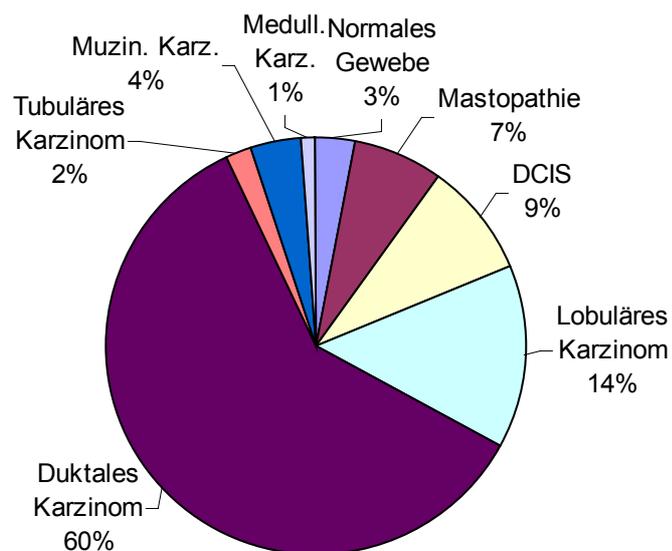


Abb. 3.2: Prozentuale Verteilung der im Untersuchungsgut erfassten Diagnosen

3.2 Methoden

3.2.1 Plasmide

Die Plasmide mit den entsprechenden cDNA-Abschnitten wurden freundlicherweise von Dr. M. Bauer (Berlin) und Prof. Dr. H. Herbst (Münster) zur Verfügung gestellt. Die mit den komplementären mRNA hybridisierenden Sonden werden als Antisense (AS)–Sonden bezeichnet, die dazu komplementären, also mit der mRNA identischen Sequenzen heißen Sense (S)–Sonden und dienen als Negativ-Kontrolle (Sambrook *et al.* 1989).

3.2.2 *In situ*-Hybridisierung:

Beschreibung der Versuche und Arbeitsvorschriften

In-vitro-Transkription

Zur radioaktiven Markierung der Sonden wird die Transkription unter Einbau von 35 S-UTP durchgeführt. Der „Antisense“-Strang hybridisiert mit der nachzuweisenden mRNA der Zelle und kann als eigentliche Sonde betrachtet werden.

In dieser Arbeit wurden für die Linearisierung der Plasmide die Endonukleasen *EcoRI* (aus *Escherichia coli*) und *HindIII* (aus *Haemophilus influenzae*) verwendet. In der nachfolgenden Tabelle 3.2 werden die verwendeten Sonden und die benötigten Nukleasen und Polymerasen aufgelistet.

Tab. 3.2 : Auflistung der Sonden nach Plasmidgröße und entsprechenden Endonukleasen und Polymerasen

Sonde	Insertgröße	Endonuklease-Polymerase : Antisense	Endonuklease-Polymerase : Sense
uPA	300 bp	<i>EcoRI</i> -SP6	<i>HindIII</i> -T7
PAI-1	788 bp	<i>EcoRI</i> -SP6	<i>HindIII</i> -T7
tPA	1,1 kB	<i>EcoRI</i> -SP6	<i>HindIII</i> -T7

Sondenherstellung

Zur Sondenherstellung wurde das Nukleotid 35 S–UTP verwendet.

Arbeitsprotokoll:

Folgende Komponenten wurden der Reihenfolge nach in Eppendorfröhrchen (auf Eis) pipettiert und kurz anzentrifugiert:

- 1 µl Template (linearisiertes Plasmid, ca. 1 µg/µl)
- 0,5 µl 100mM DTT
- 1 µl 10x Transkriptionspuffer
- 1 µl rNTPs (ACG:jeweils 10mM)
- 0,5 µl RNasin (RNase-Inhibitor, 4000 U/l)
- 5 µl 35 S-UTP (ca. 60 µCi)

Es folgt die Zugabe von 1 µl RNA-Polymerase (SP6 oder T7-Polymerase, der Einsatz der jeweiligen Polymerase hängt ab von der Plasmid-Orientierung: Antisense oder Sense). Das Röhrchen durfte nicht geschüttelt werden, da Polymerasen sehr empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung sind. Der Ansatz wurde bei einer Temperatur von 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden erneut 0,5 µl der entsprechenden Polymerase hinzugefügt und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

In diesen Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert:

- 5 µl tRNA (50 mg/ml)
- 0,5 µl RNasin
- 1 µl DNase (RNase-frei) bei 37°C für 10 min inkubieren
- 73 µl Aqua dest.
- 10 µl 3M Na-Acetat (pH 6)
- 100µl Phenol/Chloroform (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol = 25:24:1)

Nach Zugabe oben genannter Komponenten wurde das Eppendorfröhrchen vorsichtig geschüttelt und für 2 Minuten bei 1000 rpm/min. zentrifugiert, bis zur Trennung von zwei Phasen. In neue Eppendorfröhrchen wurden dann jeweils 160 µl 100% Ethanol pipettiert und 80 µl der wässrigen Phase des Phenol-behandelten Ansatzes hinzugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig durch Pipettieren gemischt und über Nacht bei -2°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Sonde bei 4°C für 30 Minuten bei 13000 rpm/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und 500 µl 70% Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde der Ansatz bei einer Temperatur von 4°C erneut für 5 Minuten

zentrifugiert. Das Pellet wurde für 15 Minuten bei RT getrocknet und in 5 µl 100 mM DTT und 45 µl DEPC-Aqua bidest. gelöst. Die anschließende Hydrolyse zerlegte die RNA zur besseren Gewebspenetration in kleinere Fragmente. Hierzu wurden zu den 50 µl Sondenlösung 50 µl alkalischer Hydrolysepuffer pipettiert. Die Hydrolysezeit bei 60°C errechnet sich nach folgender Formel:

$$T = \frac{L_o - L_f}{k * L_o * L_f}$$

T = Hydrolysezeit

L_o = Anfangslänge des RNA-Transkripts

L_f = Endlänge des RNA-Transkripts (0,15 kb)

k = 0,11 kb⁻¹ min⁻¹

Nach der alkalischen Hydrolyse erfolgte die sofortige Zugabe von 100 µl Stoppuffer, 20 µl 3 M Na-Acetat (pH 6) und 440 µl Ethanol. Der Ansatz wurde dann bei einer Temperatur von 70°C für 30 Minuten gelagert. Anschließend erfolgte bei 4°C eine Zentrifugation mit 13.000 rpm/min für 4 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und 0,75 ml 70 % Ethanol hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C für 4 Minuten wurde der Überstand ebenfalls verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Die Sonde wurde in 30 µl 10 mM DTT gelöst und bei -80°C gelagert.

Beschichtung der Objektträger

Zur Ermöglichung einer guten Kern- und Zellhaftung wurden die zuvor gebackenen, sauberen Objektträger beschichtet. Es ist eine Beschichtung mit APES durchgeführt worden, eine Substanz, die die Glasoberfläche mit geladenen Gruppen versieht und so die Bindung der Schnittpräparate unterstützt (Leitch *et al.* 1994)

Arbeitsprotokoll:

Die in Küvetteneinsätzen einsortierten OT nacheinander in die folgenden Reagenzien tauchen:

- 5 min. in Aceton
- 5 min. in 2%APES
- 2 x kurz in Aceton

- 2 x kurz in DEPC-H₂O, OT trockenen lassen (über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank); staubfrei lagern (z. B. in Aluminium-Folie)

Anfertigen der Gewebeschnitte

Das Untersuchungsgewebe, welches in der Routinediagnostik in Formaldehyd fixiert und in kleinen Blöcken in Paraffin eingebettet worden war, wurde zunächst gekühlt. Im Anschluss wurden mittels Mikrotom ca. 3 bis 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf die beschichteten Objektträger aufgezogen. Die Anzahl der Schnitte wurde so gewählt, dass für alle Sonden und mindestens zwei AS-Durchgängen für verschiedene Expositionszeiten sowie jeweils einem S-Durchgang genügend Schnitte vorhanden waren. Bis zur Verarbeitung wurden die Präparate staubfrei und unter Feuchtigkeitsverschluss in Gegenwart eines Trocknungsmittels (CaCl₂) aufbewahrt.

Prä-Hybridisierung

Zur Vorbereitung der Präparate für die Hybridisierung wurde zunächst die Deparaffinisierung durchgeführt, die das Gewebe grundsätzlich für die Sonden zugänglich macht. Im Anschluss wurden die Proben hydriert und mit Salzsäure behandelt, um basische Proteine von den RNA-Strängen zu entfernen und so das spezifische ISH-Signal später zu verstärken. Pronase verstärkt, durch Abbau von Nukleinsäure-assoziierten Proteinen die Permeabilität zu den *RNA-Targets*. Durch die Glycin-Behandlung wird die Pronase gestoppt und es folgt eine Nachfixierung der Präparate in 4% Paraformaldehyd. Vor der abschließenden Dehydrierung wurde ein Azetylierungsschritt mit Triethanolamin durchgeführt. Dieser ist sinnvoll zur Neutralisierung positiver Ladungen und somit Reduktion der unspezifischen Hintergrundsignale (Leitch *et al.* 1994; Brahic u. Haase 1978).

Arbeitsprotokoll:

In vertikale, gebackene Glasküvetten einsortierte und beschriftete OT mit den Schnitten werden wie folgt behandelt:

30 min.(besser: über nacht) in Xylol bei RT, dann 20 min. in Xylol bei RT auf dem Schüttler

- je 2 min. in 100%, 90%, 70% und 30% Ethanol bei RT
- 10 min. in 1 x PBS bei RT spülen

- 20 min. in 0,2 N HCl bei RT
- 30 s in 1 x PBS bei RT, danach nochmals 2 min. in 1 x PBS
- 10 min. in Pronase bei RT, danach 30 s in 0,1 M Glycin/1 x PBS
- 2 x 30 s in 1 x PBS spülen
- 10 min. in 4% Paraformaldehyd im Eiswasser, dann 3 min. in 1 x PBS bei RT
- 10 min. in 0,1 M Triethanolamin (pH 8, Essigsäureanhydrid unmittelbar vor Gebrauch zugeben); danach 5 min. in 1 x PBS
- je 2 min. in 30%, 70%, 90% und 100% Ethanol
- OT 1-2h bei RT trocken lassen.

Hybridisierung

Nach genau definierten Versuchsvorschriften wurden die markierten Gensonden auf die Gewebeschnitte aufgebracht. Dabei wurden mindestens zwei OT mit gleicher AS-Sonde und je ein Schnitt mit einer korrespondierenden S-Probe beschickt, um Entwicklungen nach verschiedenen Expositionszeiten zu ermöglichen.

Von den homogenisierten Hybridisierungslösungen, die das Milieu für die Hybridisierung darstellte, wurde so viel in das Sondengemisch hineinpipettiert, dass ca. 27 µl des fertigen Hybridisierungsgemisches für jeden OT zur Verfügung standen. Es entstand ein Verhältnis zwischen Hybridisierungslösung und Sondengemisch von 4:1. Durch das Formamid wurde gewährleistet, dass die Reaktion bei einer Temperatur stattfinden konnte, bei der keine Schädigung der Gewebestruktur zu erwarten war.

Gelöste Salze bestimmen die Ionenstärke und wirken stabilisierend auf Nucleinsäuredoppelstränge. Dextransulfat, ein polyanionisches Makromolekül diente zur Steigerung der Hybridisierungsgeschwindigkeit (Verdreifachung der Hybridisierungsgeschwindigkeit). Um zu verhindern, dass die Sonde mit unspezifischen Sequenzen hybridisiert, wurde tRNA verwendet.

Die Hybridisierung wurde weitestgehend luftdicht in einer feuchten Kammer bei 50°C durchgeführt, also etwa 20-25°C unter der Schmelztemperatur der RNA:RNA-Hybride (Leitch *et al.* 1994).

Arbeitsprotokoll:

Auslegen der Hybridisierungskammern mit mehrlagigem Zellstoff, mit der Lösung für die feuchte Kammer tränken und OT einsortieren.

- Hybridisierungslösung 30s niedertourig vortexen und bis zum Gebrauch in 50°C Wasserbad stellen (ebenso wie die Sondengemische), 200.000 cpm/Schnitt
- Sondengemisch 30s in 80°C-Wasserbad stellen und erforderliches Volumen der Hybridisierungslösung in das Sondengemisch pipettieren
- fertiges Hybridisierungsgemisch 30s vortexen
- je 27 µl gleichmäßig auf die Schnitte pipettieren und mit zugeschnittenem Parafilm bedecken (*American Can Company, Greenwich, CT, USA*), zum Schutz des Gewebes vor Austrocknung
- Kammer in Plastiktüten möglichst luftdicht verpacken
- Über Nacht (16-18 h) bei 50°C im Hybridisierungsofen inkubieren.

Waschen nach Hybridisierung

Die Waschschritte dienen vor allem der Entfernung locker und nicht spezifisch gebundener Sonden. Da gerade RNA-Sonden sehr fest am Präparat haften können, und einzelsträngige, nichthybridisierte Sonden, die lediglich das Hintergrundsignal erhöhen würden, entfernt werden sollten, erfolgte eine Behandlung mit RNaseA. Das Enzym RNase A greift die Doppelstränge dabei nicht an (Leitch *et al.* 1994).

Arbeitsprotokoll:

Nach zügiger, jedoch vorsichtiger Entfernung der Parafilm-Streifen werden die OT in vertikale, vorgewärmte Küvetten (welche zu diesem Zwecke nicht gebacken sein müssen) einsortiert und im Schüttelwasserbad gewaschen:

- 30 min. in Posthybridisierungs-Waschlösung bei 52°C
- nach regelrechter Entsorgung der ersten Waschlösung nochmals 4h in neuer Waschlösung bei 52°C
- 15 min. in vorgewärmter 1 x TES-Lösung (aus 10 x TES) bei 37°C waschen
- 30 min. in TES und RNase A inkubieren
- 10 min. in 1 x TES waschen, dabei die Lösung einmal wechseln
- 15 min. in 2 x SSC (aus 20 x SSC) bei RT
- 15 min. in 0,1 x SSC (aus 20 x SSC) bei RT
- je 10 s in 100% Ethanol bei RT
- 1-2 h bei RT trocknen lassen (oder über Nacht), dabei möglichst staubfrei abdecken.

Beschichtung der Objektträger mit Photoemulsion

Der Nachweis der radioaktiv markierten Sonde erfolgt durch Autoradiographie. Hierzu wurden die Objektträger in völliger Dunkelheit in die verflüssigte und verdünnte Emulsion getaucht, wobei auf eine rasche und möglichst luftblasenfreie Technik zu achten war. Anschließend wurden die OT getrocknet. Auf diese Weise konnte ein enger Kontakt des etwa 3-4 mm dünnen Films zu den Gewebeschnitten hergestellt werden und der Nachweis der gebundenen Sonde wurde später als Schwärzung des Autoradiogramms sichtbar (Leitch *et al.* 1994; Ausubel *et al.* 1994).

Arbeitsprotokoll:

Alle Arbeiten sind in der Dunkelkammer in völliger Dunkelheit zu verrichten:

- OT-Behälter und die verdünnten, bei 43°C im Wasserbad verflüssigte Photoemulsion auspacken
- OT einzeln gleichmäßig 1-2s in die Photoemulsion tauchen, abtropfen lassen und senkrecht in Ständer stellen
- Zuletzt einen unbeschichteten OT eintauchen, um die restliche Menge an Emulsion ablesen zu können, Emulsionsgefäß verschließen und in Aluminiumfolie einwickeln
- OT in den Ständern ca. 1 h trocknen lassen
- OT in luft- und lichtdichte Kartellboxen mit Kalziumchlorid-Päckchen als Trocknungsmittel einsortieren, dabei die Filmschicht keinesfalls berühren; Behälter verschließen und in Aluminiumfolie mehrmals einwickeln und beschriften
- Präparate bei 4°C lagern.

Entwicklung

Die Expositionszeiten gegenüber der radioaktiven Strahlung der gebundenen Riboproben lagen in Abhängigkeit von der mRNA-Menge im Präparat je nach Sonde zwischen 7 und 39 Tage. Für jede Sonde wurden zwei Entwicklungsdurchgänge (für uPA und PAI-1 anfänglich 3) nach verschiedenen Zeiten durchgeführt. Die Präparate der S-Sonde wurden jeweils zusammen mit der letzten korrespondierenden AS entwickelt.

Arbeitsprotokoll:

Zunächst wurden die Schnitte in der Dunkelkammer in absoluter Dunkelheit ausgepackt und in horizontale Küvetteneinsätze einsortiert, um sie anschließend nacheinander in folgende Lösungen zu tauchen:

- 3 min. in 50% Entwickler-Lösung (Küvetteneinsätze dabei leicht schwenken)
- 30 s in 1% Essigsäure
- 3 min. in 25% Fixierer-Lösung (Küvetteneinsätze dabei leicht schwenken)
- Präparate bei Licht 20 min. unter fließendem kaltem Leitungswasser spülen.

Gegenfärbung und Eindecken der Präparate

Zur Beurteilung der zellulären Morphologie der Gewebeschnitte und speziell der Umgebung der Hybridisierungssignale wurden die Präparate gegengefärbt. Hierzu wurde eine modifizierte Hämatoxylin-Eosin-Färbung gewählt, da diese sowohl die Identifikation von Zellkernen als auch Zytoplasma ermöglicht.

Mit Deckgläsern versehen und gesäubert konnten die Objektträger den nachfolgenden lichtmikroskopischen Untersuchungen unterzogen werden.

Arbeitsprotokoll:

Sämtliche in horizontalen Küvetten einsortierte OT werden folgendermaßen behandelt:

- 1 min. (eher kürzer) in Hämatoxylin eintauchen
- 3 min. wässern
- ca. 10 s in Eosin tauchen
- kurz wässern, bis das Wasser klar wird
- 2 x in 80% Ethanol tauchen, dann 3-4 x in 96% Ethanol eintauchen
- 1 min. in 100% Ethanol dehydrieren, danach nochmals 2-5 min. in 100% Ethanol
- 2 x kurz in Xylol tauchen, dann nochmals für 2 min. in Xylol stellen
- direkt aus dem Xylol die OT eindecken; hierfür wenig Einschlussmittel auf das Deckglas geben und dieses luftblasenfrei auf den Schnitt aufbringen.
- Nach Festwerden des Einschlussmittels die Rückseite der OT von überflüssiger Photoemulsion und Farbrückständen durch vorsichtiges Kratzen mit einer Klinge befreien.

3.2.3 Mikroskopische Auswertung der histologischen Schnittpräparate

Zunächst erfolgte eine mäanderartige Durchmusterung der Schnitte bei Übersichtsvergrößerung, um die Regionen mit auffälliger Signalgebung zu lokalisieren.

Anschließend wurden bei stärkerer Vergrößerung in mindestens fünf Bereichen mit ähnlich dichter Signalverteilung, die Silberkörner (*grains*) über 50 epithelialen bzw. mesenchymalen Zellen gezählt und der Mittelwert gebildet. Zudem sind korrespondierende Stellen in den Kontrollschnitten ausgezählt worden, um die Intensität des Hintergrundes (*backgrounds*) zu ermitteln. Um nun also einen positiven Zählwert (*count*) zu erhalten, ist dieser Wert von der Anzahl der *grains* der repräsentativen Zonen der jeweiligen AS-Schnitte abgezogen worden.

Der Hintergrund in den S-Fällen lag im Allgemeinen unter fünf *grains* pro Zelle, so dass dieser Wert als unspezifisches Signal in den entsprechenden AS-Fällen gewertet wurde. Ein *count* von mehr als 10 Silberkörnern pro Zelle (nach Abzug des Hintergrundsignals) galt als signifikant bzw. als positives Ergebnis.

Die Ergebnisse wurden folgendermaßen semiquantitativ erfasst:

- [-] kein spezifisches Signal
- [+] einige, verstreute, signifikant markierte Zellen
- [++] etwa 5-25% positive Zellen
- [+++] etwa 25-50% positive Zellen
- k. A. keine Analyse

3.2.4 Statistische Auswertung

Bei der hier durchgeführten Untersuchung handelt es sich um eine explorative Datenanalyse, die mit SPSS für Windows Version 10.1 durchgeführt wurde. Die Ergebnisse wurden in Häufigkeitstabellen bzw. durch Angabe von Maßzahlen deskriptiv dargestellt.

Um festzustellen, ob in bestimmten Untergruppen mehr als zufällige Abweichungen vorliegen, wurden für Häufigkeiten Kreuztabellen erstellt und mittels Chi-Quadrat-Test oder Prüfung auf lineare Assoziation untersucht. Bei Vierfelder-Tafeln wurde der exakte Test nach Fischer vorgezogen.

Für stetige Merkmale wurde im Zwei-Gruppen Vergleich der Mann-Whitney-Test und für mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis Test angewandt. Die nominalen P-Werte, die im Sinne statistischer Kenngrößen und nicht im Sinne der Testtheorie zu interpretieren sind, werden angegeben. Das bedeutet, dass ein P-Wert zum Beispiel von 0,08 dahingehend zu interpretieren ist, dass bei gegebener Unabhängigkeit zwischen den Merkmalen ein wie beobachteter oder noch extremerer Häufigkeitsunterschied bzw. Zusammenhang nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 8% auftreten würde.

Die mittels ELISA bestimmten Werte von uPA und PAI-1 werden neben den Angaben als stetiges Merkmal auch als dichotomes Merkmal entsprechend den Literaturangaben (Harbeck *et al.* 1998,1999,2001; Foekens *et al.* 1999; Schmitt *et al.* 1997) mit uPA größer gleich 3 ng/mg Protein und PAI-1 größer gleich 14 ng/mg Protein verwendet.

Aufgrund der relativ kleinen Fallzahlen ist bei der Interpretation der P-Werte zu bedenken, dass sich nur sehr deutliche Unterschiede mit ausreichender Macht nachweisen lassen.

4 Ergebnisse

4.1 Tumortyp, Differenzierungsgrad

Im folgenden wird das „Grading“ in Abhängigkeit des Karzinomtyps aller zum Untersuchungsgut gehörenden Karzinome betrachtet. Zur Veranschaulichung ist diese Verteilung in Abbildung 4.1 graphisch dargestellt. Es ist festzustellen, dass überwiegend Grad 2 und 3 Karzinome zum Untersuchungsgut gehörten. Die Re-Klassifizierung aller in die Untersuchung einbezogenen Mammakarzinome ergab folgende Verteilung:

Tab. 4.1: „Grading“ in Abhängigkeit vom Karzinomtyp

Differenzierungsgrad	Karzinome					Gesamt-zahl
	Tubulär	Lobulär	Duktal	Medullär	Muzinös	
Karzinom G 1	1	3	4	-	-	8
Karzinom G 2	1	12	29	-	2	44
Karzinom G 3	-	-	32	1	2	35

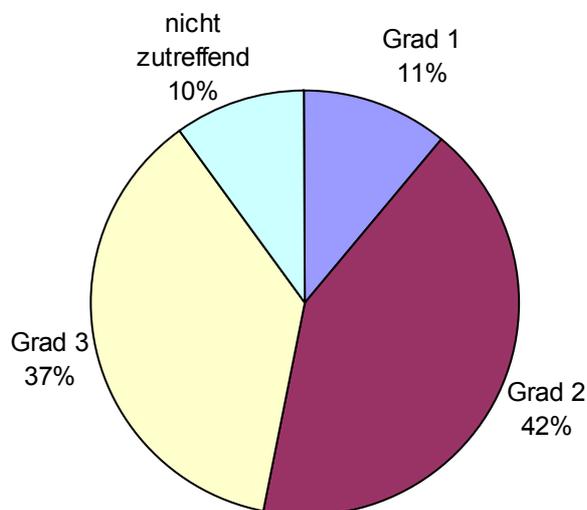


Abb. 4.1: Prozentuale Verteilung des histologischen „Grading“ im Untersuchungsgut

Tabelle 4.1 gibt den Lymphknotenstatus in Abhängigkeit vom Tumortyp wieder und in Tabelle 4.2 ist der Lymphknotenstatus in Abhängigkeit von dem histologischen Grading angegeben.

Es wird deutlich, dass im Untersuchungsgut die nodalpositiven Karzinome mit einer Fallzahl von 53, entsprechend 65% leicht überwiegen.

Tab 4.2: Lymphknotenstatus in Abhängigkeit vom Karzinomtyp

Gewebe	Nodalnegativ	Nodalpositiv
Lobuläres Karzinom	2	10
Tubuläres Karzinom	2	1
Muzinöses Karzinom	2	2
Medulläres Karzinom	0	1
Duktales Karzinom	23	39

Tab 4.3: Lymphknotenstatus in Abhängigkeit vom „Grading“

„Grading“	Nodalnegativ	Nodalpositiv
G 1	3	2
G 2	17	26
G 3	9	25
Gesamtzahl	29	53

Es folgt die Darstellung der Untersuchungsergebnisse in tabellarischer Form in Abhängigkeit der Diagnosen.

