

**Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
und  
Institut für Pathologie des GSF-Forschungszentrums München**  
(Direktor: Univ. Prof. Dr. H. K. Höfler)

**Mammakarzinom:  
Quantifizierung von ausgewählten Genen  
und Untersuchung ihrer klinischen Relevanz**

**Martina Born**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H.K. Höfler

2. Univ. Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 28.12.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.03.2006 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen .....	5
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms .....	7
1.2 Ätiologie .....	7
1.3 Risikofaktoren .....	8
1.4 Klassifikation .....	9
1.4.1 Morphologische Klassifikation .....	9
1.4.2 Histopathologische Klassifikation .....	10
1.5 Genetik des Mammakarzinoms.....	11
1.5.1 Tumorentstehung Allgemein.....	11
1.5.2 Hereditäres Mammakarzinom .....	11
1.5.3 Somatische genetische Veränderungen beim Mammakarzinom.....	12
1.5.4 Chromosom 20q .....	13
1.6 Prognosefaktoren.....	14
1.6.1 Allgemein.....	14
1.6.2 Prognosefaktoren mit klinischer Relevanz .....	14
1.6.3 Neuere / Nicht etablierte Prognosefaktoren .....	16
<b>2 ZIELSETZUNG .....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>19</b>
3.1.1 Gewebe .....	19
3.1.2 Zelllinien .....	19
3.1.3 Primer und Sonden .....	19
3.1.4 FISH-Sonden.....	19
3.1.5 Reagenzien .....	20
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Mikrodissektion.....	23
3.2.2 Zellkultur.....	24
3.2.3 Isolierung und Messung der DNA und RNA.....	25
3.2.4 Testung der Spezifität der Primer und Sonden .....	26
3.2.5 Reverse Transkription.....	27
3.2.6 Quantitative Real-Time PCR .....	27
3.2.6.1 Allgemein.....	27
3.2.6.2 Standardkurven.....	28
3.2.6.3 Durchführung der TaqMan™-PCR .....	31
3.2.7. FISH.....	32
3.2.7.1 Präparation der histologischen Schnitte für die FISH mit der Her2/neu Sonde.....	32
3.2.7.2 Auswertung der FISH mit der Her2/neu Sonde .....	33
3.2.7.3 FISH mit dem PTK6 PAC-Klon.....	33
3.2.7.4 Auswertung der FISH mit dem PTK6 PAC-Klon .....	34
3.2.8 Statistik .....	34
3.2.8.1 Paarweiser t-Test .....	34
3.2.8.2 Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient.....	34
3.2.8.3 Wilcoxon-Test für Stichproben .....	35
3.2.8.4 p-Werte.....	35

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der methodischen Untersuchungen</b>	<b>36</b>
4.1.1	Spezifität der Primer und Sonden	36
4.1.1.1	Primer	36
4.1.1.2	Sonden	37
4.1.2	Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der Methode	38
4.1.2.1	Vergleich von Her2/neu und PTK6 TaqMan™ Werten mit den FISH-Signalfrequenzen von Her2/neu und PTK6	38
4.1.2.2	Vergleichbarkeit der TaqMan™ Methode an tiefgefrorenen bzw. formalinfixierten und paraffinierten Zelllinien	42
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der untersuchten IDC Fälle</b>	<b>45</b>
4.2.1	DNA Ergebnisse	45
4.2.1.1	Morphologisch unauffälliges Mammagewebe: DNA-Werte der acht ausgesuchten Gene	45
4.2.1.2	DNA-Ergebnisse der 53 primären invasiv duktalem Mammakarzinome (IDC)	47
4.2.1.3	Verteilung der erhöhten DNA-TaqMan™-Werte auf die 8 untersuchten Gene	49
4.2.1.4	Verteilung der erhöhten DNA-TaqMan™-Werte auf die einzelnen Fälle	49
4.2.1.5	Korrelation der Gene untereinander	50
4.2.1.5	Korrelation der DNA Ergebnisse mit klinischen/histopathologischen Parametern	50
4.2.1.6	Zusammenfassung der DNA Ergebnisse	51
4.2.2	RNA Ergebnisse	51
4.2.2.1	Morphologisch unauffälliges Mammagewebe: RNA Werte der acht ausgesuchten Gene	51
4.2.2.2	RNA-Ergebnisse der 54 primären invasiv duktalem Mammakarzinome (IDC)	53
4.2.2.3	Verteilung der erhöhten RNA-Taq-Man™ Werte auf die 8 untersuchten Gene	55
4.2.2.4	Verteilung der erhöhten RNA-Taq-Man™ Werte auf die einzelnen Fälle	56
4.2.2.5	Korrelation der Expressionswerte untereinander	56
4.2.2.5	Korrelation der RNA Ergebnisse mit klinischen/histopathologischen Parametern	57
4.2.2.6	Zusammenfassung der RNA Ergebnisse	57
4.2.3	Vergleich DNA / RNA Ergebnisse	58
4.2.3.1	Vergleich aller DNA und RNA Werte	58
4.2.3.2	Statistische Korrelation der DNA und RNA Werte	59
4.2.4	Zusammenhang der Gene PTK6 und Her2/neu	59
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Genstatus- und Expressionsanalyse der ausgewählten Gene</b>	<b>63</b>
5.1.1	Genetische Veränderungen an Chromosom 20q beim Mammakarzinom	63
5.1.2	Genstatus der 8 untersuchten Gene	64
5.1.3	Expression der 8 untersuchten Gene	66
5.1.4	Assoziation PTK6 und Her2/neu	74
<b>5.2</b>	<b>Sensitivität der Real-Time PCR</b>	<b>75</b>
5.2.1	Bestimmung der Genkopienzahl	75
5.2.2	Expressionsbestimmung	77
5.2.3	Problematik der Schwellendefinition	77
5.2.4	Vergleichbarkeit der DNA-TaqMan™ Ergebnisse mit FISH	78
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>80</b>