Tab. 4.4: mRNA-Expression im Normalgewebe und Radiäre Narbe

Fall-Nr.	Gewebe	uPA	PAI-1	tPA
1	Normalgewebe	-	-	k.A.
2	Normalgewebe	-	S +	k.A.
3	Normalgewebe	-	-	LG +++
4	Radiäre Narbe	-	S ++	LG ++

Tab. 4.5: mRNA-Expression in Mastopathien

Fall-Nr.	Gewebe	uPA	PAI-1	tPA
5	Einf. Mast.	-	-	k.A.
6	Einf. Mast.	-	S +	k.A.
7	Einf. Mast.	-	-	k.A.
8	Einf. Mast.	-	-	k.A.
9	Einf. Mast.	-	S +	LG ++
10	DH	LG +	E +	k.A.
11	Papillom	-	S ++	LG ++

Tab. 4.6: mRNA-Expression in *in situ*-Karzinomen (DCIS)

Fall-Nr.	Gewebe	uPA	PAI-1	tPA
12	DCIS Typ1	-	S ++	LG +
13	DCIS Typ 1	-	S +	LG ++
14	DCIS Typ 1	-	-	LG +
15	DCIS Typ 1	-	S +	LG +
16	DCIS Typ 2	-	-	LG +
17	DCIS Typ 2	-	S +	LG ++
18	DCIS Typ 3	-	S +	LG +
19	DCIS Typ 3	-	S +	LG +
20	DCIS Typ 3	-	-	LG ++
21	DCIS Typ 3	-	S +	S +

Tab. 4.7: mRNA-Expression in invasiven Karzinomen

Fall-Nr.	Gewebe	uPA	PAI-1	tPA
22	Lob. Karz. G 1	-	-	LG ++ T +
23	Lob. Karz. G 1	-	-	LG + T +++
24	Lob. Karz. G 1	-	T +	T +
25	Lob. Karz. G 2	S +	S ++	LG ++
26	Lob. Karz. G 2	-	S +	k.A.
27	Lob. Karz. G 2	T ++	-	k.A.
28	Lob. Karz. G 2	-	-	k.A.
29	Lob. Karz. G 2	-	S ++	LG +
30	Lob. Karz. G 2	-	-	-
31	Lob. Karz. G 2	S +	S ++	LG ++ T +
32	Lob. Karz. G 2	S +	S ++	LG +++
33	Lob. Karz. G 2	-	S ++	T +
34	Lob. Karz. G 2	T +	S ++	LG ++ T +
35	Lob. Karz. G 2	-	S +++	LG ++
36	Lob. Karz. G 2	S + T +	S +	T +
37	Tub. Karz. G 1	S +	S ++	k.A.
38	Tub. Karz. G 2	-	S ++	LG ++
39	Muz. Karz. G 2	S +	S ++	LG + T +
40	Muz. Karz. G 2	-	S +	LG +
41	Muz. Karz. G 3	-	-	T +
42	Muz. Karz. G 3	-	S + T +	LG +++
43	Med. Karz. G 3	S ++ T +	S ++	k.A.
44	Dukt. Karz. G 1	T +	S ++	LG +++
45	Dukt. Karz. G 1	-	S ++	LG ++
46	Dukt. Karz. G 1	S +	S ++	-
47	Dukt. Karz. G 1	S +	S ++	k.A.
48	Dukt. Karz. G 1	S +	S +++	LG +++ T +
49	Dukt. Karz. G 2	S +	S +	T +
50	Dukt. Karz. G 2	-	E +	LG ++
51	Dukt. Karz. G 2	S + T +	S ++ T +	LG ++ S ++ T +
52	Dukt. Karz. G 2	-	S ++	LG +

Fall-Nr.	Gewebe	uPA	PAI-1	tPA
53	Dukt. Karz. G 2	-	S ++	E +
54	Dukt. Karz. G 2	-	S ++	LG ++
55	Dukt. Karz. G 2	S + T +	S +	T +
56	Dukt. Karz. G 2	S +	S +	S +
57	Dukt. Karz. G 2	S + T +	S +	T +
58	Dukt. Karz. G 2	-	S ++	LG +
59	Dukt. Karz. G 2	S +	S +++	T +++
60	Dukt. Karz. G 2	S +	S +	T ++
61	Dukt. Karz. G 2	-	S +	LG +++
62	Dukt. Karz. G 2	-	S ++	LG +++ T +
63	Dukt. Karz. G 2	S +	S +++	LG ++
64	Dukt. Karz. G 2	-	S +	T +
65	Dukt. Karz. G 2	S +	S +++	LG ++
66	Dukt. Karz. G 2	S ++ T +	S + T +	k.A.
67	Dukt. Karz. G 2	S ++ T +	T +	k.A.
68	Dukt. Karz. G 2	S +	S ++	k.A.
69	Dukt. Karz. G 2	S +	S +	k.A.
70	Dukt. Karz. G 2	S +	S +	k.A.
71	Dukt. Karz. G 2	S ++ T +	T ++	k.A.
72	Dukt. Karz. G 2	T ++	S +	k.A.
73	Dukt. Karz. G 2	-	S ++	k.A.
74	Dukt. Karz. G 2	-	S +	k.A.
75	Dukt. Karz. G 2	S +	S ++	k.A.
76	Dukt. Karz. G 2	-	S +++	LG ++ T +
77	Dukt. Karz. G 3	-	S +	k.A.
78	Dukt. Karz. G 3	-	S ++	T +
79	Dukt. Karz. G 3	S +	T +	LG + T ++
80	Dukt. Karz. G 3	-	-	-
81	Dukt. Karz. G 3	S +	S +++	LG ++ T +
82	Dukt. Karz. G 3	S +	S +++	LG +++
83	Dukt. Karz. G 3	-	S +++	LG ++
84	Dukt. Karz. G 3	-	-	LG +
85	Dukt. Karz. G 3	-	S +++	-
86	Dukt. Karz. G 3	S + T +	-	-
87	Dukt. Karz. G 3	-	S ++ T +	LG +++ T +
88	Dukt. Karz. G 3	-	S +	LG + T ++
89	Dukt. Karz. G 3	-	S ++	LG +
90	Dukt. Karz. G 3	S +	S +	S +
91	Dukt. Karz. G 3	-	S ++	T +
92	Dukt. Karz. G 3	S +	S ++	k.A.
93	Dukt. Karz. G 3	S ++	S +++	k.A.
94	Dukt. Karz. G 3	S ++	S +++	k.A.
95	Dukt. Karz. G 3	S +	S +++	k.A.
96	Dukt. Karz. G 3	T +	-	k.A.
97	Dukt. Karz. G 3	S +	S +	k.A.
98	Dukt. Karz. G 3	T ++	S + T ++	k.A.
99	Dukt. Karz. G 3	S +	S ++	k.A.

Fall- Nr.	Gewebe	uPA	PAI-1	tPA
100	Dukt. Karz. G 3	S +	S +++	k.A.
101	Dukt. Karz. G 3	S +++ T +	S +++	k.A.
102	Dukt. Karz. G 3	S ++	S ++	k.A.
103	Dukt. Karz. G 3	S +	S ++	k.A.
104	Dukt. Karz. G 3	S ++	S +	k.A.
105	Dukt. Karz. G 3	S +++	S +++	k.A.
106	Dukt. Karz. G 3	S + T +	S +	k.A.
107	Dukt. Karz. G 3	S +	S +++	k.A.
108	Dukt. Karz. G 3	-	S +++	k.A.

Legende :

S=Markierung in Stromazellen, T=Markierung in Tumorzellen

LG=Markierung in Gang-und Läppchenepithel, E=Markierung in Endothelzellen

Tub.=tubuläres, Karz.=Karzinom, Muz.=muzinöses, Med.=medulläres, Lob.=lobuläres

Dukt.=duktales

[-] kein spezifisches Signal

[+] einige, verstreute, signifikant markierte Zellen (schwache Markierung)

[++] etwa 5-25% positive Zellen (mittelstarke Markierung)

[+++] etwa 25-50% positive Zellen (starke Markierung)

[k.A.] keine Analyse

4.2 Expression von uPA

4.2.1 uPA-Transkripte im Normalgewebe, radiäre Narbe, Mastopathien, duktale Hyperplasie und Papillom

Im untersuchten Normalgewebe und in dem Fall der radiären Narbe konnte in keinem Fall eine mRNA-Expression von uPA nachgewiesen werden.

Von den 7 Fällen der Mastopathien zeigte sich nur in einem Fall ein schwach positives Signal. Im Fall Nr. 10, der duktaalen Hyperplasie konnten vereinzelte Markierungen im Bereich des Läppchen- und Gangepithels ausgemacht werden.

4.2.2 uPA-Transkripte in malignen Läsionen

DCIS

Sämtliche hier untersuchten *in situ*-Karzinome zeigten keine Hybridisierungssignale für uPA.

Invasive Karzinome

In den 87 insgesamt untersuchten Fällen der invasiven Karzinome zeigte sich in 51 Fällen eine Markierung für uPA, in 36 Fällen konnte keine Markierung nachgewiesen werden. In der Mehrzahl der Fälle konnte ein schwaches bis mittelstarkes Hybridisierungssignal über den Stromazellen ausgemacht werden. In 6 Fällen zeigte sich eine schwache bis mittelstarke Signalgebung in den Tumorzellen und in 11 Fällen konnte sowohl eine Markierung der tumornahen Stromazellen als auch eine schwache Markierung der Tumorzellen nachgewiesen werden. Mit steigendem histologischen Grad nahmen die Häufigkeit der Markierungen und die Intensität zu.

In der folgenden Tabelle wird die uPA-Expressionsintensität in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes und nach der Lokalisation des Hybridisierungssignals (Stroma- und/oder Tumorzellen) angegeben. In einigen Fällen fand sich eine Markierung sowohl in den Stromazellen, als auch in den Tumorzellen.

Tab. 4.8: uPA-Expression in Tumor- und Stromazellen nach dem Tumortyp

Gewebe	Tumorzellen				Stromazellen			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Gutartige Läsionen und Normalgewebe	0	0	0	0	10	1(LG)	0	0
DCIS	10	0	0	0	10	0	0	0
Lobuläres Karzinom	12	2	1	0	11	4	0	0
Tubuläres Karzinom	2	0	0	0	1	1	0	0
Muzinöses Karzinom	4	0	0	0	3	1	0	0
Medulläres Karzinom	0	1	0	0	0	0	1	0
Duktales Karzinom	52	11	2	0	28	29	7	2
Gesamtheit invasiver Karzinome	70	14	3	0	43	35	8	2

- [-] kein spezifisches Signal
- [+] einige, verstreute, signifikant markierte Zellen
- [++] etwa 5-25% positive Zellen
- [+++] etwa 25-50% positive Zellen

In Abbildung 4.2 werden die absoluten Häufigkeiten der uPA mRNA-Expression graphisch dargestellt. Auch hierbei ist zu berücksichtigen, dass in einigen Fällen die Signale in Stroma- und Tumorzellen detektiert wurden.

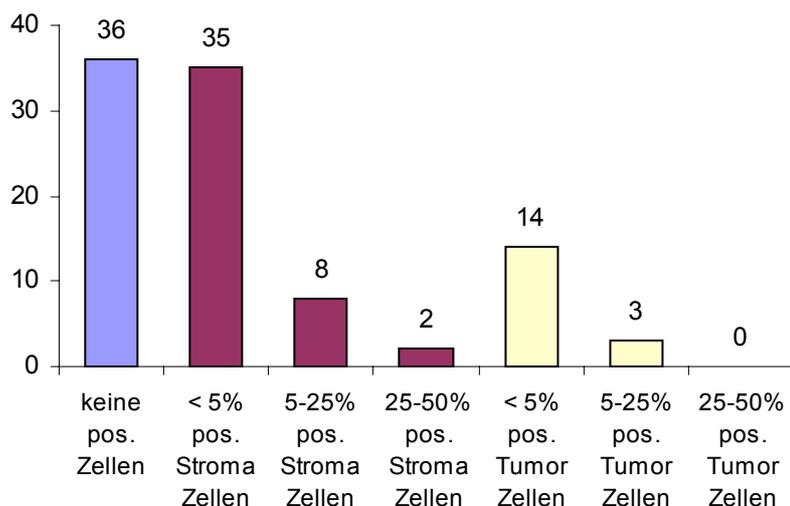


Abb. 4.2: Absolute Häufigkeitsverteilung der uPA-Expression in invasiven Karzinomen gegliedert nach den exprimierenden Zellen, Gesamtzahl der invasiven Karzinome: 87

Es zeigte sich, dass von 87 untersuchten invasiven Karzinomen in 36 Fällen keine positiven Markierungen für uPA festgestellt werden konnten. Die Expressionsintensität sowohl im Stroma als auch in den Tumorzellen war insgesamt überwiegend mittelstark. In nur zwei Fällen konnte eine starke Expression für uPA beobachtet werden. Die Hybridisierungssignale für uPA in invasiven Karzinomen wurden überwiegend über den Stromazellen lokalisiert; so wurden die Signale in insgesamt 45 Fällen über den Stromazellen und in 17 Fällen über den Tumorzellen festgestellt.

In der folgenden Kreuztabelle wird die uPA-Expression in den Stromazellen in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstatus betrachtet. Hierbei werden nur Fälle invasiver Karzinome berücksichtigt.

Tab. 4.9: Kreuztabelle uPA-Expression in Stromazellen und Lymphknotenstatus

		<u>Lymphknotenmetastasen</u>			
		nein	ja	Gesamt	
uPA in Stromazellen	keine pos. Zellen	Anzahl	23=55%	19=45%	42
	<5 % pos. Zellen	Anzahl	11=31%	24=69%	35
	5-25 % pos. Zellen	Anzahl	1=10%	9=90%	10
Gesamt		Anzahl	35=40%	52=60%	87

Es ist auffällig, dass bei invasiven Karzinomen mit Lymphknotenmetastasen die uPA-Expressionsintensität in den Stromazellen deutlich stärker ist und umgekehrt. Dieser Unterschied konnte auch statistisch bewiesen werden ($P=0,004$; lineare Assoziation).

Bei der Durchführung des Chi-Quadrat Tests ergibt sich für die uPA-Expression in den Stromazellen und dem Lymphknotenstatus ein statistisch auffälliger Unterschied mit einer linearen Assoziation ($P: 0,004$).

In Tabelle 4.10 wird die uPA-Expression in den Tumorzellen in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstatus angegeben.

Tab. 4.10: Kreuztabelle uPA-Expression in Tumorzellen und Lymphknotenstatus

		<u>Lymphknotenmetastasen</u>			
			nein	ja	Gesamt
uPA in Tumorzellen	keine pos. Zellen	Anzahl	31=46%	37=45%	68
	<5 % pos. Zellen	Anzahl	4=22%	14=78%	18
Gesamt		Anzahl	35=41%	51=59%	86

Es ist ersichtlich, dass bei invasiven Karzinomen mit Lymphknotenmetastasen die uPA-Signalintensität in den Tumorzellen größer ist, jedoch ist ein Zusammenhang nicht statistisch belegt ($P:0,105$ Fischer Test).

Für die uPA-Expression in den Tumorzellen in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstatus ergibt sich ein P-Wert von 0,105 (Exakter Test nach Fisher).

Betrachtet man die uPA-Expressionsintensität in Abhängigkeit von dem „Grading“, so ergibt sich für die Stromazellen ein P-Wert von 0,141 (Likelihood-Quotient) und für die Tumorzellen ein P-Wert von 0,712 (Likelihood-Quotient).

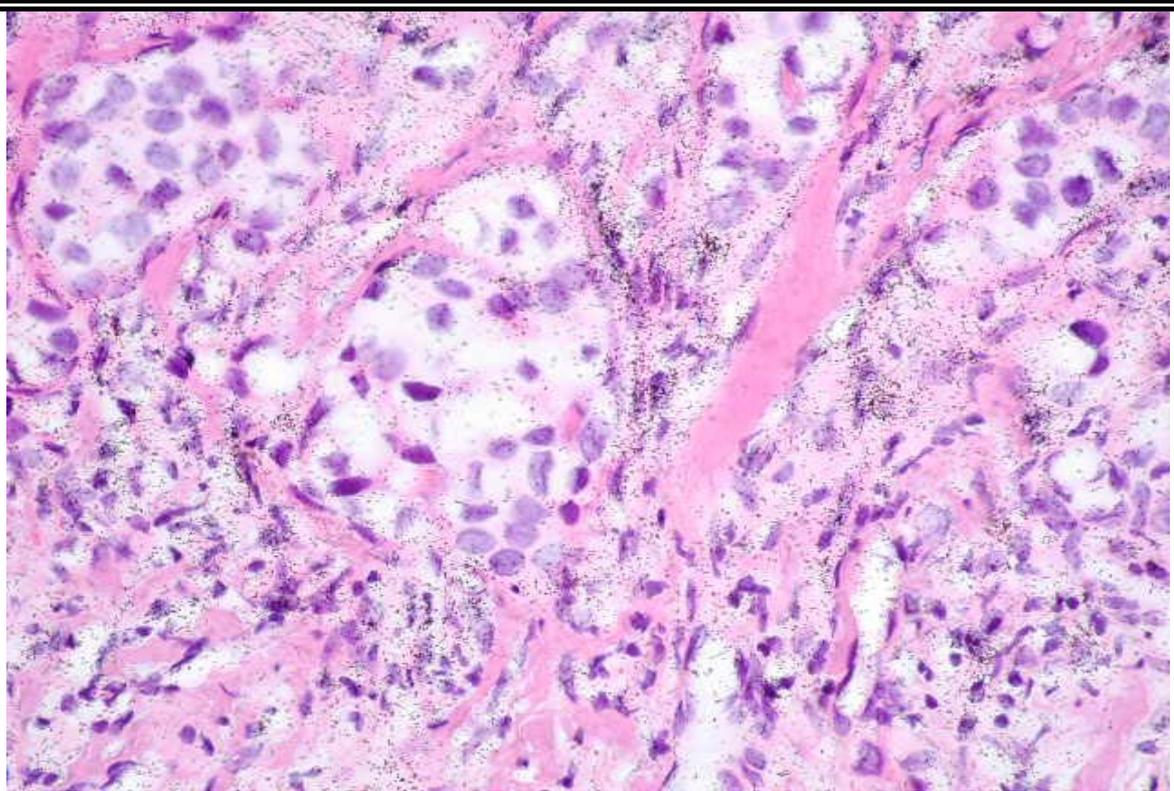


Abb.4.3: Starke Expression von uPA mit dichten *grains* über den Stromazellen und mittelstarke Expression in den Tumorzellen (Fallnr. 101, Vergrößerung 400fach) bei einem invasiven duktalem Karzinom Grad 3

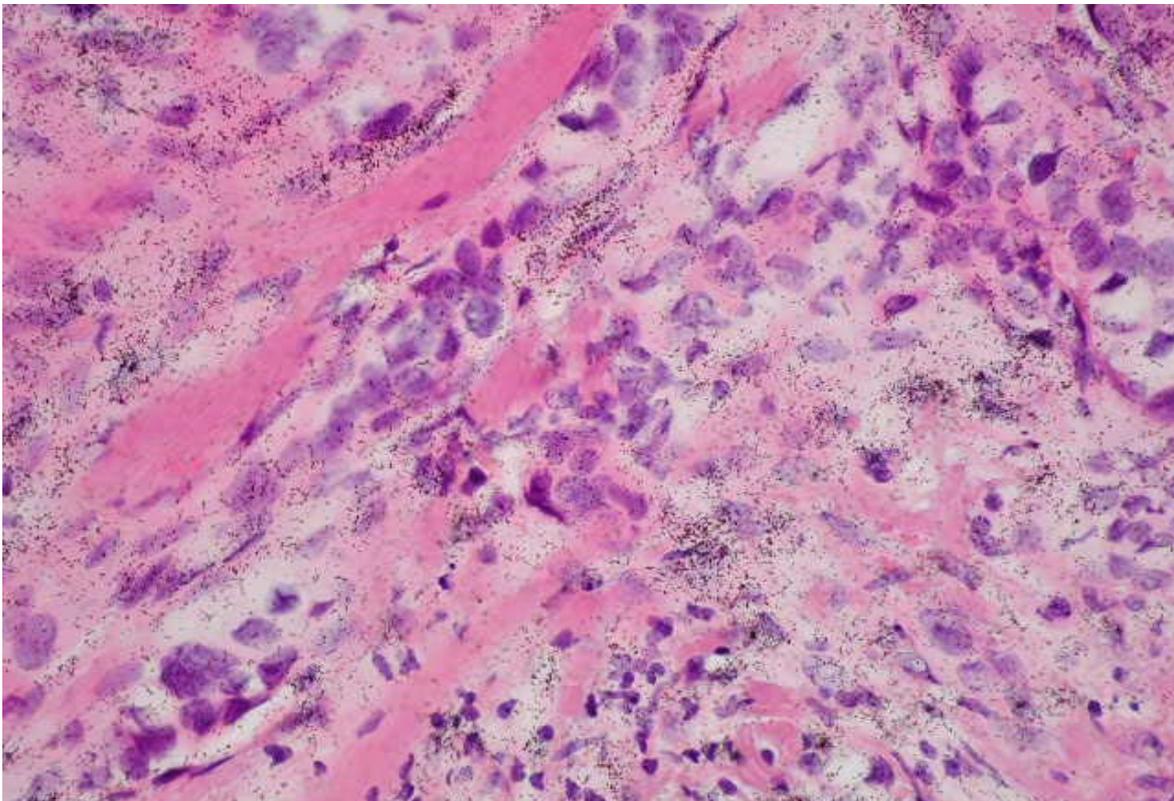


Abb.4.4: Starke Expression von uPA in den Stromazellen und mittelstarke Expression in den Tumorzellen (Fallnr. 101, Vergrößerung 400fach) bei einem invasiven duktalem Karzinom Grad 3

4.3 Expression von PAI-1

4.3.1 PAI-1-Transkripte im Normalgewebe und gutartigen Läsionen

Von den vier untersuchten Fällen konnte in zwei Fällen eine schwache und eine mittelstarke Expression von PAI-1 in Stromazellen nachgewiesen werden.

In den anderen beiden Fällen zeigte sich keine Expression

4.3.2 PAI-1-Transkripte in bösartigen Läsionen

DCIS

In den untersuchten nichtinvasiven Karzinomen zeigten sich von 10 Fällen in 7 Fällen signifikant positive Hybridisierungssignale. Die Hybridisierungssignale wurden in den Stromazellen lokalisiert und zeigten bis auf eine Ausnahme mit mittelstarker Intensität meistens eine schwache Expressionsintensität. In den Tumorzellen zeigte sich kein Nachweis einer PAI-1-Expression.

Invasive Karzinome

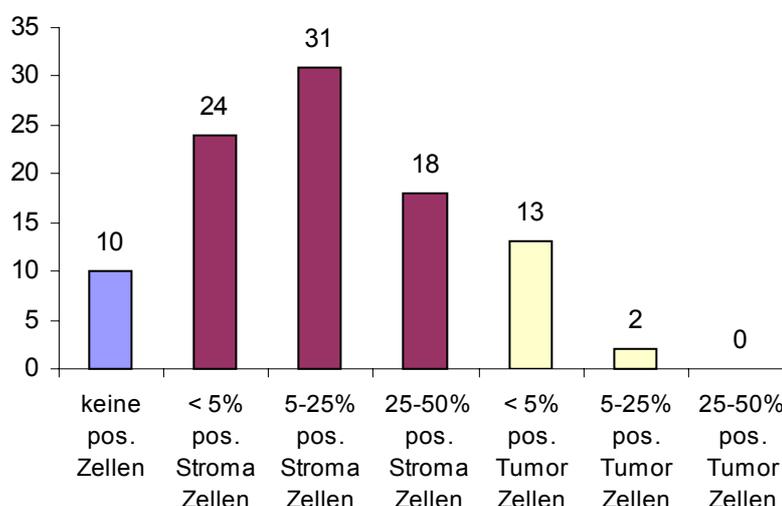
In den meisten Fällen konnten Hybridisierungssignale über den tumornahen Stromazellen nachgewiesen werden. In 20 Fällen zeigte sich eine schwache, in 29 Fällen eine mittelstarke und in 18 Fällen eine starke Expression, wobei hier die Intensitätszunahme mit zunehmendem histologischen „Grading“ einherging. In 5 Fällen konnten positive Zellen in Stromazellen und Tumorzellen nebeneinander nachgewiesen werden, dabei war die Markierung über den Tumorzellen in vier Fällen schwach. In nur vier von 87 Fällen fiel eine schwache bis mittelstarke (ein Fall) positive Markierung der malignen Zellen auf. 10 Fälle zeigten keine signifikanten Markierungen.

In Tabelle 4.11 wird die PAI-1-Expression in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes und nach der Lokalisation des Hybridisierungssignals angegeben. Auch für die Protease PAI-1 konnten in einigen Fällen Markierungen sowohl in Stroma- als auch in Tumorzellen festgestellt werden.

Tab. 4. 11: PAI-1-Expression in Tumor- und Stromazellen nach dem Tumortyp

Gewebe	Tumorzellen				Stromazellen			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++
Gutartige Läsionen und Normalgewebe	0	0	0	0	5	3	2	0
DCIS	10	0	0	0	3	6	1	0
Lobuläres Karzinom	14	1	0	0	6	2	6	1
Tubuläres Karzinom	2	0	0	0	0	0	2	0
Muzinöses Karzinom	3	1	0	0	1	2	1	0
Medulläres Karzinom	1	0	0	0	0	0	1	0
Duktales Karzinom	58	11	2	0	7	20(1xE)	21	17
Gesamtheit invasiver Karzinome	64	13	2	0	14	24	31	18

In der folgenden Abbildung wird die absolute Häufigkeitsverteilung der PAI-1 mRNA-Expression in invasiven Karzinomen je nach Lokalisation dargestellt. Es fällt auf, dass in nur 10 Fällen keine Hybridisierungssignale für PAI-1 festgestellt werden konnten. Die Stromazellen zeigten deutlich häufiger und stärker positive Signale für PAI-1 als die Tumorzellen.

**Abb. 4.5:** Absolute Häufigkeitsverteilung der PAI-1-Expression in invasiven Karzinomen gegliedert nach den exprimierenden Zellen

Für die PAI-1-Expression in den Stromazellen und in den Tumorzellen in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstatus konnte statistisch kein auffälliger Unterschied festgestellt werden (P: 0,211 Chi Quadrat Test bzw. P: 1 Fischer Test, PAI-Expression dichotom).

Es folgt die Kreuztabelle, in der die PAI-1-Expression in den Stromazellen in Abhängigkeit von dem „Grading“ dargestellt ist.

Tab. 4.12: Kreuztabelle PAI –1-Expression in Stromazellen und „Grading“

			Grad			
			Grad 1	Grad 2	Grad 3	Ges.
PAI-1 Stromazellen	keine pos. Zellen	Anzahl	4=22%	7=39%	7=39%	18
	<5 % pos. Zellen	Anzahl	2=7%	16=55%	11=38%	29
	5-25 % pos. Zellen	Anzahl	6=19%	17=53%	9=28%	32
	25-50% pos. Zellen	Anzahl	5=28%	13=72%		18
Gesamt	Anzahl	12	45	40	97	

Es ergibt sich ein statistisch auffälliger Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expression in den Stromazellen und dem „Grading“, das bedeutet, dass eine starke PAI-1 Expressionsintensität mit einem höheren histologischen „Grading“ einhergeht (P-Wert: 0,37 Chi-Quadrat nach Pearson).

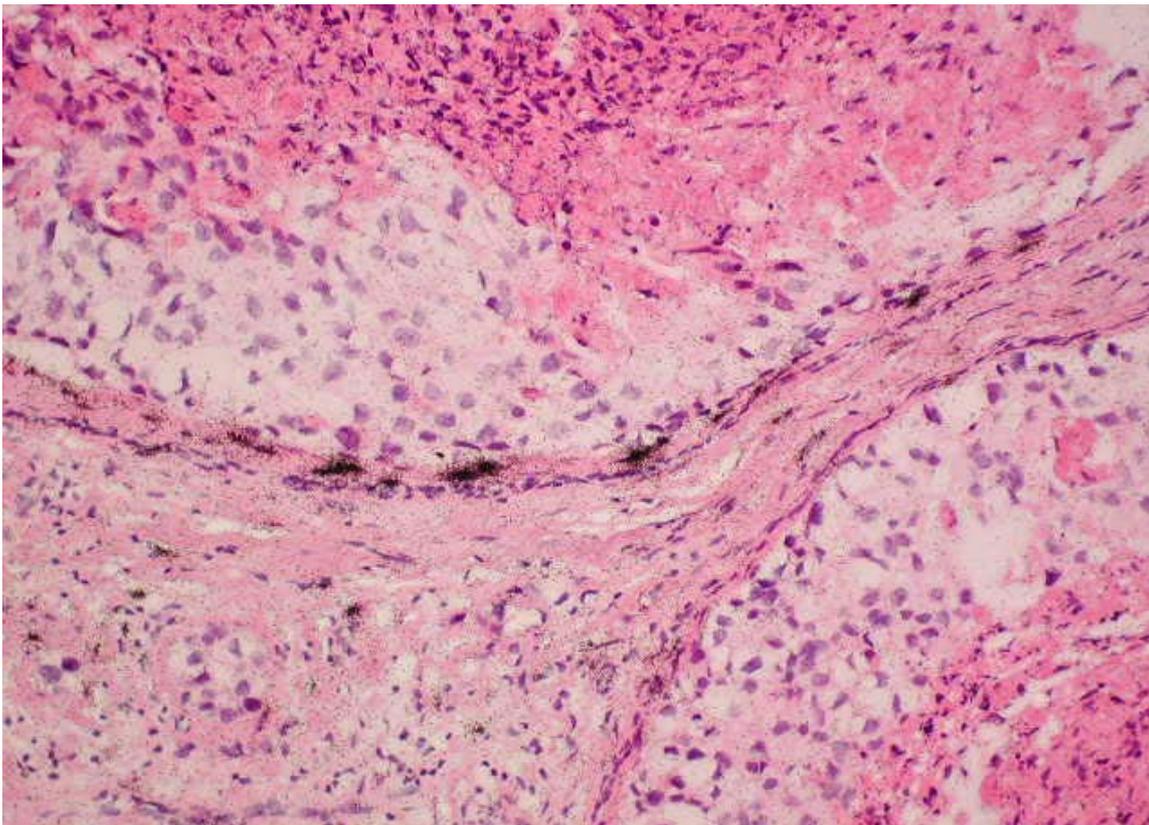


Abb.4.6: Mittelstarke Expression von PAI-1 mit schwarzen Signalen über den tumornahen Stromazellen im DCIS-Anteil (Typ 3) eines invasiven duktales Karzinoms Grad 3 (Fallnr. 101, Vergrößerung 200fach)

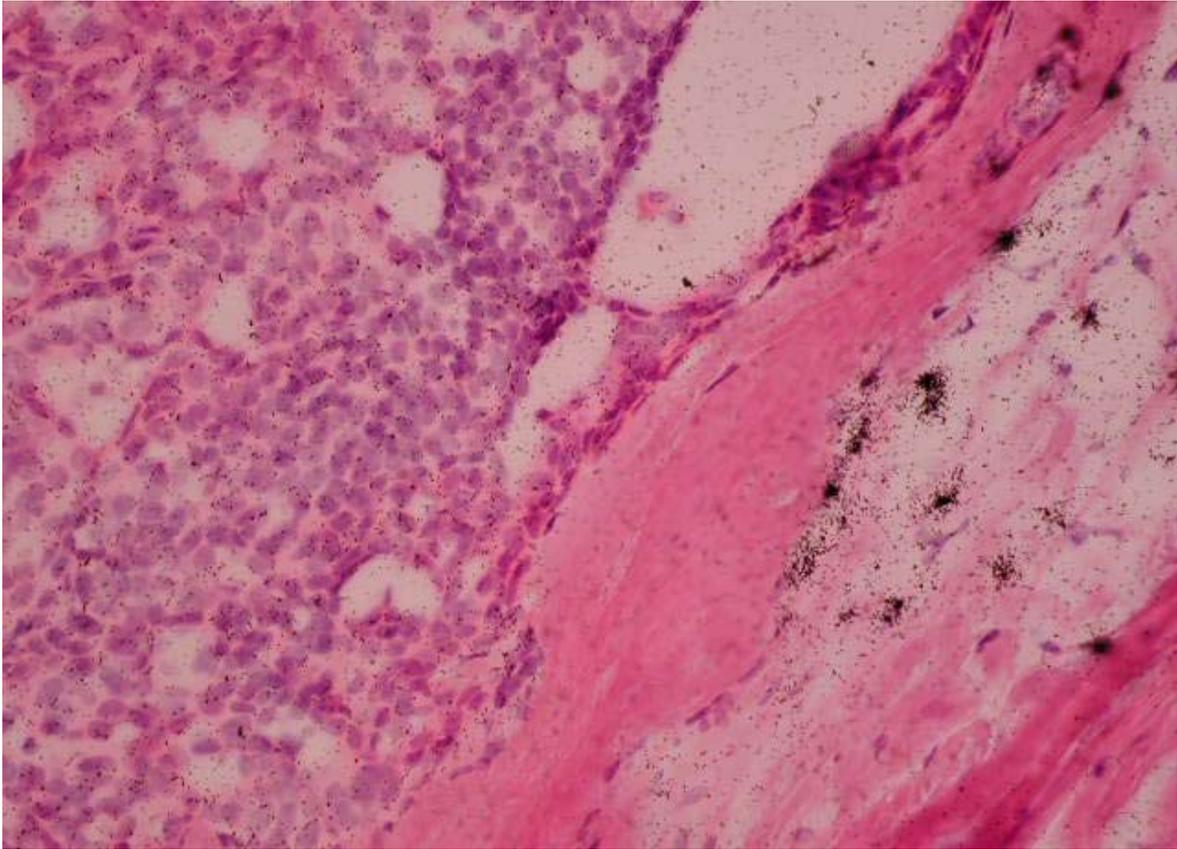


Abb.4.7:Mittelstarke Expression von PAI-1 in Stromazellen in einem DCIS Typ 1 (Fallnr. 12, Vergrößerung 200fach)

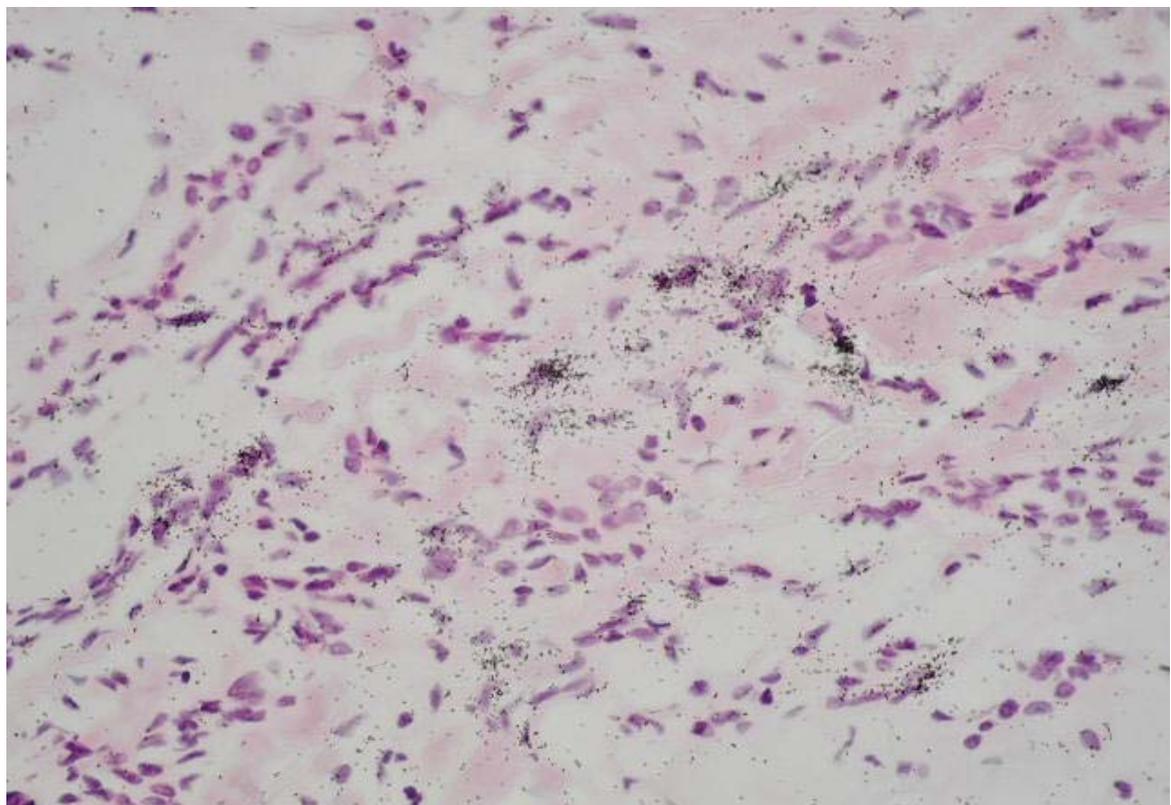


Abb.4.8:Mittelstarke Expression von PAI-1 in den Stromazellen in einem invasiven duktalem Ca Grad 1 (Fallnr. 46, Vergrößerung 200fach)

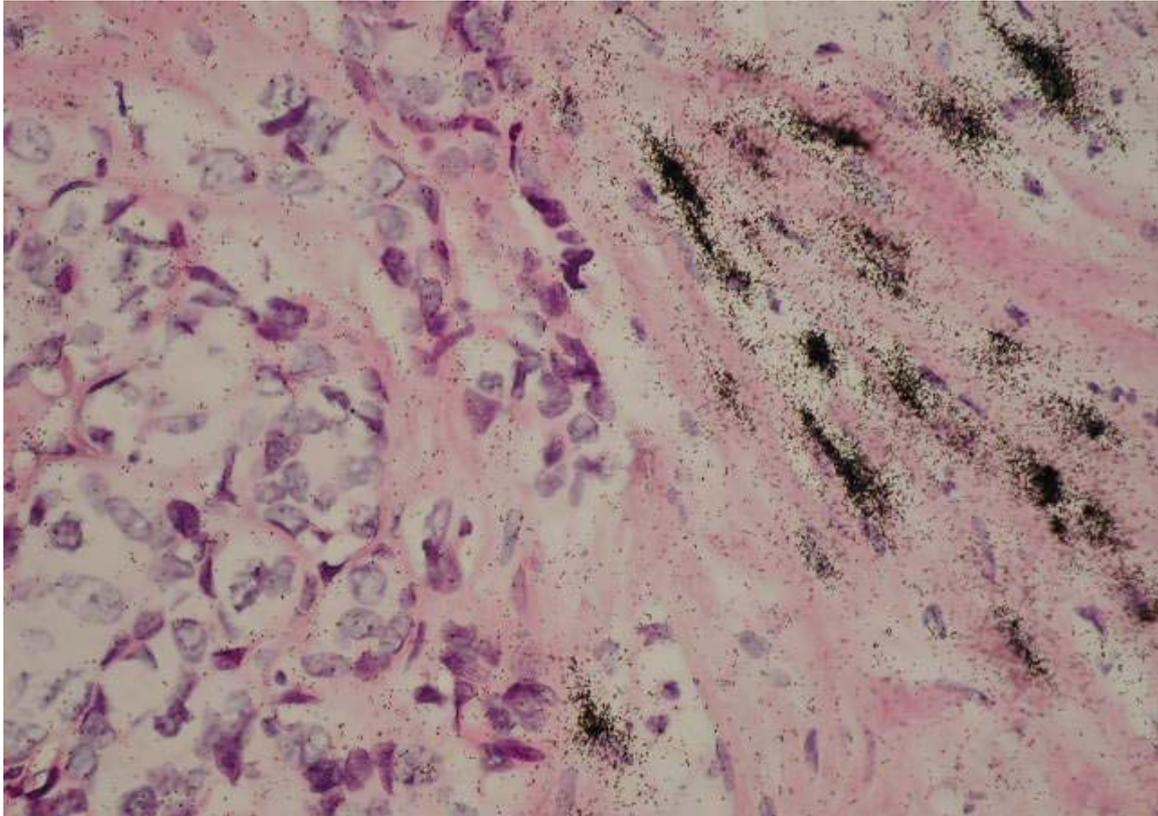


Abb.4.9:Starke Expression von PAI-1 mit dichten *grains* über den tumornahen Stromazellen eines invasiv duktales Karzinoms G 2 (Fallnr. 63, Vergrößerung 400fach)

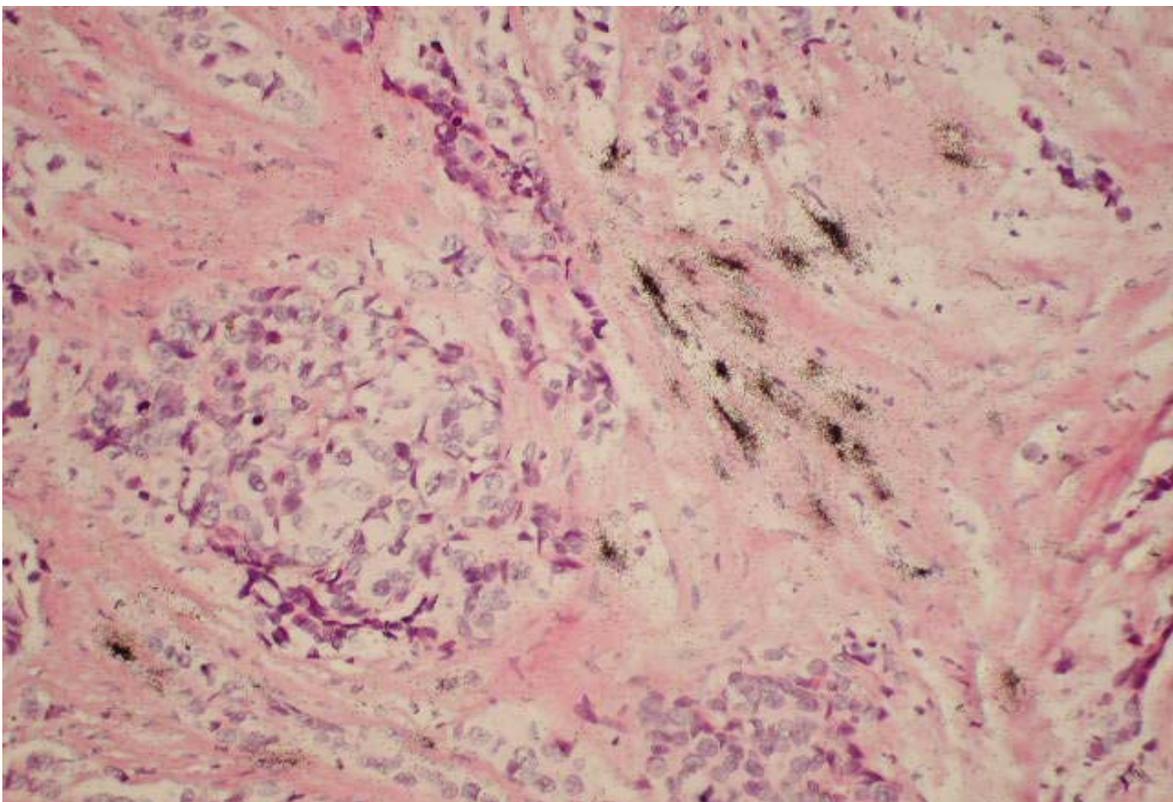


Abb.4.10: Starke Expression von PAI-1 in den tumornahen Stromazellen eines invasiv duktales Karzinoms G 2 (Fallnr. 63, Vergrößerung 200 fach)

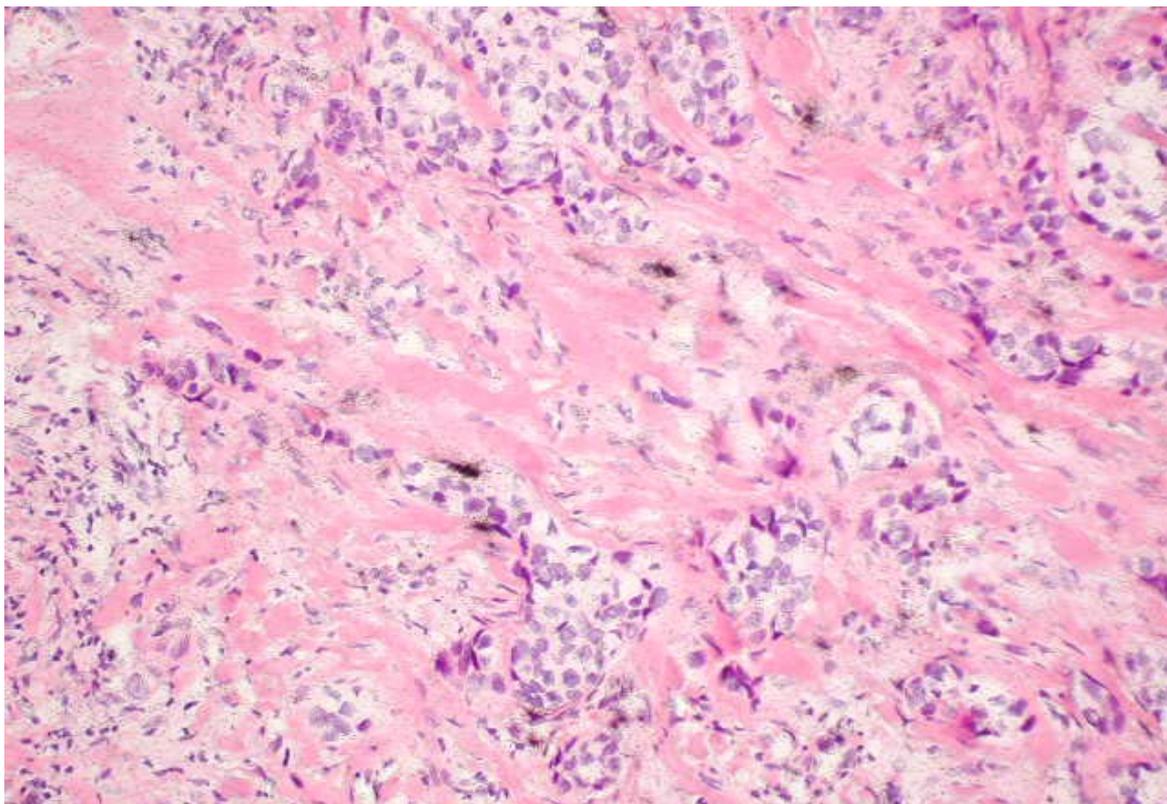


Abb.4.11: PAI-1-Expression in Stromazellen, die unmittelbar an den Tumor angrenzen (Fallnr. 101, Vergrößerung 200fach)

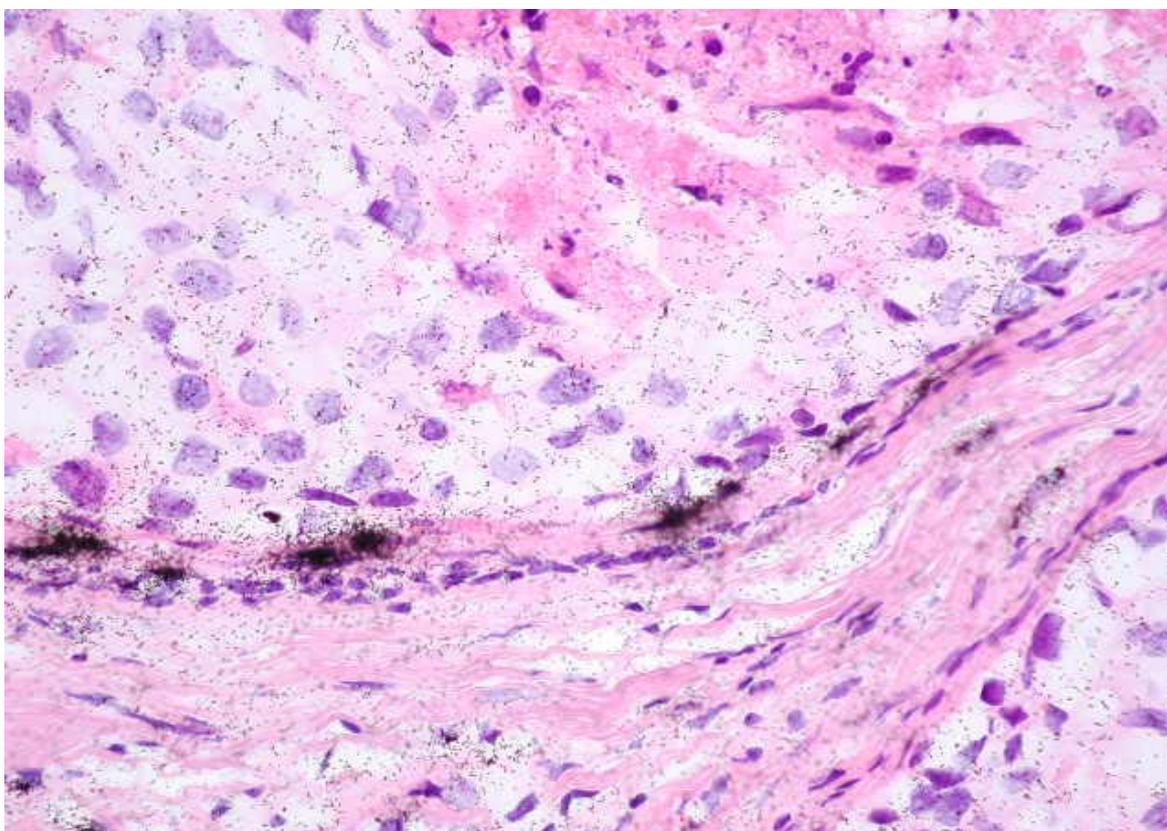


Abb.4.12: Starke PAI-1-Expression in tumornahen Stromazellen (Fallnr. 101, Vergrößerung 400fach)

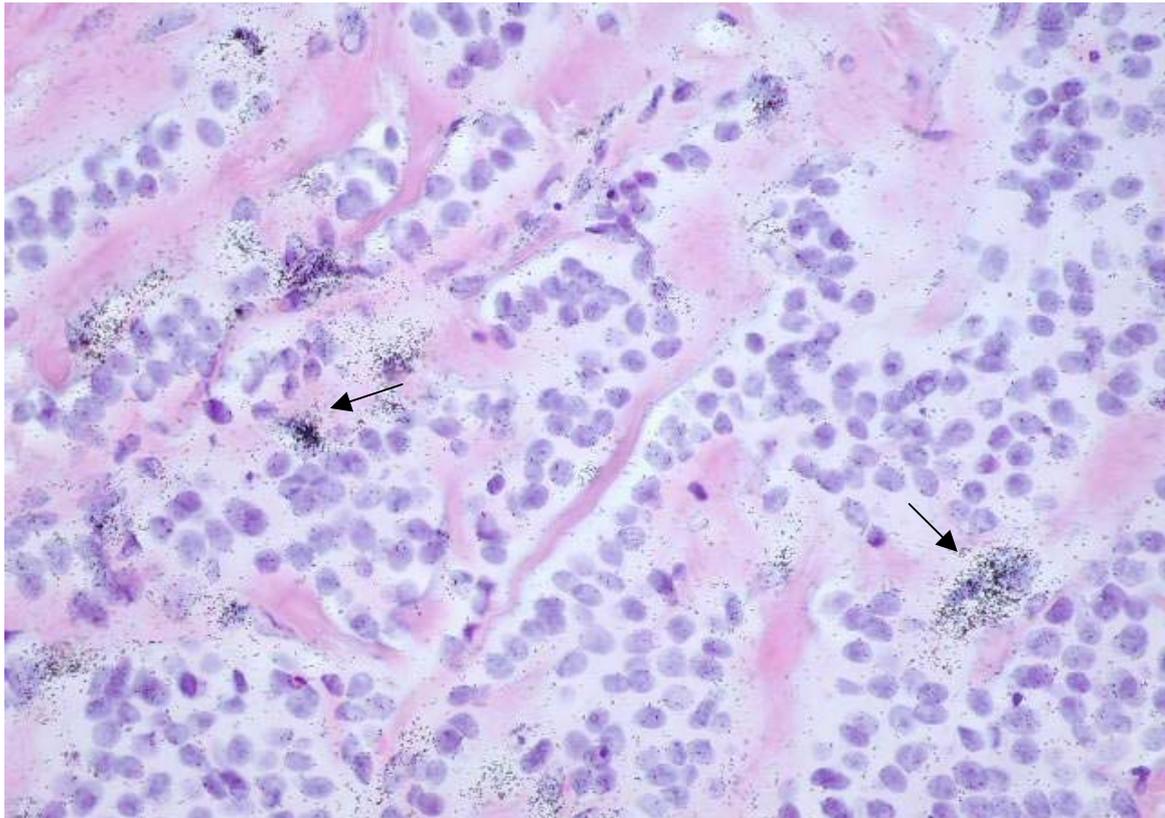


Abb.4.13: In einzelnen Tumorzellen (siehe Pfeile) starke PAI-1-Expression mit dichten *grains* in einem lobulären Karzinom Grad 2 (Fallnr. 25, Vergrößerung 400fach)

4.4 Expression von tPA

4.4.1 tPA-Transkripte im Normalgewebe und gutartigen Läsionen

Aus diesem Kollektiv sind 4 von 11 Fällen auf mRNA von tPA untersucht worden.