<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>
<b>8 ANHANG .....</b>	<b>92</b>
<b>8.1 pTNM Klassifikation des Mammakarzinoms .....</b>	<b>92</b>
<b>8.2 Klinische Daten .....</b>	<b>94</b>
<b>8.3 Färbungen .....</b>	<b>95</b>
<b>8.4 Sequenzen der ausgesuchten Primer und Sonden sowie Nachweis der bezogenen 'Arrays on Demand' (ABI) .....</b>	<b>96</b>
<b>8.5 Tabelle der DNA-TaqMan™ Werte mit klinischen/histopathologischen Parametern...</b>	<b>98</b>
<b>8.6 Tabelle der RNA-TaqMan™ Werte mit klinischen/histopathologischen Parametern.</b>	<b>100</b>
<b>9 DANKSAGUNG .....</b>	<b>102</b>
<b>10 LEBENSLAUF .....</b>	<b>103</b>

## *Verzeichnis der Abkürzungen*

ABI	Firma Applied Biosystems (Weiterstadt)
ADA	Adenosin deaminase
AIB1	Amplified in breast cancer 1
Akt	Serin/Threonin Kinase
BCAS1	Breast cancer amplified sequence 1
bp	Basenpaare
CGH	Comparative Genomic Hybridization
Ct-Wert	drückt die Zyklenzahl aus bei der zum ersten Mal ein signifikanter Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über der Grundlinie erfaßt wird (Ct = Threshold Cycle)
DAPI	Diaminobenzidin
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Foetales Kälberserum
FFPE	Formalinfixiert und in Paraffin eingebettet
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HE	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
Her2/neu	Rezeptor-Tyrosin-Kinase aus der Familie der Wachstumsfaktoren
IDC	Invasiv duktales Karzinom
iRNA	interference Ribonukleinsäure
JÜR	Jahres Überlebens Rate
LM	Längenmarker
log	Logarithmus
MAPK	Mitogen-Activatet-Protein-Kinase
MEM	Minimum essential medium

MW	Mittelwert
M	mol/Liter
mM	millimol/Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
PAC-Klon	Ein Vektor zum Klonieren von DNA-Fragmenten (100-300 kb) in Escherichia coli, basierend auf dem Bakteriophagen P1 Genom.
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFDN4	Prefoldin 4
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
P/S	Penicillin-Streptomycin
PTK6	Protein tyrosine kinase 6
PTPN1	Protein tyrosine phosphatase 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Enzym, das die RNA verdaut
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SSC	Standard Sodium Citrat
STD	Standardabweichung
Taq	DNA Polymerase aus dem thermophilen Bakterium Thermus aquaticus (extrem hitzestabil)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-box binding protein
WHO	World Health Organization
ZNF217	Zinkfinger 217