In allen untersuchten Fällen fiel eine überwiegend mittelstarke bis starke Markierung über den Zellen des Lappchen- und Gangepithels auf.

4.4.2 tPA-Transkripte in bösartigen Läsionen

DCIS

In sämtlichen nichtinvasiven Karzinomen konnten Hybridisierungssignale nachgewiesen werden. Bis auf eine Ausnahme mit einer schwachen Markierung über den Stromazellen, zeigte sich eine überwiegend mittelstarke bis starke Markierung des Lappchen- und Gangepithels. Die Tumorzellen selbst waren negativ.

Invasive Karzinome

In diesem Kollektiv sind 53 Fälle auf eine Expression von tPA-mRNA untersucht worden und es fiel ein heterogenes Verteilungsmuster auf, wobei sich in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls die Zellen der Gang und Läppchenepithelien als positiv darstellten. In 13 Fällen wurde zusätzlich eine Markierung der Tumorzellen nachgewiesen und in 11 Fällen eine überwiegend schwache Markierung der Tumorzellen. Die Stromazellen waren nur in 2 Fällen positiv und in einem Fall fiel die Markierung über den Endothelzellen auf.

In 5 Fällen konnte keine signifikante Expression von tPA festgestellt werden.

In der folgenden Tabelle ist die tPA-Expression in Abhängigkeit der Lokalisation im gesamten Untersuchungsgut dargestellt. Es wurden 67 Fälle auf eine tPA-mRNA-Expression untersucht; in vielen Fällen zeigten sich Markierungen in mehreren Zelltypen.

Tab. 4.13: tPA-Expression in Tumor-und Stromazellen nach Tumortyp

Gewebe	Tumorzellen				Stromazellen				Läppchen u. Gangepithel			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
Gutartige Läsionen und Normalgewebe	11	0	0	0	11	0	0	0	0	0	3	1
DCIS	10	0	0	0	0	1	0	0	0	6	3	0
Lobuläres Karzinom	5	6	0	1	0	0	0	0	0	2	5	1
Tubuläres Karzinom	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Muzinöses Karzinom	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Duktales Karzinom	19	12	3	1	0	3(1E)	1	0	0	6	9	6
Gesamtheit invas. Karzinome	37	20	3	2	0	3	1	0	0	10	15	8

In Abbildung 4.4 sind die absoluten Häufigkeiten der tPA-Expression in invasiven Karzinomen in Abhängigkeit von der Lokalisation (Stroma-, Tumor-und/oder Läppchen- und Gangepithelzellen) dargestellt.

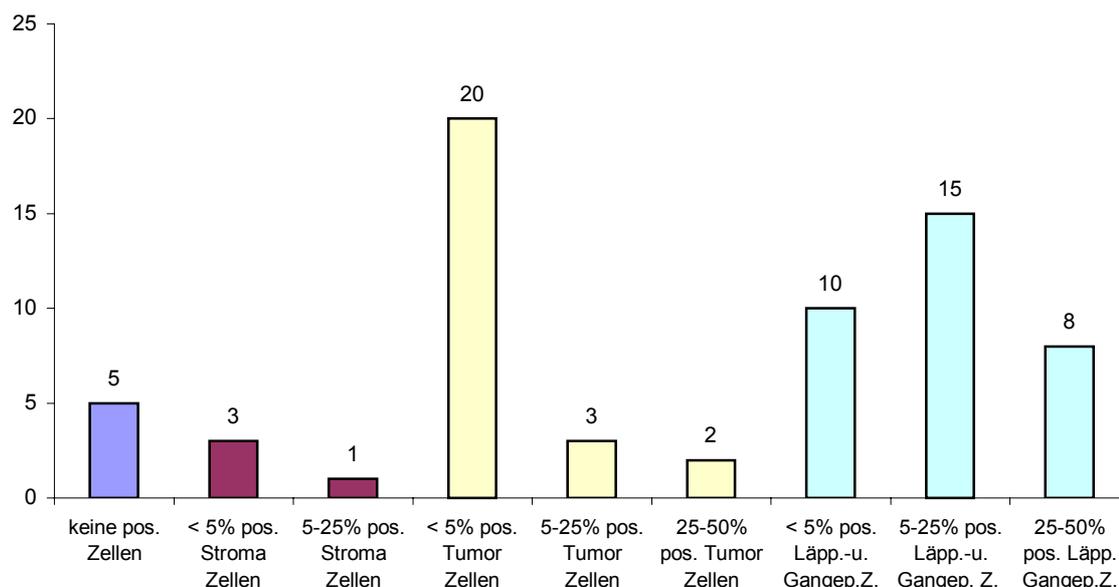


Abb. 4.14: Absolute Häufigkeitsverteilung der tPA-Expression in invasiven Karzinomen gegliedert nach den exprimierenden Zellen, Gesamtzahl der auf tPA untersuchten invasiven Karzinome: 53

Es wird deutlich, dass die tPA-Expression bei den invasiven Karzinomen nicht homogen ist und sich in allen Zelltypen zeigt, wobei sie überwiegend im Läppchen- und Gangepithel lokalisiert wurde. In vielen Fällen sind Markierungen in verschiedenen Zelltypen festgestellt worden und in nur 5 von 53 Fällen konnten keine tPA-Hybridisierungssignale beobachtet werden.

In der nachfolgenden Kreuztabelle ist die tPA-Expression im Läppchen- und Gangepithel in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstatus dargestellt. Für diese Assoziation ergibt der Chi-Quadrat Test nach Pearson einen P-Wert von 0,56 (tPA dichotom neg./pos., $P=0,38$). Die etwas häufigere tPA-Expressionsintensität im Läppchen- und Gangepithel bei den untersuchten Fällen ohne Lymphknotenmetastasen lässt sich statistisch nicht absichern.

Tab.4.14: Kreuztabelle tPA-Expression im Läppchen- und Gangepithel und Lymphknotenstatus

		<u>Lymphknotenmetastasen</u>			
		nein	ja	Gesamt	
tPA Läppchen- Gangepithel	keine pos. Zellen	Anzahl	11=55%	9=45%	20
	<5 % pos. Zellen	Anzahl	7=70%	3=30%	10
	5-25 % pos. Zellen	Anzahl	16=70%	7=30%	23
Gesamt		Anzahl	34=64%	19=36%	53

Die tPA-Expression in den Tumorzellen in Abhängigkeit von dem Lymphknotenstatus zeigte statistisch keinen auffälligen Unterschied (P-Wert von 0,095 im Exakten Test nach Fisher).

Ebenfalls konnte zwischen der tPA-Expression in den Tumorzellen (P-Wert: 0,198) und dem Läppchen- und Gangepithel (P-Wert: 0,213) in Abhängigkeit von dem „Grading“ keine statistisch signifikante Assoziation festgestellt werden.

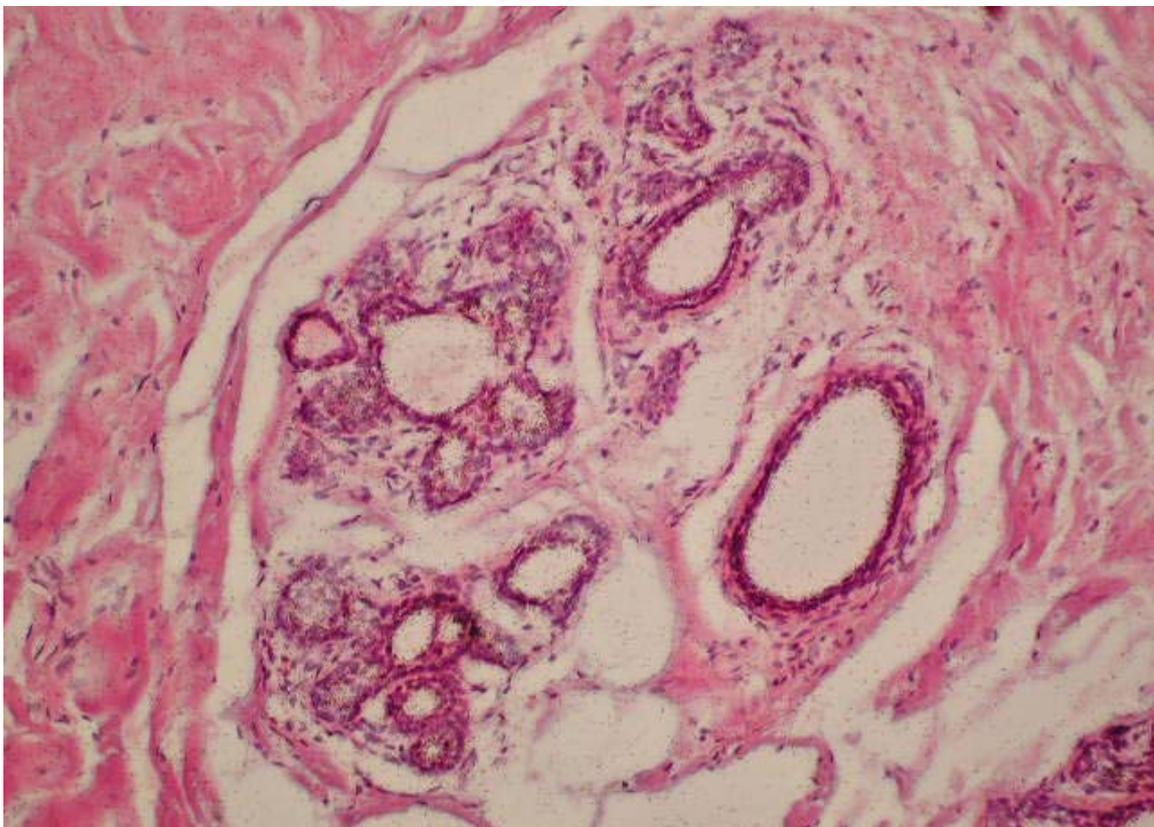


Abb.4.15: Starke Expression von tPA mit dichten *grains* über dem normalen Läppchen- und Gangepithel (Fallnr. 12, Vergrößerung 100fach)

4.5 Vergleich der biochemischen Werte (ELISA) von uPA und PAI-1 mit RNA-*in situ*-Analysen

Im Anhang in Tabelle 8.2 sind die mittels ELISA festgestellten Werte von uPA und PAI-1 im Cytosol der Tumorzellen mit den jeweiligen Fallnummern aufgelistet.

In der folgenden Übersicht werden diese Werte detailliert betrachtet, sodass deutlich wird, dass es sich um eine unsymmetrische („schiefe“) Verteilung handelt, da der Median und der arithmetische Mittelwert weit auseinander liegen.

Tab. 4.15: Analyse der biochemischen uPA und PAI-1-Werte (ELISA)

	uPA in ng/mg Protein	PAI-1 in ng/mg Protein
N	74	75
Minimum	0,29	2,60
Maximum	14,92	453,75
Mittelwert	4,29	76,96
Median	2,92	47,68
Standardabweichung	3,47	92,06

Betrachtet man die PAI-1-Werte und das „Grading“, so ist festzustellen, dass die Werte (Mediane) mit steigendem „Grading“ zunehmen. So konnte für Grad 1 Karzinome ein Median der PAI-1-Werte von 21,6 und für Grad 2 Karzinome 44,6 und für Grad 3 Karzinome ein Median von 63,5 ng/mg Protein festgestellt werden.

Für die biochemischen uPA-Werte konnte dieser Trend nicht beobachtet werden. Im Kruskal-Wallis Test konnte kein statistischer Unterschied nachgewiesen werden, es ergab sich für PAI-1 ein P-Wert von 0,22 und für uPA ein P-Wert von 0,86 (Asymptotische Signifikanz).

Die Maßzahlen und Vergleiche für den Lymphknotenstatus ergaben keinen statistisch nachweisbaren Unterschied (P-Wert für PAI-1 0,76 und für uPA 0,57). Dennoch wurden für sämtliche Fälle ohne Lymphknotenmetastasen für beide Proteasen niedrigere Mediane ermittelt im Vergleich zu lymphknotenpositiven Fällen. Für PAI-1 ergab sich in lymphknotennegativen Fällen ein Median von 45,4 ng/mg Protein und in lymphknotenpositiven Fällen 52,8 mg/mg Protein; für uPA lag der Median bei 2,7 ng/mg Protein in lymphknotennegativen Fällen im Vergleich zu 2,9 ng/mg Protein in Fällen mit Lymphknotenmetastasen.

Betrachtet man die RNA-*in situ*-Analysen von uPA und PAI-1 mit den jeweiligen biochemischen Werten, so wird eine Zunahme der Mediane mit steigender uPA-

Expressionsintensität deutlich. Auch bei PAI-1 nehmen die Mediane mit steigender Expressionsintensität zu, wenn auch nicht kontinuierlich. Mit den durchgeführten statistischen Testverfahren lässt sich jedoch keine statistisch signifikante Assoziation nachweisen.

Bei der Verwendung von PAI-1 und uPA als binäres Merkmal entsprechend den Literaturangaben mit einem *cut-off* für PAI-1 von 14 und für uPA von 3 ng/mg Protein wurden folgende Assoziationen festgestellt:

Für die uPA-Expression in den Stromazellen und die biochemischen uPA-Werte ergab sich ein P-Wert von 0,37 (Chi-Quadrat Test nach Pearson) und in den Tumorzellen ein Wert von 0,19 (Exakter Test nach Fischer).

Für die PAI- 1-Expression in den Stromazellen und die biochemischen PAI-1-Werte wurde ein P-Wert von 0,44 (Chi-Quadrat nach Pearson) ermittelt und für die Tumorzellen ein Wert von 0,34 (Exakter Test nach Fisher).

5 Diskussion

5.1 Methode

Theoretischer Hintergrund der RNA-*in situ*-Hybridisierung

Bei der *in situ*-Hybridisierung handelt es sich um eine Methode, die verwendet wird, um sowohl DNA- als auch RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen, sowie einzelne Chromosomen zu lokalisieren. Der Vorteil im Vergleich zur Nucleinsäureanalyse durch eine Southern- oder Northern-Blot-Hybridisierung, bei der das Hybridisierungssignal auf einer festen Trägermembran sichtbar wird, besteht darin, dass der Nachweis direkt im biologischen Präparat (*in situ*) erfolgt (Leitch *et al.* 1994; Mc Laughlin u. Margolskee 1993).

Mit der bereits im Methodenteil beschriebenen RNA-*in situ*-Hybridisierung ist eine Bestimmung der RNA-Menge zu einem bestimmten Zeitpunkt möglich.

Zunächst wird das adäquat vorbereitete biologische Material (fixiert und geschnitten) auf entsprechend vorbehandelte Objektträger aufgezogen. Diese werden mit einer *in-vitro*-hergestellten, markierten RNA-Sequenz, der sog. *antisense* (AS)-Sonde inkubiert.

Diese Sonde ist komplementär zur nachzuweisenden mRNA, dem eigentlichen Gentranskript. Es folgt eine Ausbildung eines spezifischen RNA:RNA-Hybrids, d.h. eine feste, nicht-kovalente Bindung zwischen zellkernständiger mRNA und AS-Sonde über Wasserstoffbrücken.

Die Markierung der Nucleinsäuresequenz erfolgt durch den Einbau eines radioaktiven oder nichtradioaktiven Markers. In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen mit dem Radioisotop [³⁵S] durch den enzymatischen Einbau eines Nucleotids, d.h. UTP durchgeführt. Die Wahl des Isotops richtet sich nach den Erfordernissen des jeweiligen Experimentes, wobei zu berücksichtigen ist, dass mit steigender Sensitivität die Auflösung abnimmt. Bei dem hier verwendeten Radioisotop [³⁵S], einem Beta-Strahler, handelt es sich um ein Isotop mittlerer Energie, sodass ein sinnvoller Kompromiss zwischen Sensitivität und Auflösung (bzw. Streuung der Silberkörner) geschlossen wurde. Der Nachweis der gebundenen Sonde erfolgt hier mit Hilfe der Autoradiographie (Leitch *et al.* 1994; Brown 1993). Dazu werden die Objektträger mit einer strahlungssensitiven Emulsion beschichtet und getrocknet.

Die Schwärzung des Autoradiogramms entsteht durch die Wechselwirkung von β -Partikeln, die das Isotop ausstrahlt, mit Atomen der Emulsion. Die in der Emulsion enthaltenen Silberhalogenide werden zu metallischem Silber reduziert und können durch gängige photographische Methoden (Entwicklung und Fixierung) als Silberkörner sowohl in der Hell- und Dunkelfeldmikroskopie als auch in der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Für die vorliegende Arbeit stand bereits isolierte Plasmid-DNA (Vektor: pGEM-1) für die Sondenherstellung zur Verfügung.

Zunächst mussten die Plasmide linearisiert werden, d.h. aus der ringförmigen in die offene Form gebracht werden.

Allgemeine Bemerkungen zur Methode

Bei der Handhabung von Ribonukleinsäuren, aber vor allem bei der RNA:RNA-*in situ*-Hybridisierung, ist als Hauptursache für das Scheitern von Versuchen die Kontamination durch RNasen zu nennen. Diese RNA-abbauenden Enzyme sind sehr stabil und können meist ohne die Mitwirkung von Co-Faktoren selbst in kleinsten Mengen großen Schaden in RNA-Präparationen verursachen. Deshalb sollten besondere Vorsichtsmassnahmen gegen RNase-Aktivität berücksichtigt werden.

Es gilt alle Arbeiten mit möglichst ungepuderten Einmalhandschuhen durchzuführen, da die eigenen Hände eine wichtige RNase-Quelle darstellen.

Glaswaren sollten vor Gebrauch 4h bei 300°C oder 6 h bei 250°C gebacken werden. Wenn möglich, ist die Anwendung steriler Einmalplastikware vorzuziehen. Unsterile Plastikbecher können mit Chloroform ausgespült oder mehrere Stunden in 0,2 M NaOH gelegt und anschließend in RNase-freiem Wasser gewaschen werden.

Lösungen sind mit RNase-freiem Wasser anzusetzen, welches durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC 0,1%) hergestellt wird. Mit Hilfe von DEPC wird eine Inaktivierung der Ribonukleasen durch kovalente Modifikation erzielt. Tris-haltige Lösungen können nicht effektiv mit DEPC RNase-frei gemacht werden, da Tris mit DEPC reagiert und es so inaktiviert.

Es gibt zudem viele weitere Faktoren, von denen der Erfolg bei Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Riboproben abhängig ist.

Wichtig ist, dass das verwendete Radionuklid [^{35}S] innerhalb von 4-6 Wochen nach Herstellung verwendet wird.

Sämtliche Lösungen und Reagenzien sollten frisch angesetzt und sauber sein.

Im Hinblick auf Reaktionszeit und Konzentrationen konnte in dieser Arbeit auf bereits etablierte Methoden, die in vielen Vorversuchen empirisch ermittelt wurden, zurückgegriffen werden.

Als wichtigste Negativkontrolle sind parallele Hybridisierungsdurchgänge mit S-Sonden zur Bestätigung der Spezifität der Signalverteilung durchgeführt worden.

5.2 Einführung

Es sind zahlreiche und vielfältige pathologische Veränderungen der weiblichen Brustdrüse bekannt. In bösartigen Erkrankungen ist die Invasion des malignen Tumors in die umgebende extrazelluläre Matrix und die Basalmembran die Grundvoraussetzung für die spätere systemische Ausbreitung und Metastasierung. Das Auftreten von Fernmetastasen bei Brustkrebs hat eine bedeutende klinische Relevanz, da Patientinnen in diesem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung mit heutzutage verfügbaren Therapien nicht geheilt werden können. Die Invasion des normalen Gewebes, das Durchbrechen der Basalmembran und die Intravasation in das lymphatische System und in Blutgefäße durch maligne Zellen erfordert die aktive Beteiligung von hydrolytischen Enzymen.

Als Schlüsselfaktoren in der proteolytischen Kaskade konnten Faktoren des Plasminogenaktivierungssystems, so wie die Serinprotease Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) und dessen Typ 1 Inhibitor, Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI-1) oder andere Proteasen (Cathepsin D, B und L) identifiziert werden (Harbeck *et al.* 2001; Pauli *et al.* 1983). Aufgrund der ausgesprochenen Komplexität der molekularen Mechanismen von Invasion und Metastasierung, sind die Erkenntnisse auf diesem Gebiet noch nicht vollständig geklärt. Um sich der Problematik zu nähern, wird versucht die einzelnen Schritte des onkogenen Geschehens heranzuziehen und zu untersuchen (Liotta u. Stetler-Stevenson 1991).

In dieser Arbeit wird die Expression von verschiedenen Faktoren des Plasminogenaktivierungssystems in gutartigen und bösartigen Erkrankungen der weiblichen Brustdrüse betrachtet.

Dabei wurde die mRNA-Expression von Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA), der Gewebe Typ (tPA) und dessen Inhibitor Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1) untersucht.

Als Zielsetzung dieser Arbeit gilt es, die genaue zelluläre Lokalisation der mRNA der Proteasen uPA, PAI-1 und tPA in gut- und bösartigen Geweben der weiblichen Brustdrüse festzustellen und deren Expressionsmuster und Intensitäten vergleichend zu betrachten.

5.2.1 Karzinogenese der Mammaneoplasien

Die morphologische Entwicklung eines malignen Tumors so wie auch des Mammakarzinoms ist in mehrere Phasen einzuteilen (Mehrschritt-Theorie der Karzinogenese, Böcker *et al.* 1997) :

- 1. Transformation somatischer Zellen in maligne Tumorzellen (Onkogenese) durch Karzinogene und Promotoren ausgelöst und unterstützt**
- 2. Klonales Wachstum und Angiogenese**
- 3. Invasives Wachstum**
- 4. Metastasierung**

Die Entstehung des Mammakarzinoms ist ein vielschichtiger und komplexer Vorgang, bei dem verschiedene Faktoren als auslösende Ursache diskutiert werden. Neben zivilisatorischen Faktoren wie Adipositas, Diabetes mellitus, fettreicher und ballaststoffarmer Ernährung, Selenmangel, Nikotin- und Alkoholkonsum, als auch eine Strahlenbelastung ist eine genetische Disposition in 10-15% im Gesamterkrankungskollektiv von entscheidender Bedeutung. Die familiäre Belastung wird als besonders relevant angesehen, wenn Mutter und Schwester im prämenopausalen Alter an einem Mammakarzinom erkrankten und eine Mutation des Genes BRCA-1 oder BRCA-2 vorliegt. Wie Studien zeigen, besteht bei Frauen mit vorliegender BRCA-1 oder BRCA-2 Genmutation ein Risiko von 80-85%, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken. Die Häufigkeit von Mutationen des Genortes BRCA-2 wird seltener beobachtet (Duffy 2000).

Bei der Initiation, Transformation und Progression von Tumoren spielt die Funktionsstörung von Onkogenen, die auch als Protoonkogene oder zelluläre Onkogene (c-onc) bezeichnet werden, eine zentrale Rolle.

Es handelt sich hierbei um Gene, deren Expressionsprodukte physiologische Zellfunktionen wie die Regulation von Proliferation, Replikation, Metabolismus, Differenzierung und Apoptose steuern.

Die myc-Familie c-fos, c-jun u.a. ist eine wichtige Onkogen-Gruppe, die im Zellkern lokalisiert ist und für Proteine kodiert, die an DNA binden und eine enge biologische Korrelation mit dem Zellzyklus aufweisen (Böcker *et al.* 1997; Liao u. Dickson 2000). Beim Brustkrebs ist die Amplifikation des c-myc-Gens eine der häufigsten genetischen Veränderungen, die in fast einem Drittel der Fälle beobachtet werden kann. Zudem wird bei Tumoren mit einem malignen Phänotyp signifikant häufiger eine Amplifikation des c-erbB2-Onkogens festgestellt (Sato *et al.* 1991). C-erbB2 ist ein Onkogen, welches in der Zellmembran lokalisiert ist und für Wachstumsfaktorrezeptoren kodiert (Dickson u. Lippman 1995).

Aus der Gruppe der Tumorsuppressorgene, die unter physiologischen Bedingungen die Zellproliferation hemmen und somit die maligne Transformation verhindern können, hat p53 die größte Bedeutung. Mutationen dieses Gens finden sich vor allem in weit fortgeschrittenen Tumoren unterschiedlicher Herkunft. Beim Mammakarzinom gelten sie als prognostisch signifikant und werden vor allem bei besonders aggressiven Formen vorgefunden (Seshadri *et al.* 1996; Böcker *et al.* 1997).