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms**

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau in der Welt mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr. Betrachtet man die altersstandardisierten Inzidenzraten, so sind in den Industriestaaten wesentlich mehr Frauen von Brustkrebs betroffen als in industriell weniger entwickelten Ländern (Sauer H. Mammakarzinom-Manual 2005, S.1). Geschätzt erkranken in Deutschland jährlich über 47.000 Frauen neu an Brustkrebs, wovon etwa 19.000 unter 60 Jahre alt sind. Unter allen Krebsneuerkrankungen im Jahr 2000 in Deutschland (nur Frauen: n = 194.662), steht das Mammakarzinom mit 24,4% neuerkrankter Frauen an oberster Stelle, gefolgt vom Kolon- (17,6%) und Lungenkarzinom (5,4%). Auch bei den Krebssterbefällen der Frauen in Deutschland (n = 100.349) im Jahr 2000 steht das Mammakarzinom mit 17,8% ganz oben. (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland). Betrachtet man die Statistik der häufigsten Diagnosen der weiblichen Patientinnen in Krankenhäusern von 2003 des Statistischen Bundesamtes, liegt das Mammakarzinom nach der Geburt eines Kindes auf Rang zwei. Geschätzt wird, dass etwa jede zehnte Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens mit der Diagnose Brustkrebs konfrontiert wird (Sauer H. Mammakarzinom-Manual 2005, S.2). In der weiblichen Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes von 2004 liegt das Mammakarzinom auf Rang fünf, nach chronisch ischämischer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, akutem Myokardinfarkt und dem Schlaganfall.

### **1.2 Ätiologie**

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist noch weitgehend ungeklärt. Neben äußeren Einflüssen (siehe Risikofaktoren), sind es vererbte (hereditäre) und sporadische (somatische) genetische Veränderungen, die eine Rolle beim Entstehen von Mammakarzinomen spielen. Ein Zusammenspiel unterschiedlicher Risikofaktoren und genetischer Veränderungen ist wahrscheinlich.

### 1.3 Risikofaktoren

Brustkrebs bei Frauen unter 25 Jahren tritt eher selten auf (weniger als 10 Fälle pro 100 000). Die Inzidenz steigt auf das 100-fache ab einem Alter von 45 Jahren (Hulka B.S. et al. 2001). Dies legt den Einfluss der Reproduktionshormone bei der Entstehung von Brustkrebs nahe (Pike M.C. et al. 1993). Zu den Faktoren, die mit einem höheren Risiko an Brustkrebs zu erkranken einhergehen, zählen daher: Frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität und höheres Alter bei der Geburt des ersten Kindes. Desweiteren stellen die Einwirkung von ionisierenden Strahlen und eine gutartige Erkrankung der Brust in der Vorgeschichte ein erhöhtes Risiko dar (Dumitrescu R.G. et al. 2005). Frauen mit familiärer Belastung - in der Familie ist bereits Brustkrebs aufgetreten - tragen ebenso ein erhöhtes Risiko, abhängig vom Verwandtschaftsgrad (H. Sauer Mammakarzinom-Manual 2005, S.12). Hierbei spielen Keimbahnmutationen eine wichtige Rolle. In Betracht kommen vor allem verschiedene Mutationen der Gene BRCA1 und BRCA2 (siehe 1.5.2 S.11). Der sogenannte "lifestyle" scheint auf die Entwicklung von Brustkrebs ebenfalls Einfluss zu nehmen. Adipositas, Bewegungsmangel, fettreiche Ernährung und häufiger Alkoholkonsum gehen mit einem leicht erhöhten Erkrankungsrisiko einher, wohingegen viel Obst und Gemüse in der Ernährung und körperliche Aktivität das Risiko an Brustkrebs zu erkranken leicht senken. Stärkeren Einfluss auf die Senkung des Brustkrebsrisikos haben: Höhere Anzahl an Geburten, frühe erste ausgetragene Schwangerschaft und langes Stillen (Dumitrescu R.G. et al. 2005). Neben diesen Faktoren spielt auch die Geographie eine Rolle. So erkranken Frauen in Nord Amerika und Nord Europa 5- bis 10-mal häufiger an Brustkrebs als Frauen aus dem Fernen Osten, Afrika und Südamerika (Parkin D.M. et al. 1999).

## 1.4 Klassifikation

### 1.4.1 Morphologische Klassifikation

Eingeteilt werden die Mammakarzinome in invasive, das heißt in das umgebende Gewebe zerstörend hineinwachsende Tumore, und nicht invasive Tumore, welche ausschließlich in den Milchgängen und Drüsenläppchen der Brustdrüsen wachsen und die Basalmembran dieser Zellverbände nicht durchbrechen. Mit 65-80% ist das invasiv duktales Karzinom der häufigste Tumortyp der invasiven Karzinome, mit ihm beschäftigt sich diese Arbeit.