5.2.2 Prognostische Parameter des Mammakarzinoms

Prognostische Parameter geben die initiale Einschätzung des individuellen Krankheitsrisikos wieder und sind zur Prognosevorhersage, für die Bestimmung der optimalen therapeutischen Maßnahmen, zur Beratung der Patientin sowie zur Verlaufskontrolle und Abschätzung der notwendigen Intensität der postoperativen Tumornachsorge nach Diagnosestellung von entscheidender Bedeutung. Von den prognostischen Parametern wird vor allem erwartet, dass sie zur Beantwortung der Fragen, erstens ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit die Patientin durch die primäre Therapie geheilt werden kann, zweitens ob mit einer okkulten Metastasierung gerechnet werden muss und drittens wie das Ansprechen des Tumors auf die Therapie ist, beitragen (Duffy 2000; Meuret 1996). Durch vielfältige Forschungs- und Studienarbeiten konnte das Wissen in diesem Bereich stetig erweitert werden, es gelang jedoch nicht einen einzelnen Parameter zu finden, der die Prognose mit ausreichender Sicherheit voraussagen könnte. Bei der Betrachtung mehrerer prognostischer Faktoren lassen sich für einige Patientengruppen Aussagen machen, die den zu erwartenden Krankheitsverlauf annäherungsweise beschreiben.

Zahlreiche klinische, histomorphologische und biochemische Parameter sind beschrieben worden, die von relevanter Bedeutung sind:

Tumordifferenzierungsgrad („Grading“)

Unter dem „Grading“ versteht man die Einstufung des Malignitätsgrades nach histologischen und zytologischen Kriterien, wobei vor allem die Kernatypien, Mitosen und der Differenzierungsgrad betrachtet werden. Ein höheres „Grading“ ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Böcker *et al.* 1997; Meuret 1995). Entsprechend einer modifizierten Klassifikation nach Bloom und Richardson von 1958 wird heute eine Dreiteilung angewandt:

G1 Gut differenziert (17-28%)

G2 Mäßig differenziert (34-55%)

G3 Schlecht differenziert (30-47%)

Nach der 4.Auflage der TNM-Klassifikation der UICC von 1987 ist prinzipiell ein vierstufiges System vorgesehen, wobei G4 einem undifferenzierten Tumor entspricht. Dieses System hat sich nicht durchsetzen können, sodass das bekannte dreistufige Grading beibehalten wurde (Bässler *et al.* 1992).

Das „Grading“ gehört zu den traditionell bekannten und zuverlässigsten Prognoseparametern, obwohl zu bemerken ist, dass die Subjektivität des Untersuchers in Abhängigkeit von dessen Erfahrung und Sorgfalt in die Beurteilung einfließt.

Tumorstadium („Staging“)

Das Tumorstadium bezeichnet das Ausmaß der Ausbreitung des malignen Tumors, angegeben nach dem weltweit verbreiteten Verfahren des TNM-Systems. Hierbei werden die lokale Ausbreitung des Primärtumors „T“, die regionäre Lymphknotenmetastasierung „N“ und die hämatogenen Metastasen, die sog. Fernmetastasen „M“ berücksichtigt.

Tab.5.1: Pathologisches Staging-System nach den Richtlinien der UICC (Union Internationale Contre Cancer von 1989)

Primärtumor (pT)

PT	Größe des Primärtumors nicht bekannt
pT0	kein Hinweis auf Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor bis 2 cm
T1a	bis 0,5 cm
T1b	0,5-1,0 cm
T1c	1,0-2,0 cm

- T2** Tumor 2-5 cm
T3 Tumor größer als 5 cm
T4 Hautinfiltration

Regionale Lymphknoten (pN)

- pNX** Lymphknotenbefall nicht bekannt
pN0 keine Lymphknotenmetastasen
pN1 Metastasen in beweglichen ipsilateralen LK
 pN1a ausschließlich Mikrometastasen (< 0,2cm)
 pN1b Metastasen in LK >0,2cm
 pN1bI Metastasen in 1-3 LK >0,2-2,0cm
 pN1bII Metastasen > 4 LK >0,2-2,0 cm
 pN1bIII Kapseldurchbruch der Metastasen von >0,2 cm
 pN1bIV LK-Metastase > 2,0 cm
N2 LK Metastase , ipsilateral aneinander oder an mehreren Strukturen fixiert
N3 LK-Metastase der ipsilateralen Mammaria interna Kette

Fernmetastasen (M)

- M0** keine Fernmetastasen
M1 Fernmetastasen

Die Größe des Primärtumors und der lokoregionale Lymphknotenbefall gelten als unabhängige Prognosefaktoren, wobei der Lymphknotenstatus die stärkere prognostische Relevanz hat. Bei lymphknotennegativen Mammakarzinomen, die etwa 60-70% aller diagnostizierten Mammakarzinome ausmachen und generell eine vergleichsweise günstigere Prognose haben, ist die Größe des Primärtumors von entscheidender Bedeutung (Meuret 1995). Da die Gruppe der lymphknotennegativen Mammakarzinome sehr heterogen ist und Subgruppen mit einem sehr hohen Rezidivrisiko beinhalten, werden weitere Parameter benötigt, die in der Lage sind diese Gruppen zu unterteilen. Zahlreiche Studien, wie auch diejenigen von Harbeck *et al.* (1998,1999) und Foekens *et al.* (1992, 2001) untersuchen, ob Faktoren des Plasminogensystems hierzu in der Lage sind.

Steroidhormonrezeptoren

Die Steroidhormonrezeptoren gehören zur Gruppe der „neueren“ prognostischen Faktoren, die biologische Tumorqualitäten beschreiben. Die Hormonabhängigkeit des Mammakarzinoms ist schon lange bekannt und wurde durch Jensen und Mitarbeiter bestätigt, der 1971 den Östrogenrezeptor an der Tumorzelle entdeckte (Meuret 1995).

Mit Hilfe moderner immunhistochemischer Techniken und Verwendung von monoklonalen Antikörpern ist eine Bestimmung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren möglich und wird heute routinemäßig bei malignen Mammatumoren durchgeführt (Meuret 1995; Schmidt-Matthiesen *et al.* 1998).

Es ist bekannt, dass der Östrogenrezeptor in 70% aller Mammakarzinome vorhanden ist und das Ansprechen des Tumors auf eine hormonelle Therapie entscheidend verbessert. Ein zweiter Hormonrezeptor, der Progesteronrezeptor, kann in Abhängigkeit vom Östrogen und seinem Rezeptor synthetisiert werden. Beim Vorliegen beider Hormonrezeptoren konnte beobachtet werden, dass die Ansprechrate auf eine Hormontherapie nochmals verbessert wird und somit bei 80% liegt. Eine günstigere Prognose für das rezidivfreie Intervall und die Gesamtüberlebensrate bei prä- und postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen ist, mit dem Nachweis von Östrogenrezeptoren assoziiert und dies unabhängig vom axillären Lymphknotenstatus (Stegner *et al.* 1986; Duffy u. O'Grady 1984; Pertschuk *et al.* 1980; Thompson *et al.* 1992). Ein Zusammenhang zwischen ER-positiven Tumoren und hoher Differenzierung, welches einem niedrigen histologischen „Grading“ und geringer Proliferationsaktivität entspricht, konnte nachgewiesen werden (Meuret 1995).

Erfassung der Proliferationskinetik

Zu einer weiteren Gruppe neuerer prognostischer Faktoren, die sich die Erfassung der Proliferationskinetik zunutze machen, werden drei Meßmethoden gezählt: erstens die DNA-Flußzytometrie, zweitens der Nachweis des Ki-67-Gens und drittens der 3H-Thymidinmarkierungsindex mit Bestimmung der S-Phase Fraktion. Resultate aller drei Methoden zeigten bei Zunahme der Proliferationsaktivität und Aneuploidie des Tumors einen ungünstigeren Krankheitsverlauf (Meuret 1995).

Wachstumsfaktoren

Eine Gruppe von Polypeptiden, die an der physiologischen Regulation von Zellwachstum und -differenzierung und Reparaturmechanismen beteiligt sind, werden als Wachstumsfaktoren bezeichnet (Bützow *et al.* 1993; Nicholson *et al.* 1994; Samuel *et al.* 1992). Hierzu gehören unter anderem der *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *insulin-like-growth factor I und II* (IGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming-growth factor α und β* (TGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Cullen *et al.* 1991). Von TGF wird angenommen, dass ihm eine wichtige Rolle bei der Wachstumskontrolle von Brustkrebs zuteil wird, speziell bei den hormonunabhängigen Formen. Es wird von einer Förderung der Tumorproliferation durch diese Polypeptide mit Hilfe einer abnormalen Signaltransduktion ausgegangen (Travers *et al.* 1988).

VEGF, einer der wichtigsten Regulatoren der Tumorangiogenese, und die lösliche Form seines Rezeptors (sVEGFR1) sollen einen unabhängigen prognostischen Indikator darstellen (Toi *et al.* 2002).

Proteinasen und Kathepsine

Die Proteinasen nehmen eine Schlüsselfunktion bei den Prozessen der Invasion und Metastasierung, den wichtigsten und zugleich lebensbedrohlichsten Merkmalen maligner Tumoren ein. Als Invasion (syn. Infiltration) wird ein aktives Einwachsen von Tumorzellen in das normale Gewebe bezeichnet. Mit diesem Vorgang ist eine Destruktion der normalen, umgebenden Zellstrukturen verbunden (Böcker *et al.* 1997).

Das invasive Wachstum kann folgendermaßen in drei Schritte unterteilt werden:

1. Als Voraussetzung für das invasive Wachstum erfolgt zunächst eine Tumorzelldissoziation. Damit sich einzelne Tumorzellen aus dem organisierten Tumorzellverband lösen können, ist eine Verminderung oder ein Verlust von intrazellulären Haftstrukturen notwendig.
2. Bei dem wesentlichen Mechanismus der Degradation von extrazellulärer Matrix, wie z.B. der Basalmembran spielt die Sekretion und Aktivierung degradierender Enzyme eine bedeutende Rolle. Die Grundsubstanz der EZM besteht aus Glykoproteinen und Proteoglykanen, in der sich Kollagene und Elastin miteinander verflechten. Der Abbau der Kollagenfasern durch Proteasen wird als entscheidender und irreversibler Schlüsselschritt angesehen. Zahlreiche Inhibitoren der proteolytischen Enzyme sind bekannt, die durch Hemmung sowohl latenter als auch aktivierter Proteinasen die Degradation der EZM verhindern können.
Die lokale Matrixdegeneration erfolgt beim Überwiegen hydrolisierender Enzyme, die sowohl membrangebunden, als auch ungebunden vorliegen können, über deren Inhibitoren.
3. Nun ist die Migration (Lokomotion) eine aktive amöboide Fortbewegung der Tumorzellen, die auf dem Aktinfilamentsystem beruht, möglich. Die auf der Tumorzelle befindlichen Adhäsionsmoleküle, die auch als Integrine bezeichnet werden, unterstützen diesen Vorgang, in dem sie sich mit ihrer extrazellulären Domäne an Laminin, Fibronectin oder Vitronectin anheften können .

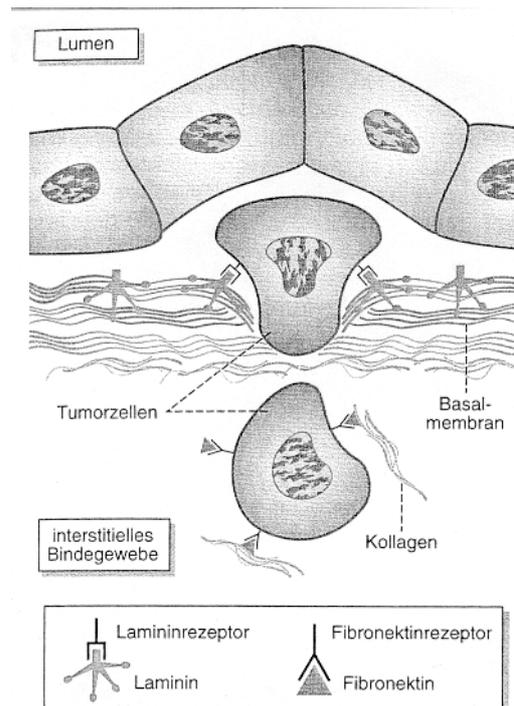


Abb.5.1: Schematische Darstellung der Invasion eines malignen Tumors nach Böcker

Als Metastasierung wird die Verschleppung von Tumorzellen vom Primärtumor an einen anderen Ort mit der Ausbildung einer Metastase bezeichnet. Sie kann lymphogen, hämatogen oder kavitär erfolgen und gliedert sich in mehrere Schritte (Metastasierungskaskade).

Zunächst müssen die Tumorzellen in die Metastasierungswege eindringen. Bei der hämatogenen Metastasierung bedeutet dies, dass die Tumorzellen in Kapillaren und kleine Venen (Intravasation) eintreten. Es folgt eine Verschleppung der Tumorzellen und schließlich das An- und Weiterwachsen am Zielort mit Ausbildung einer Metastase. (Böcker *et al.* 1997).

An der Hydrolyse der Matrixbestandteile sind neben Glukosidasen vor allem Proteasen beteiligt. Die Endopeptidasen (Proteinasen) bilden innerhalb der Gruppe der Proteasen den größten Anteil. Eine Subklassifizierung wird in Abhängigkeit der reaktiven Gruppe ihrer aktiven Zentren in Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen vorgenommen.

Tab. 5.2 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Proteinase und deren Hauptsubstrate (in Anlehnung an Pauli u. Knudson 1988, Liotta 1983 u. Athar 2000)

Tab. 5.2: Proteinasen und deren Hauptsubstrate

Enzymklasse	Beispiele	Hauptsubstrate
Serin -Proteinasen	Urokinase-type PA (uPA) Tissue-type PA (tPA) Plasmin Elastase Kathepsin G	Plasminogen Fibrin Latente Kollagenasen Elastin, Kollagene Kollagene
Cystein-Proteinasen	Kathepsin B Kathepsin H Kathepsin L	Kollagene
Aspartat-Proteinasen	Kathepsin D	Kollagene
Metalloproteinasen	Kollagenasen Gelatinasen Stromyelysine	Kollagene, Proteoglykane

Es wurden bereits bei sämtlichen hier zusammengefassten Proteinasen Verbindungen mit einem invasiven Phänotyp hergestellt (Duffy *et al.* 1996; Tetu *et al.* 1998, 2000).

Unter den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wird eine große Gruppe verschiedener, neutraler Endopeptidasen zusammengefasst, die mit der Auflösung von Kollagen, dem Hauptbestandteil der EZM in Verbindung gebracht werden. Die Sezernierung der MMPs erfolgt fast ausnahmslos als Zymogene, also als inaktive Pro-Enzyme, sodass sie erst nach extrazellulärer enzymatischer Aktivierung durch Proteasen wie Plasmin oder Kathepsin oder aber durch Autokatalyse ihre Wirkung entfalten können (Böcker *et al.* 1997).

Bei den Cystein-Proteinasen scheinen die Kathepsine B, L, und D an der Tumorentwicklung beteiligt zu sein. Kathepsin D soll eine Rolle bei der Aktivierung von Kathepsin B und L spielen, die wiederum uPA aktivieren können (Tetu *et al.* 1998, 2000). Ein Nachweis hoher Kathepsin D-Konzentrationen im Cytosol von Brustkrebszellen konnte mit einer kürzeren Überlebenszeit in Verbindung gebracht werden und auch ein Nachweis von Kathepsin B zeigte eine Korrelation mit einer schlechten Prognose (Duffy *et al.* 1991, 1998; Jänicke *et al.* 1999).

5.2.3 Die Proteinase uPA, PAI-1 und tPA

Gerade den Faktoren des Plasminogenaktivierungssystems, die seit vielen Jahren Gegenstand aktiver Forschung sind, wird eine Schlüsselfunktion in der proteolytischen Kaskade, die zur Tumorinvasion und Metastasierung führt, zugeschrieben (Duffy 2000; Harbeck *et al.* 1999,2001).

Das fibrinolytische System spielt nicht nur eine entscheidende Rolle in der Pathogenese maligner Erkrankungen, sondern ist auch an der intravaskulären Auflösung von Fibrinthromben, physiologischen Reproduktionsvorgängen, Wundheilung, Angiogenese und Gewebeneubildung beteiligt (Bell 1996). In den späten 1980er Jahren berichteten Duffy und seine Mitarbeiter (Duffy *et al.* 1988) erstmals über einen Zusammenhang zwischen erhöhter enzymatischer Aktivität von uPA in Mammakarzinomen und einer schlechten Prognose. In späteren Studien wurde festgestellt, dass nicht nur uPA, sondern auch sein Inhibitor PAI-1 eine bedeutende prognostische Aussagekraft beim Mammakarzinom unabhängig vom Lymphknotenstatus hat. (Jänicke *et al.* 1991, 1993).

In zahlreichen, international unabhängig voneinander arbeitenden Forschergruppen konnte bestätigt werden, dass hohe uPA und PAI-1 Antigen-Werte mit einer kürzeren rezidivfreien Zeit und Gesamtüberlebenszeit beim Mammakarzinom zusammenhängen. (Duffy *et al.* 1990; Jänicke *et al.* 1993,1994; Foekens *et al.* 1992,1994; Grondahl-Hansen *et al.* 1993, Duggan *et al.* 1995). Auch bei anderen malignen Tumoren wie bei Karzinomen der Cervix uteri (Kobayashi *et al.* 1994), des Ovars (Kuhn *et al.* 1994; van der Burg *et al.* 1996), Kolon (Ganesh *et al.* 1994,1996; Mulcahy *et al.* 1994) Magen (Cho *et al.* 1996, Nekarda *et al.* 1994), Niere (Hofmann *et al.* 1996), Harnblase (Hasui *et al.* 1992), sowie bei Hirntumoren (Bindahl *et al.* 1994), in Adenokarzinomen der Lunge (Ishida *et al.* 1992) und Weichteilsarkomen (Choong *et al.* 1996) konnte eine Auswirkung dieser proteolytischen Faktoren auf die Prognose festgestellt werden. In einigen Studien zeigte sich, dass die prognostische Information, die durch uPA-Antigen-Bestimmung erhalten wird, unabhängig von den klassischen prognostischen Faktoren wie Tumorgroße und Lymphknotenstatus ist (Duffy *et al.* 1999; Jänicke *et al.* 1992).

Kürzlich konnte in großen prospektiven, randomisierten Studien die prognostische Vorhersagekraft von uPA und PAI-1 bei nodalnegativen Brustkrebspatientinnen bestätigt werden (Jänicke *et al.* 2001; Prechtel *et al.* 2000).

Die Serinprotease *urokinase plasminogen activator* (uPA), die Hauptform des Plasminogenaktivators, ist beteiligt an Vorgängen der zellulären Migration, Gewebewiederherstellung und durch Degradierung der EZM auch an der Tumorausbreitung. Die andere Form des Plasminogenaktivators, als *tissue-type-plasminogen activator* (tPA) bekannt, spielt eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse. Obgleich sie unterschiedliche biologische Funktionen haben, sind beide Plasminogenaktivatoren von prognostischer Bedeutung bei malignen Tumoren (Duffy *et al.* 1996; Yamashita *et al.* 1993).

Es wurde festgestellt, dass die Gesamtüberlebenszeit von Brustkrebspatientinnen mit niedrigen tPA-Werten (semiquantitativ histochemische Zymographie) signifikant kürzer ist (Chappuis *et al.* 2001).

Auch Ruppert *et al.* stellten bei der biochemischen Untersuchung verschiedener Proteasen ein ähnliches Ergebnis fest: tPA-Level waren in dem untersuchten Kollektiv von gynäkologischen Tumoren (Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und andere) in malignen Veränderungen deutlich niedriger als in benignen Läsionen. Bei der Betrachtung der Mammakarzinome konnten sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen niedrigen tPA-Werten und einer ungünstigeren Prognose (höhere Rezidivrate und kürzerer Gesamtüberlebenszeit) feststellen (Ruppert *et al.* 1997).

Rella *et al.* postulieren einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem tPA-Antigen Gehalt (ELISA) und dem Steroidhormonrezeptorstatus, wobei ein hoher tPA-Wert mit positivem Steroidhormonrezeptorstatus einherging (Rella *et al.* 1993).

Die am besten dokumentierte Rolle von uPA ist die Aktivierung des inaktiven Plasminogen in die Serinprotease Plasmin zu katalysieren. Hierzu muss uPA, welches von Tumor- oder Stromazellen zunächst als inaktive Vorstufe pro-uPA sezerniert wurde, zunächst an seinen spezifischen Rezeptor, uPA-R (CD87) an der Tumorzelloberfläche binden. Nahezu alle Funktionen von uPA werden ausgeführt, während die Protease an seinen spezifischen Rezeptor gebunden ist. Plasmin, eine Proteinase mit einem weiten Spektrum ist in der Lage, die meisten Komponenten der EZM direkt zu degradieren oder aber durch die Aktivierung von Metalloproteinasen die Auflösung von Kollagen und anderen EZM-Bestandteilen zu bewirken (Foekens *et al.* 2001; Schmitt *et al.* 1997; Pedersen *et al.* 2000).

Zudem soll Plasmin an der Aktivierung und Freisetzung bestimmter Wachstumsfaktoren, wie TGF-Beta und basic FGF (bFGF) beteiligt sein. Die Bedeutung dieser Vorgänge an der Tumorausbreitung ist weniger klar, jedoch stimulieren TGF-Beta und bFGF die Angiogenese. Das bedeutet eine Anregung zum Wachstum neuer Blutkapillaren aus bereits existierenden Gefäßen. Für das dreidimensionale Tumorwachstum ist diese Angiogenese unbedingt erforderlich und Studien belegen, dass die Dichte von Blutgefäßen innerhalb eines Tumors mit dessen Fähigkeit zur Metastasierung korreliert. (Duffy 1996, Weidner *et al.* 1991). Die proteolytische Aktivität von uPA wird von seinem Inhibitor PAI-1 und PAI-2 kontrolliert. Durch Bindung an den PA-R/uPA Komplex an der

Zelloberfläche entsteht ein enzymatisch inaktiver Rezeptor-Protease-Inhibitor-Komplex, der von der Tumorzelle internalisiert wird.

PAI-1, der hauptsächliche Inhibitor von uPA, wird als aktives aber aufgrund seiner Konstitution instabiles Protein sezerniert, welches einen raschen Aktivitätsverlust erleidet, wenn es nicht durch die Bindung an das EZM-Protein Vitronektin stabilisiert wird (Pedersen *et al.* 2000).

Die Assoziation einer erhöhten Expression von PAI-1 mit einer ungünstigen Prognose erscheint zunächst paradox, da man vermutet, dass ein Inhibitor des Plasminogen-Aktivierungssystems während des Tumorinvasionsprozesses reduziert sein müsste. Es wird jedoch angenommen, dass PAI-1 während eines Abschnittes des Invasionsprozesses erhöht ist, um den Tumor selbst vor unkontrollierter Proteolyse zu schützen und falls notwendig, die Bildung neuer EZM zuzulassen (Dublin *et al.* 2000; Bianchi *et al.* 1995). Zudem wird diskutiert, dass PAI-1 über die Hemmung der Proteolyse einen fördernden Einfluss auf die Tumorangiogenese hat, da eine exzessive Plasminproteolyse der Tumorangiogenese vermutlich entgegenwirkt. (Dano *et al.* 2001).

Da die Komponenten des Plasminogensystems mit Hilfe von proteolytischen und nichtproteolytischen Mechanismen an der Zelladhäsion und Migration beteiligt sind, ist es verständlich, dass Interaktionen zwischen dem zellgebundenen Adhäsionsrezeptor uPA-R und EZM-assoziierten Liganden beeinflusst werden. Durch das Anheften von uPA oder uPA-Fragmenten an die rezeptorbindende Domäne wird die Bindung von uPA-R an Vitronektin, ein EZM-assoziiertes Ligand, verbessert. Die Bindung von uPA-R an Vitronektin kann durch PAI-1 verhindert werden und somit ist eine schrittweise Zellmigration möglich. Den Tumorzellen wird somit eine Adhäsion an der EZM ermöglicht und durch Lösung dieser Verbindung ist auch eine Fortbewegung möglich (Foekens *et al.* 2000).

Die Serinprotease uPA soll auch zu einer direkten Degradierung spezieller EZM-Proteine wie Fibronektin in der Lage sein. Typ IV-Kollagenasen können direkt durch uPA aktiviert werden und somit Typ IV-Kollagen, das Hauptstrukturprotein der Basalmembran spalten (Duffy *et al.* 1993; 1996; Reith *et al.* 1992). Im Hinblick auf die Metastasierung erscheinen auch andere Fähigkeiten von uPA relevant zu sein wie beispielsweise die Stimulation der Mitogenese über die Aktivierung von Wachstumsfaktoren. Der Hepatozytenwachstumsfaktor HGF, der nicht nur das Hepatozytenwachstum stimuliert, sondern auch das Wachstum anderer Zellen wie epithelialen und endothelialen Zellen fördert, wird von uPA aktiviert (Duffy 1996).

Auch auf den Prozess der Migration, der für metastasierende Zellen neben der EZM-Degradierung essentiell ist, hat uPA einen fördernden Einfluss. Pro-Urokinase soll über einen Mechanismus der Signaltransduktion die Migration von Epithelzellen verstärken, unter Einbezug der Protein-Kinase C (Duffy 1996; Busso *et al.* 1994).

Neben diesen Eigenschaften von uPA wird auch die Beteiligung von uPA an der Modulation zellulärer Adhäsionsmoleküle diskutiert, die für eine Zelldisseminierung im Metastasierungsprozess notwendig ist (Waltz *et al.* 1993; Duffy 1996).

Faktoren des Plasminogenaktivierungssystems wie uPA und PAI-1 werden als potentielle Ziele einer antimetastatischen Therapie betrachtet. Dies könnte möglich sein, indem die Bindung von uPA an seinen spezifischen Rezeptor uPAR verhindert wird, durch Reduktion der Proteinaseexpression oder Einschränkung ihrer katalytischen Aktivität (Duffy 1996).

5.3 In situ-Detektion der untersuchten Proteinase

5.3.1 In situ-Detektion der uPA-Expression

Normalgewebe und Mastopathien:

Alle in dieser Studie untersuchten Normalgewebe und Mastopathien waren für uPA mit einer Ausnahme negativ. Als Ausnahme zeigte sich der Fall der Duktalen Hyperplasie mit einer schwachen Markierung für uPA im Lappchen- und Gangepithel.

Die dänische Gruppe von Boye *et al.* untersuchte ebenfalls die uPA-Expression an einigen gutartigen Mammaläsionen. Sie stellten fest, dass von den 6 untersuchten Fällen der Fibroadenome alle negativ waren und nur in dem Fall des intraduktalen Papilloms ein schwacher uPA-Nachweis in periduktalen Stromazellen erbracht werden konnte. Normales Brustdrüsengewebe zeigte wie in dieser Studie keine positive Markierung für uPA (Boye *et al.* 1996). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Umeda *et al.* in den 4 untersuchten Fällen von benignen Mammaläsionen (Fibroadenom, Papillom und 2 Fälle von hyperplastischen Mastopathien) teilweise schwache uPA-Expressionssignale nachweisen. Im normalen Brustdrüsengewebe konnten sie jedoch ebenso wie Fisher *et al.* keine uPA-mRNA-Expression nachweisen (Umeda *et al.* 1997; Fisher *et al.* 2000).

In situ und invasive Karzinome:

Sämtliche hier untersuchten *in situ*-Karzinome waren für uPA negativ.

In der Arbeit von Fisher *et al.* hingegen konnte uPA in 13 Fällen von DCIS mit einer schwachen bis mittelstarken Expressionsintensität im Cytoplasma von Tumorzellen und ebenfalls, weniger ausgeprägt, in duktalem Epithelzellen lokalisiert werden.

Gelegentliche Signale zeigten sich auch über den Stromazellen (Fisher *et al.* 2000).

In der Gruppe der invasiven Karzinome konnte eine positive Markierung für uPA in 59% der Fälle nachgewiesen werden. Diese war hauptsächlich über den Stromazellen lokalisiert, in einigen wenigen Fällen nur auf den Tumorzellen und in 11 Fällen wurden positive Hybridisierungssignale über Tumor- und Stromzellen nachgewiesen. Die positiven Stromazellen befanden sich stets in unmittelbarer Umgebung der Tumorzellen.

Die hier beschriebenen Expressionsmuster von uPA in invasiven Karzinomen, zeigen in einigen Aspekten Übereinstimmungen zu vorherigen Studien, aber auch gegensätzliche Befunde.

Die dänische Gruppe von Nielsen *et al.* untersuchte die mRNA-Expression von uPA mit ISH an 28 Fällen von duktalem Mammakarzinomen und lobulären Karzinomen. Abweichend von den Ergebnissen dieser Studie, in der nur etwa 65% der duktalem und lobulären Karzinome positive Hybridisierungssignale für uPA zeigten, konnten sie in den meisten Fällen der invasiven Karzinome uPA-Hybridisierungssignale nachweisen. Diese wurden in fast allen Fällen über den Stromazellen (zwischen Tumorzellnestern und Stroma) lokalisiert. Mit den Untersuchungsergebnissen übereinstimmend konnten auch sie den Trend feststellen, dass die uPA Expressionsintensität in den lobulären Karzinomen weniger ausgeprägt war im Vergleich zu den duktalem Karzinomen. Zur genauen Identifizierung der Fibroblasten-ähnlichen Stromazellen wurden immunhistochemische Untersuchungen vorgenommen, die zeigten, dass es sich bei den positiv markierten Zellen um Myofibroblasten handelt. Von diesen zahlreich im gesamten Tumorstroma verteilten Myofibroblasten zeigten jedoch nur die tumorzellnesterumgebenden Myofibroblasten eine deutlich stärkere uPA-Expression. Bei dem Myofibroblast handelt es sich um eine fibroblastische Zelle mit einer Differenzierung ähnlich einer glatten Muskelzellen, die zunächst in Prozessen der Wundheilung beobachtet wurde. In weiteren Studien zeigte sich, dass diese Zellen 80% der Stromazellen in duktalem Mammakarzinomen und intraduktalem Papillomen ausmachen, in anderen Mastopathien nur sehr selten und in normalem Brustdrüsengewebe gar nicht vorkommen (Sappino *et al.* 1988).

Von Nielsen *et al.* wird die Vermutung nahegelegt, dass Tumorzellen in duktalem Mammakarzinomen uPA produzierenden Myofibroblasten und uPAR-produzierende

Makrophagen rekrutieren und schließlich die Gesamtheit dieser Zellen die Fähigkeit zur Tumorinvasion haben sollen (Nielsen *et al.* 1996)

Tetu *et al.* untersuchte an einem großen Fallkollektiv die Expression von Kathepsin D (immunhistochemisch), Gelatinase A, Stromelysin und uPA (ISH). Auch hier zeigte sich, ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung, dass uPA in 64,7% aller mit ISH untersuchten Fälle exprimiert wurde. Die positiven Hybridisierungssignale für uPA wurden fast ausschließlich über reaktiven Stromazellen, die den Tumor umgeben, gefunden. In nur einem Prozent der Fälle wurde eine fokale Expression von uPA über den Tumorzellen festgestellt. Unter dem Begriff der Stromazellen wurden Fibroblasten und fibroblastenähnliche Zellen, aber auch Makrophagen und Blutkapillaren zusammengefasst. Obgleich die meisten Forschungsarbeiten über das Mammakarzinom sich auf die Tumorzellen konzentrieren, gibt es Hinweise, die die essentielle Rolle von reaktivem Stroma im Tumorwachstum nahe legen. Hierbei wird vermutet, dass Stromazellen sich durch Geweberemodellierung aktiv an der Tumorinvasion und Metastasierung beteiligen. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass die Expression der Proteasen durch reaktive Stromazellen als eine Antwort auf eine von den Tumorzellen ausgehende Stimulation betrachtet werden kann. Als Mechanismus über den Tumorzellen die Proteasenproduktion induzieren können wird ein parakriner Einfluss diskutiert; um jedoch Kenntnisse über den exakten Mechanismus zu gewinnen sind weitere Studien notwendig (Tetu *et al.* 1998).

In der Studie von Umeda *et al.* wurden die uPA-mRNA-Signale neben ihrer Lokalisation über Fibroblasten und Myoepithelien nahe den Tumorzellen überwiegend in dem Cytoplasma der Tumorzellen detektiert (Umeda *et al.* 1997). Ein ähnliches Ergebnis konnten Escot *et al.* vorweisen, die eine uPA-Expression in Tumor- und Stromazellen feststellten (Escot *et al.* 1996).

Bei der Untersuchung anderer Karzinome auf die uPA-mRNA-Expression konnten auch unterschiedliche Expressionsmuster festgestellt werden: im Adenokarzinom des Kolons fanden Pyke *et al.* (1991) hauptsächlich eine Expression in den Stromazellen (Fibroblasten), die an den Tumor angrenzen. Eine andere Lokalisation uPA-exprimierender Zellen stellten Delbaldo *et al.* fest. In ihrer Untersuchung am Adenokarzinom des Kolons wurden uPA-Hybridisierungssignale über Entzündungszellen und nicht über Tumorzellen detektiert (Delbaldo *et al.* 1995).

In mikroinvasiven Cervixkarzinomen und in invasiven Cervixkarzinomen konnte uPA-Transkript in atypischen Epithelzellen nachgewiesen werden (Riethdorf *et al.* 1999).

Im Bronchialkarzinom wurden uPA-Hybridisierungssignale in den meisten Fällen sowohl in Tumor als auch in Stromazellen festgestellt (Bolon *et al.* 1995).

Auch de Vries *et al.* wiesen uPA-mRNA in Stromazellen und Tumorzellen an der Invasionsfront bei Melanomen nach.

Interessanterweise konnten sie immunhistochemisch ein ähnliches Verteilungsmuster des uPA-Proteins wie deren mRNA nachweisen (de Vries *et al.* 1994).

Vergleich mit immunhistochemischen Arbeiten

Neue Aspekte ergibt die Betrachtung immunhistochemischer Arbeiten, die es ermöglichen, die zelluläre Lokalisation des uPA-Proteins festzustellen. Da es sich bei uPA um ein sezerniertes Molekül handelt, ist es durchaus denkbar, dass seine Lokalisation nicht mit dessen mRNA übereinstimmt. Es ist davon auszugehen, dass der Sekretion eines Proteins durch die produzierende Zelle eine Rezeptorbindung und Endozytose einer anderen Zelle folgt (Andreasen *et al.* 1997). Einige immunhistochemische Arbeiten mit teilweise diskrepanten Ergebnissen sind publiziert.

Einige Gruppen gehen aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse davon aus, dass die uPA-Immunreaktivität fast ausschließlich mit den Stromazellen assoziiert sei. Nielsen *et al.* stellten in den von ihnen immunhistochemisch mit drei verschiedenen uPA-Antikörpern untersuchten duktalem Mammakarzinomen fest, dass die Expressionssignale überwiegend über Stromazellen (Myofibroblasten und Makrophagen) lokalisiert war. Die Hälfte der Karzinome zeigte auch uPA-Expressionssignale über den Endothelzellen, aber nur in einer kleinen Subpopulation (in 3 von 25 Fällen) konnte das uPA-Antigen in Tumorzellen nachgewiesen werden (Nielsen *et al.* 2001). Auch Kennedy *et al.* (1998) und Visscher *et al.* (1993, 1995) stellten fest, dass die Immunfärbung hauptsächlich über den Stromazellen lag. Kennedy *et al.* lokalisierten die uPA-Signale über Stromazellen, die sie als Fibroblasten, Myofibroblasten und Makrophagen identifizierten, Visscher *et al.* beschrieb die uPA positiven Zellen als Stromazellen, einschließlich Endothelzellen.

In anderen Studien wurde die uPA-Expression über beiden Zelltypen, Stroma- und Tumorzellen lokalisiert (Carriero *et al.* 1994; Christensen *et al.* 1996; Jähkola *et al.* 1999; Dublin *et al.* 2000).

Im Gegensatz zu den beschriebenen Expressionsmustern von uPA wird auch berichtet, dass die uPA Immunreaktivität ausschließlich oder hauptsächlich in den Tumorzellen

lokalisiert waren (Jänicke *et al.* 1991; Costantini *et al.* 1991, 1996; Damjanovich *et al.* 1994; Del Vecchio *et al.* 1993; Jankun *et al.* 1993; Sumiyoshi *et al.* 1991).

Über die Ursachen der Diskrepanzen dieser Arbeiten kann nur spekuliert werden. Es ist durchaus möglich, das auch Unterschiede in der gewählten Methode oder im Fallkollektiv zu anderen Ergebnissen führen (Nielsen *et al.* 2001).

Statistisch ergab sich in dieser Arbeit ein auffälliger Zusammenhang zwischen der uPA-Expression in den Stromazellen und dem Lymphknotenstatus (P: 0,01), wobei eine erhöhte Expressionsintensität von uPA mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen einherging. Mit einer Zunahme des histologischen Gradings ist der Trend ersichtlich, dass die Expressionsintensität von uPA über den Stromazellen ebenfalls zunimmt, mutmaßlich wegen des kleinen Stichprobenumfangs liegt dieser Unterschied noch im Zufallsbereich (P: 0,14).

Tetu *et al.* konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der uPA-Expression und dem LK-Status, dem histologischen Grading, der Tumorgroße und der Abwesenheit von Östrogen- und Progesteronrezeptoren feststellen. Interessanterweise konnten sie bei dem Vergleich ihrer Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf feststellen, dass die Prognose von Patienten mit einer Überexpression der drei Proteinasen (uPA, Gelatinase A und Stromelysin 3) im Tumorgewebe signifikant schlechter war, im Vergleich zu Fällen, in denen mindestens eine Proteinase nicht exprimiert wurde. Diese Resultate fügen sich in das Konzept, dass die Vielzahl der Proteasen sich wechselseitig beeinflussen und die Proteasenkaskade, die zur Tumordinvasion notwendig ist durch die Abwesenheit einer Protease inhibiert werden kann (Tetu *et al.* 1998, 1999).

Einen signifikanten Zusammenhang zwischen der uPA Expressionsintensität und dem „Grading“ konnten Umeda *et al.* ebenfalls nachweisen, nicht jedoch mit dem Lymphknotenstatus. Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen einer starken uPA-mRNA-Expression in den Tumorzellen und einer signifikant schlechteren Prognose hergestellt werden (Umeda *et al.* 1997).

5.3.2 In situ Detektion der PAI-1 Expression

Normalgewebe und Mastopathien:

PAI-1-mRNA konnte in 2 von 4 Fällen des untersuchten Normalgewebes in den Stromazellen nachgewiesen werden.

Bei den Mastopathien zeigten sich in 4 von 7 Fällen positive Hybridisierungssignale für PAI-1, wobei die Markierungen über den Stromazellen lokalisiert waren (bis auf einen Fall) und eine überwiegend schwache bis mittlere Expressionsintensität zeigten.

Mit den Ergebnissen dieser Studie teilweise übereinstimmend sind die Ergebnisse von Fisher *et al.*.

In den 5 untersuchten Fällen von normalem Brustdrüsengewebe konnten in 3 Fällen schwach positive PAI-1-Hybridisierungssignale festgestellt werden, wobei diese jedoch über den Epithelzellen lokalisiert wurden (Fisher *et al.* 2000).

Auch Umeda *et al.* konnten sehr schwache, aber spezifisch Signale im normalen Epithel von Tumorgewebe, aber nicht in Stromazellen feststellen. Bei den Mastopathien zeigte seine Arbeit eine schwache Markierung für PAI-1-mRNA über den Epithelzellen und Fibroblasten in den 4 untersuchten Fällen.

In situ und invasive Karzinome:

Für PAI-1 ergab sich ein homogeneres Expressionsmuster im Vergleich zur Expression von uPA und tPA. In über zweidrittel der *in situ*-Karzinome konnten meist schwache Hybridisierungssignale über den tumornahen Stromazellen lokalisiert werden.

Auch Fisher *et al.* stellten in 9 von 13 DCIS Fällen positive PAI-1-Hybridisierungssignale fest, die im Gegensatz zu dieser Arbeit über den Tumorzellen lokalisiert waren.

In dieser Arbeit zeigten von den invasiven Karzinomen die meisten eine Expression von PAI-1, wobei die Expressionsintensität von schwach bis stark überwiegend über den peritumoralen Stromazellen beobachtet wurde. In einigen Fällen befanden sich die Hybridisierungssignale auch über den Tumorzellen. In nur ca. 12% der Fälle konnte eine PAI-1-Expression über den Tumorzellen lokalisiert werden, überwiegend zeigte sich die Expression über tumornahen Stromazellen.

Eine sehr variable PAI-1-Expression wurde von Fisher *et al.* festgestellt. Von 23 untersuchten invasiven duktalem Mammakarzinomen zeigten 7 eine moderate und 13 eine schwache Expressionsintensität, die über den Tumorzellen innerhalb der Tumorzellnester und, weniger ausgeprägt, über den Stromazellen lokalisiert wurden (Fisher *et al.* 2000).

Umeda *et al.* untersuchten die PAI-1-Expression an einem Fallkollektiv von 10 intraduktalen Mammakarzinomen und stellten eine Expression sowohl in den Tumorzellen (lokalisiert in der Peripherie der Invasionsfront) als auch in den Stromazellen (Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen) fest (Umeda *et al.* 1997).

Die unterschiedlichen Expressionsintensitäten der invasiven und DCIS-Karzinome lässt vermuten, dass für die vollständige uPA/PAI-1-Expression, die möglicherweise durch lokale Cytokine und/oder Veränderungen der Adhäsionsmoleküle vermittelt wird, der Verlust der Basalmembran und Myoepithelschicht notwendig ist.

Vergleich mit immunhistochemischen Arbeiten:

Immunhistochemisch wurde das PAI-1-Protein von Bianchi *et al.* hauptsächlich in der stromalen Komponente (in 15 von 20 invasiven Mammakarzinomen) nachgewiesen. Die PAI-1 positiven Fibroblasten wurden in unmittelbarer Umgebung des Tumorknotens oder der Tumorränder lokalisiert. Auch wurden Hybridisierungssignale über tumorinfiltrierenden Makrophagen, Endothelzellen und in 11 von 20 Fällen in Tumorzellen nachgewiesen (Bianchi *et al.* 1995). Dublin *et al.* und Umeda *et al.* stellten positive Signale für PAI-1 hingegen überwiegend in den Tumorzellen fest. Die Expression von PAI-1 in Tumorzellen zeigte in der Studie von Umeda *et al.* keinen Zusammenhang mit der Prognose, eine starke PAI-2-Expression konnte jedoch mit einer signifikant besseren Prognose in Verbindung gebracht werden. Aus diesen Resultaten wurde gefolgert, dass PAI-2, aber nicht PAI-1 die uPA-Aktivität inhibiert und somit die EZM-Degradierung limitieren kann (Dublin *et al.* 2000; Umeda *et al.* 1996).

Jahkola *et al.* und Costantini *et al.* lokalisierten ebenfalls die PAI-1-Signale überwiegend über dem Cytoplasma der Tumorzellen (Jahkola *et al.* 1999; Costantini *et al.* 1996).

Bei dem Vergleich der PAI-1 Expressionsintensität in Stroma- und Tumorzellen mit anderen Parametern wie dem Lymphknotenstatus und dem „Grading“ fand sich ein statistisch auffälliger Zusammenhang zwischen der stromalen PAI-1-Expression und dem histologischen „Grading“. Es wurde eine Expressionszunahme bei schlechter differenzierten Tumoren deutlich (siehe Kreuztabelle 4.12, P-Wert: 0,037).

In einigen immunhistochemischen Arbeiten wurden Vergleiche der PAI-1-Expression mit anderen Parametern sowie dem klinischen Verlauf durchgeführt.

Dublin *et al.* konnten auch einen signifikanten Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expression in Tumor- und Stromazellen und dem histologischen Grading und der Tumorgröße feststellen, jedoch keinen statistischen Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus (Dublin *et al.* 2000). Jahkola *et al.* wiesen keinen Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expression und anderen prognostischen Parametern (Tumorgröße, Grading, Lymphknotenstatus, erbB-2 Onkoprotein, p53 Protein, Ki-67 Antigen) nach. Es wurde jedoch eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der stromalen PAI-1-Expression und dem Auftreten von Fernmetastasen sowie lokalen Rezidiven festgestellt (Jahkola *et al.* 1999).

5.3.3 In situ Detektion der tPA Expression

Normalgeweben und Mastopathien:

In allen auf tPA untersuchten Mastopathien und Normalgeweben war eine mittelstarke bis starke Expressionsintensität über dem Läppchen- und Gangepithel auszumachen.

In situ und invasive Karzinome:

Das Expressionsmuster von tPA zeigte dagegen ein sehr heterogenes Bild. In sämtlichen *in situ*-Karzinomen fielen positive Markierungen auf, die bis auf eine Ausnahme über dem Läppchen- und Gangepithel lokalisiert wurden und eine schwache bis mittlere Intensität zeigten. Bei den auf tPA untersuchten invasiven Karzinomen wurden Hybridisierungssignale über dem Läppchen- und Gangepithel und Tumorzellen festgestellt, selten auch über den Stroma- und Endothelzellen.

Vergleich mit immunhistochemischen Arbeiten:

Immunhistochemisch konnte tPA in Tumorzellen lokalisiert werden (Damjanovich *et al.* 1994). Jankun *et al.* gehen davon aus, dass die in den Tumorzellen detektierte tPA Expression zufällig und nicht mit malignen oder benignen Veränderungen assoziiert sei, da die Überexpression von tPA in beiden Veränderungen gleich häufig beobachtet wurde (Jankun *et al.* 1993). Bei der Untersuchung des Kolons auf tPA Immunreaktivität wurde dieses in den Endothelzellen von normalem Gewebe und im Adenokarzinom des Kolons lokalisiert (Grondahl-Hansen *et al.* 1991). In der Untersuchung des tPA Antigens mittels ELISA stellten Sumiyoshi *et al.* keinen Unterschied zwischen Mastopathien (Fibroadenome) und invasiven Karzinomen fest (Sumiyoshi *et al.* 1991).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Protease tPA in malignen Prozessen eher eine untergeordnete Rolle spielt.

5.4 Vergleich der biochemischen Werte (ELISA) von uPA und PAI-1 mit RNA-*in situ*-Analysen

Bei der Betrachtung der biochemischen PAI-1-Werte in Abhängigkeit von dem „Grading“, fällt auf, dass die Mediane mit steigendem „Grading“ zunehmen (Grad 1: 21,6, Grad 2: 44,6, Grad 3: 63,5). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte im Kruskal-Wallis Test jedoch nicht nachgewiesen (P-Wert: 0,22).

Für die biochemisch bestimmten uPA-Werte konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Ferno *et al.*, die ebenfalls keine Assoziation zwischen biochemisch bestimmten uPA-Werten und dem Lymphknotenstatus und „Grading“ herstellen konnten. Sie wiesen jedoch einen Zusammenhang von hohen uPA-Werten und Östrogen- und Progesteronrezeptornegativität, hoher p53-Expression und hoher S-Phase Fraktion nach (Ferno *et al.* 1996).

Grondahl-Hansen *et al.* hingegen konnten eine statistisch signifikante Assoziation zwischen den biochemisch bestimmten uPA und PAI-1-Werten (ELISA) und dem „Grading“ (bei prämenopausalen Patientinnen) und dem axillären Lymphknotenstatus (bei postmenopausalen Patientinnen) feststellen (Grondahl-Hansen *et al.* 1993).

Die Maßzahlen und Vergleiche für den Lymphknotenstatus und den uPA und PAI-1-Werten ergaben statistisch keinen nachweisbaren Unterschied (P-Wert für uPA 0,57 und für PAI-1 0,76).

In der Arbeit von Sumiyoshi *et al.* konnte hingegen festgestellt werden, dass biochemische Werte für uPA und PAI-1 in Mammakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen signifikant höher waren als in Fällen ohne Lymphknotenbeteiligung (Sumiyoshi *et al.* 1991).

Bei der vergleichenden Betrachtung der biochemischen uPA und PAI-1-Werte mit den *in situ*-Analysen fällt auf, dass für PAI-1 die Mediane mit steigender Expressionsintensität kontinuierlich zunehmen und für uPA ebenfalls, jedoch ist hier die Zunahme nicht kontinuierlich. Eine statistisch signifikante Assoziation konnte mit den durchgeführten Testverfahren nicht festgestellt werden.

Bei der Verwendung von PAI-1 und uPA als binäres Merkmal entsprechend den Literaturangaben mit einem *cut-off* von 14 für PAI-1 und 3 ng/mg Protein für uPA konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden. Wie bereits erwähnt, ist bei der Interpretation der P-Werte zu bedenken, dass sich aufgrund der relativ kleinen Fallzahl nur sehr deutliche Unterschiede mit ausreichender Macht nachweisen lassen.

Die Tatsache, dass eine gesteigerte uPA/PAI-1-Transkription tendenziell mit erhöhten biochemisch bestimmten Proteinwerten einhergeht, entspricht durchaus den Erwartungen. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich zum einen um den Transkriptionsnachweis der Proteasen *in situ* handelt, der nur semiquantitativ durchgeführt werden kann und zum anderen um eine quantitative Proteinbestimmung (ELISA), die im Cytosol des Tumorgewebes durchgeführt wird. Ein direkter Vergleich dieser unterschiedlichen Methoden ist daher nicht möglich.

6 Zusammenfassung

Das Plasminogenaktivatorsystem spielt eine Schlüsselrolle in der Kaskade der tumorassoziierten Proteolyse, die zur Degradierung der extrazellulären Matrix (EZM) und Stromainvasion führt. Faktoren des Plasminogenaktivierungssystems, welches aus den Serinproteinasen Plasmin, Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) und *tissue-type* Plasminogenaktivator (tPA), den Serpin Inhibitoren Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1 und 2 (PAI-1 und 2) und dem uPA-Rezeptor (uPAR) besteht, wurden mit invasivem Tumorwachstum assoziiert.

Beim Mammakarzinom konnten uPA und PAI-1 als unabhängige prognostische Marker identifiziert werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass PAI-1 und uPA auch in der Gruppe der lymphknotennegativen Mammakarzinome, für die prognostische Marker dringend benötigt werden, unabhängige Prognosefaktoren sind (Duffy *et al.* 1988,1990,1992, 1994; Jänicke *et al.* 1990, 1993; Foekens *et al.* 1992; Spyrtos *et al.* 1992; Grondahl-Hansen *et al.* 1993; Ferno *et al.* 1996).

Die präzise zelluläre Lokalisation der Proteasen uPA, PAI-1 und tPA und vor allem der Ort ihrer Transkription ist weiterhin spekulativ, obwohl einige immunhistochemische und *in situ*-Hybridisierungs-Arbeiten zur Identifikation exprimierender Zellen sowie ihrer Proteine vorliegen.

In dieser Arbeit, bei der es sich um eine explorative Datenanalyse handelt, wurde die mRNA-Expression von uPA, PAI-1 und tPA an verschiedenen Mammaläsionen mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht. Bedingt durch die kleine Fallzahl war im vorhinein klar, dass nur sehr deutliche Zusammenhänge bzw. Häufigkeitsunterschiede nachweisbar sein werden.

In Normalgeweben, Mastopathien und intraduktalen Mammakarzinomen (DCIS) konnten keine uPA mRNA-Expression nachgewiesen werden. Bei den invasiven Karzinomen wurden in 51 von 87 Fällen (59%) positive Hybridisierungssignale für uPA nachgewiesen, die mit schwacher bis moderater Intensität über Stroma- und Tumorzellen lokalisiert wurden. Für die Markierung über den tumornahen Stromazellen, die überwog, konnte ein statistisch auffälliger Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus festgestellt werden (lineare Assoziation P: 0,004).

Für die Protease PAI-1 konnten in einigen Fällen (6 von 11) im Normalgewebe und Mastopathien positive Hybridisierungssignale detektiert werden, die meistens über den

Stromazellen lokalisiert wurden. In den Stromazellen der meisten intraduktalen Karzinome (7 von 10) wurden überwiegend schwache Markierungen für PAI-1 festgestellt.

Invasive Karzinome zeigten in 77 von 87 Fällen (89%) positive Signale, die meistens über den tumornahen Stromazellen lokalisiert waren. Ein statistisch auffälliger Zusammenhang wurde für die stromale PAI-1-Expression und das „Grading“ ermittelt (P: 0,37), wobei höhergradige Tumoren mit stärker markierten Stromazellen einhergingen.

Die tPA-mRNA Expression wurde sowohl in benignen als auch malignen Veränderungen in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen. In benignen Läsionen und DCIS-Fällen waren die Hybridisierungssignale ausschließlich über dem Lappchen- und Gangepithel lokalisiert. In den invasiven Karzinomen waren zusätzlich die Tumorzellen, sowie auch sehr wenige Stromazellen markiert.

Bei dem Vergleich der biochemischen Werte (ELISA) von uPA und PAI-1 mit den RNA-*in situ*-Analysen konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch der Trend, dass die biochemischen Werte für PAI-1 mit zunehmendem „Grading“ steigen. Für beide Proteasen wurden höhere Werte bei dem Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung festgestellt (Anstieg der Mediane).

Stärkere Expressionsintensitäten waren tendenziell mit höheren biochemischen Werten assoziiert.

In situ-Analysen sind wichtig für das Verständnis zelltypabhängiger Expression von Proteasen wie uPA, PAI-1 und tPA und das Erkennen unterschiedlicher Expressionsmuster in verschiedenen Tumoren. Die Nutzung des therapeutischen Potentials zur Tumorbehandlung, welches durch Interaktionen mit dem Plasminogenaktivierungssystem gegeben ist, setzt ein detailliertes Verständnis dieser Prozesse voraus.

Vor dem Hintergrund der zunehmenden präoperativen Mammastanzen bei Mammatumoren sind diese *in situ*-Analysen besonders relevant. Hierbei entsteht ein Gewebsdefekt, der zu einer Entzündungsreaktion mit hohen PAI-1-Werten führt, sodass die biochemische Bestimmung (ELISA) auch fälschlicherweise positive Ergebnisse zeigen kann.

Mit *in situ*-Methoden kann differenziert werden, ob es sich um eine erhöhte Proteasenexpression im Rahmen des malignen Prozesses handelt oder um eine unspezifische Entzündungsreaktion.

Da es sich bei *in situ*-Analysen um semiquantitative Methoden handelt, können sie biochemische (ELISA) Bestimmungen nicht ersetzen, aber sinnvoll ergänzen.

7 Literaturverzeichnis

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ

The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review
Int J Canc 1997; 72(1): 1-22

Athar S

Expression der Matrix-Metalloproteinasen-1,-2 und -3 und ihrer Inhibitoren in gutartigen und bösartigen Erkrankungen der weiblichen Brustdrüse
UKE Hamburg 2000

Azzopardi JG

Problems in breast pathology
Major problems in pathology, Vol 11, WB Saunders Company Ltd., London 1979

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Seidman JG, Smith JA, Struhl K

Currents Protocols in Molecular Biology, Vol 2
Greene Publishing Associates, Inc and John Wiley and Sons, Inc., 1994

Bahnsen J, Warneke B, Frischbier HJ, Stegner HE

Intraductal breast carcinoma. Clinical, x-ray and histological findings and their therapeutic consequences
Geburtshilfe Frauenheilkunde 1985; 45(7): 488-93

Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusening NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A

The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies
Cell Biol 2001; 19. 152(4): 777-84

Bässler R, Bücker W, Hermanek P, Pickartz H, Prechtel K, Schauer A, Schnürch HG, Stegner HE

Die gegenwärtige Situation des Grading beim Mammakarzinom
Der Pathologe 1992; 13: 130-4

Bell WR

The fibrinolysis system in neoplasia
Semin Thromb Hemost 1996; 22(6): 459-78

Bianchi E, Cohen RL, Dai A, Thor AT, Shuman MA, Smith HS

Immunohistochemical localization of the plasminogen activator inhibitor-1 in breast cancer
Int J Cancer 1995; 60: 597-603

Bindahl AK, Hammoud M, Shi WM, Wu SZ, Sawaya R, Rao JS

Prognostic significance of proteolytic enzymes in human brain tumors
J Neurooncol 1994; 22(2): 101-10

Binder BR

Influence of urokinase on cell proliferation and invasion
Blood Coagul Fibrinolysis 1990; 1(6): 717-20

Bloom HJG, Richardson WW

Histological grading and prognosis in breast cancer
Br J Cancer 1957; 11: 359-377

Bolon I, Gouyer V, Devoussoux M, Vandenbunder B, Wernet N, Moro D, Brambilla C, Brambilla E

Expression of c-ets, collagenase 1 and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas
Am J Pathol 1995; 147(5): 1298-310

Böcker, Denk, Heitz

Pathologie, Allgemeine Tumorpathologie
Urban und Schwarzenbergverlag 1997: 178 ff

Brahic M, Haase AT

Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization
Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 6125-6129

Brown TA

Gentechnologie für Einsteiger
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford 1993

Busso N, Masur SK, Lazega D, Waxman S, Ossowski L

Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells
J Cell Biol 1994; 126(1): 259-70

Butzow R, Fukushima D, Twardzik DR, Ruoslahti E

A 60-kD protein mediates the binding of transforming growth factor-beta to cell surface and extracellular matrix proteoglykans
J Cell Biol 1993; 122(3): 721-7

Carriero MV, Franco P, Del Vecchio S, Massa O, Botti G, Stoppelli MP, Salvatore M

Tissue distribution of soluble and receptor-bound urokinase in human breast cancer using a panel of monoclonal antibodies
Cancer Res 1994; 54(20): 6445-54

Chappuis PO, Dieterich B, Sciretta V, Lohse C, Bonnefoi H, Remadi S, Sappino AP

Functional evaluation of plasmin formation in primary breast cancer
J Clin Oncol 2001; 19(10):2731-8

Cho JY, Chung HC, Noh SH, Roh JK, Min SJ, Kim BS

High levels of urokinase-type plasminogen activator is a new prognostic marker in patients with gastric carcinoma
Am Cancer Society 1997; 79(5): 878-83

Choong PF, Ferno M, Akerman M, Willen H, Langstrom E, Gustafson P, Alvegard T, Rydholm A

Urokinase-plasminogen activator levels and prognosis in 69 soft-tissues sarcomas
Int J Cancer 1996; 69(4): 268-72

Christensen L, Wiborg Simonsen AC, Heegaard CW, Moestrup SK, Andersen JA, Andreassen PA

Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator, type-1 plasminogen activator inhibitor, urokinase receptor and alpha-macroglobulin receptor in human breast carcinomas

Int. J Cancer 1996; 16,66(4): 441-52

Costantini V, Sodoni A, Deveglio R, Cazzato OA, Bellezza G, Ferri I, Bucciarelli E, Nenci GG

Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression: an immunohistochemical comparison of normal, benign and malignant breast tissue

Cancer 1996; 15, 77(6): 1079-88

Costantini V, Zacharaski LR, Memoli VA, Kudryk BJ, Rousseau SM, Stump DC

Occurrence of components of fibrinolysis in situ in neoplastic and nonneoplastic human breast tissue

Cancer Res 1991; 51(1): 354-8

Cullen KJ, Smith HS, Hill S, Rosen N, Lippman ME

Growth factor messenger RNA expression by human breast fibroblasts from benign and malignant lesions

Cancer Res 1991; 51(18): 4978-85

Damjanovich L, Turzo C, Adany R

Factors involved in the plasminogen activation system in human breast tumours

Thromb Haemost 1994; 71(6): 684-91

Delbaldo C, Cunningham M, Vasalli JD, Sappino AP

Plasmin-catalysed proteolysis in colorectal neoplasia

Cancer Res 1995; 55(20):4688-95

Del Vecchio S, Stoppelli MP, Carriero MV, Fonti O, Li PY, Botti G, Cerra M, D Aiuto G, Esposito G, et al.

Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumors by in vitro quantitative autoradiography: comparison with urokinase levels

Cancer Res 1993; 53 (13): 3198-206

De Vries TJ, Quax PH, Denijn M, Verrijp KN, Verheijen JH, Verspaget HW, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN

Plasminogen activators, their inhibitors, and urokinase receptor emerge in late stages of melanocytic tumor progression

Am J Pathol 1994; 144(1): 70-81

Dickson RB, Lippman ME

Growth factors ion breast cancer

Endocr Rev 1995; 16: 559-589

Dublin E, Hanby A, Patel NK, Liebman R, Barnes D

Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma

Am J Pathol 2000; 157(4):

Duffy MJ, O`Grady P

Plasminogen activator and cancer
Eur J Cancer Clin Oncol 1984; 20(5): 577-82

Duffy MD, O`Grady P, Devaney D, Osiorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ

Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas
Cancer 1988; 62: 531-533

Duffy MJ

Plasminogen activators and cancer
Blood Coagul Fibrinolysis 1990; 1(6): 681-7

Duffy MJ, Brouillet JP, Reilly D et.al

Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with biochemical, histological, and clinical findings
Clin Chemistry 1991

Duffy MJ

Cellular oncogenes and suppressor genes as prognostic markers in breast cancer
Clin Biochem 1993; 26(6): 439-47

Duffy MJ, Duggan C, Maguire T, Mulcahy K, Elvin P, McDermott E, Fennelly JJ, Higgins NO

Urokinase Plasminogen Activator as a predictor of aggressive disease in breast cancer
Enzyme Protein; 1996, 49:85-93

Duffy MJ

Proteases as prognostic markers in cancer, Minireview
ClinCancer Res 1996; 2: 613-618

Duffy MJ, Duggan C, Mulcyhy HE, McDemott EW, O`Higgins NJ

Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in breast cancer including patients with axillary node-negative disease
Clin Chem 1998; 44(6 Pt 1): 1177-83

Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, OHiggins N

Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer
Surg Oncol 1999; 71(2): 130-5

Duffy MJ

Biochemical markers in breast cancer: Which ones are clinically useful ?
Clin Biochemistry, 2000

Duggan C, Maguire T, McDemott E, O`Higgins N, Fennelly JJ, Duffy MJ

Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer
Int J Cancer 1995; 29 (5): 597-600

Duggan C, Kennedy S, Kramer MD, Barnes C, Elvin P, McDermott E, OHiggins N, Duffy MJ

Plasminogen activator inhibitor type 2 in breast cancer
Br J Cancer 1997; 76(5): 622-7

Escot C, Zhao Y, Puech C, Rochefort H

Cellular localisation by in situ hybridisation of cathepsin D, stromelysin 3 and urokinase plasminogen activator RNAs in breast cancer
Breast cancer Res Treat 1996; 38(2): 217-26

Ferno M, Bendahl PO, Borg A, Brundell J, Hirschberg L, Olsson H, Killander D

Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay
Eur J Cancer 1996; 32A(5): 793-801

Fisher JL, Field CL, Zhou H, Harris TL, Henderson MA, Choong PFM

Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast cancer and its bone metastases-A comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases
Breast Can Res and Treatment 2000; 61: 1-12

Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Bontenbal M, Jänicke F, Klijn JG

Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients
Cancer Res 1992; 52(21): 6101-5

Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Kramer MD, Jänicke F, Klijn GM

Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer
J Clin Oncol 1994; 12(8): 1648-1658

Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Karma MD, Brünner N, Jänicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmanns SC, van Putten WLJ, Klijn JGM

The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients
Can Res 2000; 60: 636-643

Gandolfo GM, Conti L, Vercillo M

Fibrinolysis components as prognostic markers in breast cancer and colorectal carcinoma
Anticancer Res 1996; 16(4B): 2155-9

Ganesh S, Sier CFM, Griffioen G, Vloedgraven HJM, de Boer A, Welvaart K, van de Velde CJH, van Krieken HJM, Verheijen JH, Lamers CBHW, Verspaget HW

Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer
Cancer Research 1994; 54: 4056-4071

Ganesh S, Sier CFM, Heerding MM, Griffioen G, Welvaart K, van de Velde CJH, Verheijen JH, Lamers CBHW, Verspaget HW

Contribution of plasminogen activators and their inhibitors to the survival prognosis of patients with Dukes stage B and C colorectal cancer
British Journal of Cancer 1997; 75(12): 1793-1801

Grondahl-Hansen J, Ralfkiaer E, Kirkeby LT, Kristensen P, Lund LR, Dano K

Localization of urokinase-type plasminogen activator in stromal cells in adenocarcinomas of the colon in humans
Am J Pathol 1991; 138(1): 111-7

Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M

High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis
Cancer Res 1993; 53(11): 2513-21

Gohring UJ, Scharl A, Thelen U, Ahr A, Titius BR

Prognostic value of immunohistochemical determination of urokinase plasminogen activator in primary breast cancer
Pathologie 1995; 16(6): 398-403

Gohring UJ, Scharl A, Thelen U, Ahr A, Crombach G

Comparative prognostic value of cathepsin D and urokinase plasminogen activator, detected by immunohistochemistry in primary breast carcinoma
Anticancer Res 1996; 16(2): 1011-8

Garbett EA, Reed MER, Stephenson TJ, Brown NJ

Proteolysis in human breast cancer
J Clin Pathol 2000; 53: 99-106

Goretzki L, Schmitt M, Mann K, Calvete J, Chucholowski N, Kramer M, Gunzler WA, Jänicke F, Graeff H

Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L
FEBS Lett 1992; 297(1-2): 112-8

Graeff H, Jänicke F, Schmitt M

Clinical and prognostic significance of tumor-associated proteases in gynecologic oncology
Geburtshilfe Frauenheilkunde 1991; 51(2): 90-9

Hamburger Krebsgesellschaft e.V.

Leitlinien für das duktales Carcinoma in situ (DCIS)
Arbeitskreis für klinische Onkologie in der Gynäkologie in Hamburg und Schleswig-Holstein 1998

Hasui Y, Marutsuka K, Suzimiya J, Kitada S, Osada Y, Sumiyoshi A

The content of urokinase-type plasminogen activator antigen as a prognostic factor in urinary bladder cancer
Int J Cancer 1992; 50(6):871-3

Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Henselmann B, Kuhn W, Jänicke F, Höfler H, Graeff H, Schmitt M

Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer
Anticancer Research 1998; 18: 2187-2198

Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Kates R, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt M

Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up
Br J Cancer 1999

Harbeck N., Alt U, Berger U, Krüger A, Thomssen C, Jänicke F, Höfler H, Kates RE, Schmitt M

Prognostic impact of proteolytic factors (uPA, PAI-1, Cathepsin B,D,L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy
Clin Cancer Res 2001;7: 2757-2764

Heiss MM, Allgayer H

Molekulares Staging von Karzinomen
Deutsches Ärzteblatt Aug. 2002; 33: C1760-62,

Hofmann R, Lehmer A, Buresch M, Hartung R, Ulm K

Clinical relevance of urokinase plasminogen activator, its receptor and its inhibitor in patients with renal cell carcinoma
Cancer 1996; 78(3): 487-92

Holland DW, Boucher LD, Mortimer JE

Tubular breast cancer experience at Washington University: a review of the literature
Clin Breast Cancer 2001; 2(3):210-4

Ishida T, Sugio K, Yokoyama K, Teteishi M, Oka T, Nishino T, Sugimachi K

Immunohistochemical evidences of prognostic parameters associated with tumor development of pulmonary adenocarcinoma
Nippon Geka Gakkai Zasshi 1991 ;92(9) : 1107-10

Jahkola T, Toivonen T, von Smitten K, Virtanen I, Wasenius V-M, Blomqvist C

Cathepsin D, urokinase plasminogenactivator and type 1-plasminogenactivator inhibitor in early breast cancer: an immunohistochemical study of prognostic value and relations to tenascin-C and other factors
British J Cancer 1999; 80: 167-174

Yamashita J, Inada K, Yamashita S, Nakashima Y, Matsuo S, Ogawa M

Tissue-type plasminogen activator is involved in skeletal metastasis from human breast cancer
Int J Clin Lab Res 1992; 21(3): 227-30

Jankun J, Merrick HW, Goldblatt PJ

Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancer
J Cell Biochem 1993; 53(2): 135-44

Jänicke F, Schmitt M, Hafter R, Hollrieder A, Babic R, Ulm K, Gössner W, Graeff H

Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer
Fibrinolysis 1990; 4: 69-78

Jänicke F, Schmitt M, Graeff H

Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and their type 1 inhibitor in breast cancer
Semin Thromb Hemost 1991; 17(3): 303-12

Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H

Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer
Breast Cancer Res Treat 1993; 24(3): 195-208

Jänicke F, Thomssen C, Pache L, Schmitt M, Graeff H

Urokinase (uPA) and PAI-1 as selection criteria for adjuvant chemotherapy in axillary node-negative breast cancer patients
Elsevier Science B.V. 1994: 207-18

Jänicke F, Pache L, Schmitt M, Ulm K, Thomssen C, Prechtel A, Graeff H

Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type-1
Cancer Research 1994; 54: 2527-30

Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M, The german NO study group

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
Natl Cancer Inst 2001; 93(12): 913-20

Kennedy S, Duffy MJ, Duggan C, Barnes C, Rafferty R, Kramer MD

Semi-quantitation of urokinase plasminogen activator and its receptor in breast carcinomas by immunocytochemistry
Br J Cancer 1998; 77(10): 1638-41

Knoop A, Andreasen PA, Hansen S, Laenkholm AV, Simonsen ACW, Andersen J, Overgaard J, Rose C

Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and activator inhibitor-1 in primary breast cancer
British J Cancer 1998; 77(6): 932-940

Kobayashi H, Fujishiro S, Terao T

Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 on prognosis in cervical cancer of the uterus
Cancer Res 1994; 54(24): 6539-48

Kuhn W, Pache L, Schmalfeldt B, Dettmar P, Schmitt M, Jänicke F, Graeff H

Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy
Gynecol Oncol 1994; 55(3 Pt1): 401-9

Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ

In situ-Hybridisierung
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford 1994

Liao DJ, Dickson RB

c-myc in breast cancer
Endor Relat Cancer 2000; 7(3): 143-64

Liotta LA, Rao CN, Barsky SH

Tumor invasion and the extracellular matrix
Lab invest 1983; 49

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG

Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation
Cancer Res 1991; 51(18): 5054-5059

Look MP et al.

Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients
Natl Cancer Inst 2002; 94(2): 116-28

Maguire TM, Shering SG, Duggan CM, Mc Dermott EW, O Higin NJ, Duffy MJ

High levels of cathepsin B predict poor outcome in patients with breast cancer.
Int. J Biology Markers Jul.-Sept. 1998

Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK

Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA und tPA
Am J Pathol 1993; 143(3): 949-58

Martius G, Breckwoldt M, Pfeleiderer A

Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe
2. verbesserte Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1996

Mc Laughlin SK, Margolskee RF

35 P is preferable to 35 S for labeling probes used in *in situ* hybridization
Biotechniques 1993; 15: 506-511

Meuret G

Mammakarzinom
2. Auflage 1995; Thieme Verlag

Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O`Donoghue DP, Sheahan K

Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes B colorectal cancer
Lancet 1994; 344(8922): 583-4

Naitoh H, Eguchi Y, Ueyama H, Kodama M, Hattori T

Localization of urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1,2 and plasminogen in colon cancer
Jpn J Cancer Res 1995; 86(1): 48-56

Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, vogelsang H, Becker K, Roder JD, Fink U, Siewert JR

Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer
Cancer Res 1994; 54(11): 2900-7

Nicholson RI, McClelland RA, Gee JMW, Manning DL, Cannon P, robertson JFR, Ellis IO, Blamey RW

Transforming growth factor- α and endocrine sensitivity in breast cancer
Cancer Res 1994; 54: 1684-1689

Nielsen BS, Sehested M, Duun S, Rank F, Timshel S, Rygaard J, Johnsen M, Dano K
Urokinase plasminogen activator is localised in stromal cells in ductal breast cancer
Lab Invest 2001; 81(11): 1485-501

Nielsen BS, Sehested M, Timshel S, Pyke C, Dano K
Messenger RNA for urokinase plasminogen activator is expressed in myofibroblasts adjacent to cancer cells in human breast cancer
Lab invest 1996; 74: 168

Pauli BU, Schwartz DE, Thonar EJ, Küttner KE
Tumor invasion and host extracellular matrix
Cancer Metastasis Rev 1983; 2(2): 129-52

Pauli BU, Knudson W
Tumor invasion: A consequence of destructive and compositional matrix alterations
Hum Pathol 1988; 19: 628-639

Pedersen AN, Christensen J, Stephens RW, Briand P, Mouridsen HT, Dano K, Brügger N
The complex between urokinase and its type-1 inhibitor in primary breast cancer: relation to survival
Cancer Res 2000; 60: 6927-6934

Pertschuk LP, Tobin EH, Gaetjens E, Carter AC, Degenshein GA, Bloom ND, Brigati DJ
Histochemical assay of estrogen and progesterone receptor in breast cancer: correlation with biochemical assays and patients response to endocrine therapies
Cancer 1980; 46(12 Suppl): 2896-901

Prechtl A, Harbeck N, Thomssen C, Meisner C, Braun M, Untch M, Wieland M, Lisboa B, Cufur T, Graeff H, Selbmann K, Schmitt M, Jänicke F
Tumor-biological factors and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node-negative breast-cancer
Int J Biol Markers 2000; 15(1): 73-8

Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grondahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Dano K
Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas
Am J Path 1991; 138(5): 1059-1067

Pyke C, Graem N, Ralfkiaer E, Ronne E, Homer-Hansen G, Brunner N, Dano K
Receptor for urokinase is present in tumour-associated macrophages in ductal breast carcinoma
Cancer Res 1993; 53(8): 1911-5

Reilly D, Christensen L, Duch M, Nolan N, Duffy MJ, Andreasen PA
Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast cancer
Int J Cancer 1992; 50(2): 208-14

Rella C, Coviello M, Paradiso A
Tissue-type plasminogen activator as marker of functional steroid receptors in human breast cancer
Thromb Res 1993; 69(2): 209-20

Reith A, Rucklidge GJ

Invasion of brain tissue by primary glioma: evidence for the involvement of urokinase-type plasminogen activator as an activator of type IV collagenase
Biochem Biophys Res Commun 1992; 186(1): 348-54

Riethdorf L, Riethdorf S, Petersen S, Bauer M, Herbst H, Jänicke F, Löning T

Urokinase gene expression indicates early invasive growth in squamous cell lesions of the uterine cervix
J Pathol 1999; 189(2): 245-50

Rubin E, Farber JL

Pathology: Carcinoma of the breast
3rd Edition, 1999; Lippincott-Raven Publishers

Ruppert C, Ehrenfort S, Scharrer I, Halberstadt E

Protease levels in breast, ovary, and other gynecological tissues: prognostic importance in breast cancer
Cancer Detect Prev 1997; 21(5): 452-9

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T

Molecular cloning, Vol 1
Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989

Samuel SK, Hurta RAR, Kondaiah P, Khalil N, Turley EA, Wright JA, Greenberg AH

Autocrine induction of tumor protease production and invasion by a metallothionein-regulated TGF-Beta-1
EMBO J 1992; 11: 1599-1605

Sappino AP, Skalli O, Jachson B, Schurch W, Gabbiani G

Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissue
Int J Cancer 1988; 41(5): 707-12

Sato T, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y

Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer
Cancer Res 1991; 51(21): 5794-9

Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, Seiki M

Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells
Oncogene 1992; 7(1): 77-83

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G, Wallwiener

Gynäkologische Onkologie, Mammakarzinome
6. Auflage; Schattauer Verlag, Stuttgart-New York ca. 1998: 105 ff

Schmitt M, Jänicke F, Moniwa N, Chucholowski N, Pache L, Graeff H

Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance
Biol Chem Hoppe Seyler 1992; 373(7): 611-22

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F and Graeff H

Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis
Thrombosis and Hemostasis, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1997

Schmitt M, Thomssen C, Ulm K, Seiderer A, Harbeck N, Höfler H, Jänicke F, Graeff H

Time-varying prognostic impact of tumour biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer
British Journal of Cancer 1997; 76(3): 306-11

Seshadri R, Leong ASY, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ

Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast cancer prognosis
Int J Cancer (Pred Oncol) 1996; 69: 135-141

Sloane JP, Mayers MM

Carcinoma and atypical hyperplasia in radial scars and complex sclerosing lesions: importance of lesion size and patient age
Histopathology 1993; 23: 225-231

Spyratos F, Martin PM, Hacene K, Romain S, Andrieu C, Ferrero-Pous M, Deytieux S, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Brunet M

Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer
J Natl Cancer Inst 1992; 84(16): 1266-72

Stegner, H.E.

Histopathologie der Mammatumoren
1986; Enke Verlag Stuttgart

Stegner HE, Jonat W, Maas H

Immunhistochemischer Nachweis nukleärer Östrogenrezeptoren mit monoklonalem Antikörpern in verschiedenen Typen des Mammakarzinoms
Pathologie 1986; 7: 156-163

Sumiyoshi K, Baba S, Sakaguchi S, Urano T, Takada Y, Takada A

Increase in levels of plasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast cancer: possible roles in tumor progression and metastasis
Thromb Res 1991; 63(1): 59-71

Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL

Cathepsin D and prognosis in breast cancer
N Engl J Med 1990; 322(5): 297-302

Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Bernard p

Prognostic significance of stromelysin 3, gelatinase A, and urokinase expression in breast cancer
Cancer research society inc. 1998

Tetu B, Brisson J, Wang CS, Lapointe H, Beadry G, Blanchette C

Expression of cathepsin D, stromelysin-3 and urokinase by reactive stromal cells on breast carcinoma prognosis
Am Cancer Society 2001; 2957

Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA

Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer
Int J Cancer 2002; 98(1): 14-8

Travers MT, Barrett-Lee PJ, Berger U, Luqmani YA, Gazet JC, Powles TJ, Coombes RC

Growth factor expression in normal, benign and malignant breast tissue
Br Med J (Clin Res Ed) 1988; 296(6637): 1621-4

Umeda T, Eguchi Y, Okino k, Kodama M, Hattori T

Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors, and their mRNAs in breast cancer tissues
J Pathology 1997; 183

van der Burg MEL, Henzen-Logmans SC, Berns EMJJ, van Putten LJ, Klijn JGM, Foekens JA

Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in benign, malignant primary and metastatic ovarian tumors
Int J Cancer 1996; 69: 475-479

Visscher DW, Sarkar FH, Sakr W, Crissman J

Immunohistologic analysis of invasive phenotype in breast carcinoma. A clinicopathologic study.
Pathol Res Pract 1993; 189(8): 867-72

Visscher DW, DeMattia F, Ottosen S, Sarkar FH, Crissman JD

Biologic and clinical significance of basic fibroblast growth factor immunostaining in breast carcinoma.
Mod Pathol 1995; 8(6): 665-70

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J

Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma
N Engl J Med 1991; 324(1): 1-8

WHO

International Histological Classification of Tumors
No.2 Geneva: World Health Organization, 1981

Yamashita J, Inada K, Yamashita S, Nakashima Y, Matsuo S, Ogawa M

Tissue-type plasminogen activator is involved in skeletal metastasis from human breast cancer
Int J Clin Lab Res 1992; 21(3): 227-30

8 Anhang

8.1 Untersuchungsgut

Tab. 8.1: Aufstellung des gesamten Untersuchungsmaterials nach Diagnosen, Fallnummern und Patientenalter

<i>Fall-Nr.</i>	<i>Alter</i>	<i>Diagnose</i>	<i>Fall-Nr.</i>	<i>Alter</i>	<i>Diagnose</i>
1	64 J.	Normalgewebe	31	38 J.	Lobuläres Karzinom G 2
2	38 J.	Normalgewebe	32	44 J.	Lobuläres Karzinom G 2
3	54 J.	Normalgewebe	33	32 J.	Lobuläres Karzinom G 2
4	28 J.	Radiäre Narbe	34	39 J.	Lobuläres Karzinom G 2
5	44 J.	Einfache Mastopathie	35	84 J.	Lobuläres Karzinom G 2
6	39 J.	Einfache Mastopathie	36	60 J.	Lobuläres Karzinom G 2
7	68 J.	Einfache Mastopathie	37	66 J.	Tubuläres Karzinom G 1
8	60 J.	Einfache Mastopathie	38	78 J.	Tubuläres Karzinom G 2
9	k.A.	Einfache Mastopathie	39	85 J.	Muzinöses Karzinom G 2
10	51 J.	DH	40	58 J.	Muzinöses Karzinom G 2
11	63 J.	Papillom	41	52 J.	Muzinöses Karzinom G 3
12	50 J.	DCIS Typ 1	42	53 J.	Muzinöses Karzinom G 3
13	76 J.	DCIS Typ 1	43	53 J.	Medulläres Karzinom G 3
14	55 J.	DCIS Typ 1	44	64 J.	Duktales Karzinom G 1
15	64 J.	DCIS Typ 1	45	78 J.	Duktales Karzinom G 1
16	53 J.	DCIS Typ 2	46	62 J.	Duktales Karzinom G 1
17	43 J.	DCIS Typ 2	47	37 J.	Duktales Karzinom G 1
18	61 J.	DCIS Typ 3	48	49 J.	Duktales Karzinom G 2
19	42 J.	DCIS Typ 3	49	68 j.	Duktales Karzinom G 2
20	51 J.	DCIS Typ 3	50	46 J.	Duktales Karzinom G 2
21	51 J.	DCIS Typ 3	51	76 J.	Duktales Karzinom G 2
22	62 J.	Lobuläres Karzinom G 1	52	56 J.	Duktales Karzinom G 2
23	50 J.	Lobuläres Karzinom G 1	53	65 J.	Duktales Karzinom G 2
24	54 J.	Lobuläres Karzinom G 1	54	73 J.	Duktales Karzinom G 2
25	42 J.	Lobuläres Karzinom G 2	55	54 J.	Duktales Karzinom G 2
26	76 J.	Lobuläres Karzinom G 2	56	71 J.	Duktales Karzinom G 2
27	42 J.	Lobuläres Karzinom G 2	57	53 J.	Duktales Karzinom G 2
28	76 J.	Lobuläres Karzinom G 2	58	49 J.	Duktales Karzinom G 2
29	45 J.	Lobuläres Karzinom G 2	59	51 J.	Duktales Karzinom G 2
30	72 J.	Lobuläres Karzinom G 2	60	66 J.	Duktales Karzinom G 2

Tab. 8.1: Aufstellung des gesamten Untersuchungsmaterials (Fortsetzung)

<i>Fall-Nr.</i>	<i>Alter</i>	<i>Diagnose</i>	<i>Fall-Nr.</i>	<i>Alter</i>	<i>Diagnose</i>
61	49 J.	Duktales Karzinom G 2	85	61 J.	Duktales Karzinom G 3
62	76 J.	Duktales Karzinom G 2	86	66 J.	Duktales Karzinom G 3
63	53 J.	Duktales Karzinom G 2	87	58 J.	Duktales Karzinom G 3
64	49 J.	Duktales Karzinom G 2	88	72 J.	Duktales Karzinom G 3
65	56 J.	Duktales Karzinom G 2	89	54 J.	Duktales Karzinom G 3
66	69 J.	Duktales Karzinom G 2	90	61 J.	Duktales Karzinom G 3
67	50 J.	Duktales Karzinom G 2	91	39 J.	Duktales Karzinom G 3
68	45 J.	Duktales Karzinom G 2	92	48 J.	Duktales Karzinom G 3
69	42 J.	Duktales Karzinom G 2	93	71 J.	Duktales Karzinom G 3
70	46 J.	Duktales Karzinom G 2	94	81 J.	Duktales Karzinom G 3
71	51 J.	Duktales Karzinom G 2	95	60 J.	Duktales Karzinom G 3
72	60 J.	Duktales Karzinom G 2	96	34 J.	Duktales Karzinom G 3
73	68 J.	Duktales Karzinom G 2	97	43 J.	Duktales Karzinom G 3
74	59 J.	Duktales Karzinom G 2	98	41 J.	Duktales Karzinom G 3
75	51 J.	Duktales Karzinom G 2	99	68 J.	Duktales Karzinom G 3
76	74 J.	Duktales Karzinom G 2	100	47 J.	Duktales Karzinom G 3
77	k. A.	Duktales Karzinom G 3	101	72 J.	Duktales Karzinom G 3
78	56 J.	Duktales Karzinom G 3	102	57 J.	Duktales Karzinom G 3
79	51 J.	Duktales Karzinom G 3	103	68 J.	Duktales Karzinom G 3
80	45 J.	Duktales Karzinom G 3	104	71 J.	Duktales Karzinom G 3
81	59 J.	Duktales Karzinom G 3	105	54 J.	Duktales Karzinom G 3
82	35 J.	Duktales Karzinom G 3	106	72 J.	Duktales Karzinom G 3
83	72 J.	Duktales Karzinom G 3	107	41 J.	Duktales Karzinom G 3
84	62 J.	Duktales Karzinom G 3	108	29 J.	Duktales Karzinom G 3

[k.A.]: Keine Angabe verfügbar

8.2 Reagenzien, Lösungen und Verbrauchsstoffe

8.2.1 Chemikalien und Chemikaliengemische

Aceton

(p.a.; Merck, Darmstadt, BRD)

2% APES (v/v, in Aceton)

(aus: 3-Aminopropyl-triethoxysilan zur Synthese; Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, BRD)

CaCl₂ (Calciumchlorid)

(getrocknet, gekörnt; Merck)

Entellan

(Merck)

Eosin

(Merck)

Hämatoxylin

(Papanicolaou p. a.; Merck)

Phenol/ Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v)

Für 1 ml : 500 µl Phenol (Ultra Pure; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)
 480 µl Chloroform (p.a.; Merck)
 20 µl Isoamylalkohol (p.a.; Merck)

Xylol

(reinst; Riedel-de Haen, Seelze, BRD)

8.2.2 Enzyme, Enzypuffer und Marker

DNase

DNase I (Rnase-free, 10 U/µl, 1000 U;
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)

Restriktionsendonukleasen

EcoRI

HindIII (10 U/µl, 5000 U; Boehringer Mannheim)

RNA-Polymerasen

T7-RNA- Polymerase

Sp6-RNA-Polymerase (20 U/µl,1000 U; Boehringer Mannheim)

RNase

RNase A (from bovine pancreas; Boehringer Mannheim)

RNasin

Ribonuclease Inhibitor (20-40 U/µl,40 000 U; Promega, Madison, WI,
USA)

Restriktionsenzypuffer

Puffer B, Puffer H (SuRE/Cut Buffer for Restriction Enzymes, 10x conc.,
Boehringer Mannheim)

Transkriptionenzypuffer

Transcription buffer (10 x conc., Boehringer Mannheim, wird mit der
entsprechenden Polymerase mitgeliefert)

DNA-Marker

DNA Molecular Weight Marker V, VI und VII (Boehringer Mannheim)

8.2.3 Alkohole

Ethanol absolut

(p.a.; Merck, für Linearisierung und Transkription bzw. mit
Ethylmethylketon vergällt (DAB 9), für Prä-und Posthybridisierung)

90,70 und 30% Ethanol (v/v)

in DEPC-H₂O (Prähybridisierung, Transkription) in 0,3 M Ammonium -
acetat pH 7,5 (Posthybridisierung)

96 und 80% Ethanol (v/v)

(mit Ethylmethylketon vergällt, für HE-Färbung)

8.2.4 RNase-freie Lösungen, die autoklaviert werden

Die nachfolgenden Lösungen werden in Aqua dest. angesetzt, mit 0,1%(v/v) DEPC (s.u.) versetzt und autoklaviert.

7,5 M Ammoniumacetat pH 7,5

Für 500 ml: 289,1 Ammoniumacetat (p.a., Merck) ad 500 ml in Aqua dest. lösen,
pH 7,5 mit Eisessig einstellen, autoklavieren und pH-Wert kontrollieren

DEPC-H₂O (0,1% DEPC in Aqua dest.)

Für 1 l: 1ml DEPC (Diethyl pyrocarbonate, research grade; Boehringer Ingelheim
Bioproducts Partnerchip, Heidelberg) zu 1l Aqua dest. hinzufügen,
gut schütteln, bzw. auf dem Magnetrührer mischen, mindestens eine
Stunde einwirken lassen, dann autoklavieren.

0,5 M EDTA pH 8,0

(aus :Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
= Titriplex p.a.; Merck)

Erst löslich bei pH 8,0, pH-Einstellung am besten mit NaOH-Plätzchen,
um Volumenüberschreitungen zu vermeiden. Auf dem Magnetrührer
bei 80°C rühren, dabei NaOH-Tabletten hinzufügen, bis die Lösung
vollständig aufklart. Für 10x TES (s.u.) ist auch eine nicht autoklavierte
Lösung ausreichend.

1M Glycin pH 7,4 (in 1x PBS, s.u.)

(aus: für die Molekularbiologie; Merck)

5 M NaCl (Natriumchlorid)

(aus: p.a.; Merck)

3 M Natriumacetat pH 6,0

Für 100 ml: 24,61 g Natriumacetat (wasserfrei, für die Molekularbiologie; Merck) ad.
100 ml in Aqua dest. lösen; pH 6,0 mit Eisessig einstellen, 0,1 ml DEPC
hinzufügen, autoklavieren.

1 M Natriumphosphat pH 6,8

besteht ca. 1:1 (v/v) aus 1 M NaH₂PO₄ und 1 M Na₂HPO₄
(jeweils in Aqua dest. angesetzt).

Zum Beispiel: Ca. 200 ml 1M NaH₂PO₄ (Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat p.a.;
Merck; für 500 ml: 69,0 g) und ca. 150 ml 1 M Na₂HPO₄ (Di-Natrium-
hydrogenphosphat-Dihydrat p.a.; Merck; für 500 ml: 89,0g) mischen,
dabei den pH-Wert kontrollieren. 0,1% DEPC hinzufügen, autoklavieren.

10 x PBS (Phosphate-buffered saline) pH 7,2

1,3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30mM NaH₂PO₄

8.2.5 RNase-freie Lösungen, die nicht autoklaviert werden**100 x Denhardt-Lösung (in DEPC-H₂O)**

2% (w/v) Ficoll 400 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, BRD)
 2% (w/v) PVP (für die Molekularbiologie; Merck)
 2% (w/v) BSA Fraktion V (Sigma-Aldrich)

50% Dextransulfat (w/v, in DEPC-H₂O)

Für 50 ml: 25 g Dextransulfat (Dextran sulfat Sodium salt from Leuconostoc ssp. for molecular biology; Neu-Ulm, BRD) in zunächst 25 ml DEPC-H₂O lösen, im 80°C-Wasserbad erwärmen, dabei häufig schütteln oder vortexen. Erneut 25 ml DEPC-H₂O hinzufügen und mischen. In 10 ml-Portionen bei -20°C lagern.

0,1 M DTT (Dithiothreitol) pH 6,0 (in 0,5 mM EDTA)

(aus: Dithiothreitol 99%; Sigma-Aldrich)
 In 1ml-Aliquots bei -20°C lagern

0,2 N HCl (Salzsäure, in DEPC-H₂O)

(aus: 1 N Salzsäure, p.a.; Merck)

Hefe-tRNA (y (yeast) -tRNA; 50 mg/ml, in DEPC-H₂O)

(aus: tRNA from brewer's yeast; Boehringer Mannheim)
 In 20 µl-Aliquots bei -20°C lagern.

Hybridisierungsgemisch

Hybridisierungslösung und Sondengemisch stehen im fertigen Hybridisierungsgemisch in einem Volumenverhältnis von 4:1 zueinander, so daß gilt:

50% Formamid, 10% Dextransulfat, 1x Salze, 1x Denhardt-Lösung,
 10 mM DTT, 1mg/ml y-tRNA, 200 000 cpm [³⁵S]-markierte Sonde/27 µl

Zum Beispiel: (für 15 OT, bei einem Transkript mit 1x 10⁶ cpm/µl)

erforderliche Hybridisierungslösung: 324µl

erforderliche Menge Sondengemisch: 81µl (bestehend aus:

40,5 µl Formamid (s.u.); 8,1 µl 100 mM DTT; 3 µl Transkript
 (200 000 cpm/ 100 000 cpm x 10); 29,4 µl DEPC-H₂O)

Hybridisierungslösung

50% Formamid (for molecular biology; Fluka BioChemika)
 12,5% Dextransulfat
 1,25 x Salze
 10 mM DTT
 1,25 mg/ ml y-tRNA in 1 ml-Aliquots bei -20°C lagern.

Hydrolysepuffer (in DEPC-H₂O)

80 mM Na₂CO₃ (s.u.)
 120 mM Na₂CO₃ pH 10,2 (s.u.)
 10 mM DTT in 500 µl-Aliquots bei -20°C lagern

Lösung für feuchte Kammer (50 % Formamid, in DEPC-H₂O)**1 M Na₂CO₃ pH 10,2 (Natriumcarbonat, in DEPC-H₂O)**

(aus: Natriumcarbonat wasserfrei p.a.; Merck)
 pH 10,2 mit NaHCO₃ einstellen. In 1 ml-Aliquots bei -20°C lagern.

1 M NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat, in DEPC-H₂O)

(aus: Natriumhydrogencarbonat p.a.; Merck)

In 1 ml-Aliquots bei -20°C lagern.

10 mM 3NTP-Gemisch (je 10 mM in DEPC-H₂O)Für 100 µl: 10 µl ATP, 10 µl CTP, 10 µl GTP(Ultrapure NTP Set, Nucleoside 5'-Triphosphate, 100 mM Solution; Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD), ad 100 µl mit DEPC-H₂O; in 10 µl-Aliquots bei -20°C lagern.**4 % (w/v) Paraformaldehyd pH 7,0 (in 1 x PBS)**

(aus: reinst; Merck)

Die Lösung muss auf dem Magnetrührer bei 70-80°C 3-4h rühren, bis sie vollständig klar ist. Der pH- Wert wird nach dem Abkühlen eingestellt.

In 1 x PBS (aus 10 x PBS, mit DEPC-H₂O verdünnt) lösen.

Paraformaldehyd sollte stets frisch angesetzt werden und ist nur begrenzt haltbar (lichtgeschützt bei 4°C ca. 14 Tage).

Pronase (125 mg/ml, in DEPC-H₂O)(aus: *Protease Type XIV: Bacterial from Streptomyces griseus*; Sigma-Aldrich)

Zur Entfernung kontaminierender Enzyme 4h bei 37°C im Wasserbad verdauen. In 200-, 300-, und 500-µl-Aliquots bei -20°C lagern.

Für 200 ml Verdaulösung (siehe Versuchsvorschrift) mit einer Endkonzentration von 0,625 mg/ml wird 1 ml der so angesetzten Pronase benötigt.

10 x Salze

3 M NaCl

0,1 M Tris-HCl pH 7,5 (s.u.)

0,1 M Natriumphosphat pH 6,8

50 mM EDTA pH 8

1 x Denhardt-Lösung (aus 100 Denhardt-Lösung, unmittelbar vor Gebrauch zufügen)

Sondengemisch

50% Formamid

10 mM DTT

ca. 200 000 cpm [³⁵ S]-UTP-markiertes Transkript/Schnitt**Stoppuffer (in DEPC-H₂O)**

0,2 M Natriumacetat pH 6,0

1% Essigsäure (aus: Eisessig p.a.; Merck)

10 mM DTT

In 500-µl-Aliquots bei -20°C lagern.

0,1 M Triethanolamin pH 8,0 (in 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid)

(aus: Triethanolamin-Base p.a.; Merck)

Vor Erreichen des Endvolumens pH-Wert mit 1 N HCl einstellen.

Unmittelbar vor Gebrauch der Lösung 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid (p.a.; Merck) hinzufügen, für eine 500ml Lösung 1,25 ml

Essigsäureanhydrid.

1 M Tris-HCl pH 7,5 (in DEPC- H₂O)

(aus: Tris-hydroxymethyl-aminomethan p.a., Puffersubstanz Trometamol; Merck)

Den pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure einstellen. Für 10 x TES (s.u.) muss Tris-HCl nicht RNase-frei sein und kann in diesem Fall mit Aqua dest. angesetzt werden.

8.2.6 Lösungen, die nicht RNase-frei sein müssen**1% Agarose (w/v, in 1x TAE) aus 50x TAE, s.u.)**

Für 50 ml: 0,5 g Agarose (NuSieve 3:1; Biozym Diagnostik GmbH, Hess, Oldendorf, BRD) 1,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml Stammlösung; Serva Feinbiochemika, Heidelberg, BRD), ad 50 ml mit 1 x TAE.

0,3 M Ammoniumacetat pH 7,5 (in Aqua dest.)

(aus: 7,5 M Ammoniumacetat pH 7,5)

PCR-Lastpuffer

Für 10 ml: 5 ml Glycerin (86%; Merck)
20 µl 0,5 M EDTA pH 8,0
40 mg Bromphenolblau (Sigma-Aldrich)
40 mg Xylenecyanol (Sigma-Aldrich) ad 10 ml Aqua dest. mischen

Post-Hybridisierungs-Waschlösung (in Aqua dest.)

50% Formamid (aus p.a.; Merck)
1 x Salze (inkl. Denhardt –Lösung)
10 mM DTT

RNase A (10 mg/ml, in DEPC-H₂O)

Für 10 ml: 100 mg RNase A in DEPC-H₂O ad 10 ml lösen. Zwei min. im 100°C Wasserbad kochen, um kontaminierende Enzyme (z.B. DNase) zu entfernen. In 1-ml-Aliquots bei -20°C lagern. Für 200 ml Verdauungslösung mit einer Endkonzentration von 20 µg/l werden 400 µl der so angesetzten RNase benötigt.

20 x SSC (Sodium chloride/sodium citrate buffer) pH 7,0 (in Aqua dest.)

3 M NaCl
0,3 M Na₃-Citrat 2H₂O (aus: p.a.; Merck), pH-Wert kontrollieren.

50 x TAE (Tris-acetate/ EDTA electrophoresis buffer, in Aqua dest.)

2 M Tris (aus: Tris-Base)
0,1 M EDTA
5,71 % Essigsäure (aus Eisessig)

9x TES (Tris/EDTA/sodium chloride buffer) pH 7,5 (in Aqua dest.)

0,1 M Tris-HCl pH 7,5
10 ml EDTA pH 8,0
5 M NaCl, den pH-Wert kontrollieren.

8.2.7 Radioisotop

[³⁵S]-UTP

(Uridin 5`-(1-Thio) Triphosphat, Isotop [³⁵S],

spezifische Aktivität : ca. 50 TBq (1350 Ci)/mmol
Konzentration: ca. 460 MBq (12,4mCi)/ml
(New England Nuclear-Du pont, Dreieich, BRD)

8.2.8 Photochemikalien

50% Entwickler-Lösung (v/v, in Aqua dest.)

(aus: Kodak Dektol Developer, zusammen mit Kodak Fixierer, erhältlich als Kodak EDP/EDF Photochemicals; Integra Biosciences GmbH, Fernwald, BRD), Stammlösung nach Herstellerangaben zuzubereiten.

1% Essigsäure (v/v, in aqua dest.)

(aus: Eisessig)

25% Fixierer-Lösung

(aus: Kodak Fixer), Stammlösung nach Herstellerangaben zuzubereiten.

Photoemulsion (in 0,3 M Ammoniumacetat pH 7,5)

Für 20 ml: 10 ml Photoemulsion (Kodak Autoradiography Emulsion NTB-2, Integra Biosciences) 10 ml 0,6 M Ammoniumacetat pH 7,5
(=0,8 ml 7,5 M Ammoniumacetat pH 7,5 + 9,2 ml Aqua dest.)
in völliger Dunkelheit bei 43°C anzusetzen!

8.3 Biochemische Werte uPA und PAI-1 (ELISA)

Tab. 8.2: Biochemische Werte von uPA und PAI-1(ELISA) in ng/mg Protein

Fall Nr.	uPA	PAI-1	Fall Nr.	uPA	PAI-1
13	5,20	13,50	69	6,94	143,25
22	0,50	4,00	70	4,20	62,97
23	1,00	2,60	71	4,57	33,10
24	1,67	18,40	72	5,15	345,15
26	2,96	103,61	73	1,25	79,83
27	4,41	37,73	74	3,66	79,83
28	2,58	11,58	75	1,68	44,26
29	1,85	11,86	76	1,05	35,13
30	1,61	44,60	77	1,02	63,45
33	0,80	3,40	78	10,40	24,90
34	0,70	4,20	79		135,23
35	0,60	12,50	80	2,14	405,09
37	5,69	155,27	81	2,46	98,17
38	6,20	65,70	82	6,97	167,58
39	2,59	70,51	83	9,70	453,75
40	2,33	154,04	84	1,58	17,15
41	2,69	18,89	85	10,04	278,12
42	3,55	146,19	86	4,80	46,20
43	6,43	107,52	89	8,60	7,70
44	6,84	42,66	90	11,09	79,50
45	2,30	41,51	91	0,90	3,50
46	8,90	21,60	92	13,40	67,10
47	6,63	214,04	93	8,40	82,80
48	1,40	2,90	94	0,29	41,43
49	3,39	50,20	95	2,03	76,48
50	2,56	79,68	96	3,24	117,5
51	3,82	368,29	97	1,49	33,29
52	2,06	47,68	98	2,93	18,63
53	4,22	39,38	99	2,29	11,59
55	3,16	51,45	100	0,92	55,45
56	10,70	11,90	101	14,92	132,92
60	2,90	17,70	102	2,89	67,34
61	1,56	38,97	103	0,93	30,62
62	1,91	12,77	104	8,70	48,03
63	9,30	36,70	105	1,85	50,22
64	12,30	21,80	106	1,26	20,95
67	2,67	63,45	107	6,71	75,44
68	6,66	89,36			

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning möchte ich für das Bereitstellen des Themas und für seine ständige Gesprächsbereitschaft besonders danken.

Herrn PD Dr. med. Lutz Riethdorf und Frau Dr. rer. Nat. Sabine Riethdorf bin ich sehr dankbar für die freundliche und ausgezeichnete Betreuung.

Bei Herrn Prof. Berger möchte ich mich für die kompetente Beratung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. H. Herbst danke ich für das Überlassen der Plasmide und das Bereitstellen der Versuchsvorschrift.

Bei Frau S. Petersen und den Mitarbeitern der Abteilung für Gynäkopathologie möchte ich mich für die gute und nette Zusammenarbeit bedanken.

Des weiteren gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, Helga und Thomas Grazianski und meinem Ehemann Reza Masoumi, die mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Nina Masoumi-Grazianski

Persönliche Daten:

Geburtsdatum, -ort	15.12.1973, Berlin
Eltern	Helga Grazianski, geb. Ahlers, Thomas Grazianski
Familienstand	verheiratet, Ehemann Reza Masoumi
Wohnort	Gutenbergstrasse 37, 3011 Bern, Schweiz

Schulbildung:

1980-1984	Grundschule Hamburg
1984-1993	Gymnasium Harksheider Strasse, Hamburg
Jan.-Aug. 1991	Woodinville High School, Seattle U.S.A.
Juli 1993	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

Okt. 1993-Mai 2000	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
--------------------	---

Approbation:

April 2002

Berufliche Tätigkeit:

Okt. 2000-April 2002	Assistenzärztin (AIP) in der medizinischen Klinik, Kantonales Spital Sursee, Schweiz
Seit Okt. 2002	Assistenzärztin in der Abteilung für Neurologie, Universitätsspital Bern (Inselspital), Schweiz

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln 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, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.