Modifizierte **WHO-Klassifikation** der nicht-invasiven und invasiven Mammakarzinome (Sauer H. Mammakarzinom-Manual 2005, S.53):

#### *Nicht-invasive Karzinome*

- intraduktales Karzinom (DCIS)
  - mit Paget-Erkrankung der Brustwarze
- lobuläres Carcinoma in situ (LCIS)

#### *Invasive Karzinome*

- invasives duktales Karzinom
  - mit Paget-Erkrankung der Brustwarze
- invasives duktales Karzinom mit prädom. intraduktales Komponente
- invasives lobuläres Karzinom
- muzinöses Karzinom
- medulläres Karzinom
- invasives papilläres Karzinom
- tubuläres Karzinom
- adenoid-zystisches Karzinom
- sekretorisches (juveniles) Karzinom
- apokrines Karzinom
- Karzinom mit Metaplasie
- K. mit osteoklastenartigen Riesenzellen
- zystisch-hypersekretor. K. mit Invasion
- Karzinom mit endokriner Differenzierung
- glykogenreiches Karzinom
- lipidreiches (lipidbildendes) Karzinom
- invasives kribiformes Karzinom

#### 1.4.2 Histopathologische Klassifikation

Postoperativ werden die Karzinome vom Pathologen in die **pTNM-Klassifikation** eingeteilt (UICC TNM classification of malignant tumours), wobei T den Primärtumor nach Größe und Ausdehnung untergliedert, N sich auf den Lymphknotenstatus bezieht und M Auskunft über Vorhandensein, Lokalisation und Anzahl der Metastasen gibt (Anhang 8.1 S. 92). Desweiteren werden die Tumore in drei histologische Grade eingeteilt (Tabelle 1.1), die sich auf Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate beziehen (Elston CW, Ellis IO; 1991). Wir haben in dieser Arbeit ausschließlich Tumore untersucht, die in den Grad 2 eingestuft wurden.

Merkmale	Kriterien	Scorewerte	
Tubulusausbildung	> 75 %	1	
	10 - 75 %	2	
	< 10	3	
Kernpolymorphie	gering	1	
	mittelgradig	2	
	stark	3	
Mitoserate	0-1/HPF ( 0-10/10 HPF)	1	
	1-2/HPF (11-20/10 HPF)	2	
	> 2/HPF ( 20/10 HPF)	3	
	Summenscore	3 - 9	
Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3, 4 ,5	gering	<b>G1</b>	gut differenziert
6,7	mäßig	<b>G2</b>	mäßig differenziert
8,9	hoch	<b>G3</b>	schlecht differenziert

**Tabelle 1.1:**

Einteilung der Mammakarzinome in die histologischen Grade 1-3 nach Ellston und Ellis (1991).

HPF = high power field (=400-fache Vergrößerung im Mikroskop)

## 1.5 Genetik des Mammakarzinoms

### 1.5.1 Tumorentstehung Allgemein

Im epithelialen Gewebe geht man davon aus, dass sich ein maligner Tumor aus der Umwandlung (= Transformation) einer einzelnen Zelle heraus entwickelt (monoklonale Entwicklungstheorie). Die Transformation findet während der genetischen Abläufe der Zelle statt. Unterschiedliche Einflüsse können dies verursachen, z.B. chemische Verbindungen (Rauchen, Asbest etc.), Ernährung, chronische Infektionen (z.B. Humane Papillom Viren), Strahlen etc.. Folge ist ein abnormes Verhalten der Zelle, welches sich in unkontrolliertem Wachstum, Invasion in das umliegende Gewebe und Herauslösen der Zelle aus ihrem Zellverband äußert. Letzteres führt zur Verteilung entarteter Zellen über die Lymphbahnen und/oder das Blutgefäßsystem in andere Organe (=Metastasierung) (Böcker W., Denk H., Heitz Ph., Pathologie 2001). Diese Mechanismen sind auf molekularer Ebene sehr komplex und noch wenig verstanden.

### 1.5.2 Hereditäres Mammakarzinom

Etwa 5-10% aller Mammakarzinom-Patientinnen weisen eine vererbare Mutation im Genom auf, welche mit einem frühen Krankheitsbeginn und einem gehäuften familiären Auftreten des Karzinoms einhergeht (Claus EB. et al. 1996). Es handelt sich meist um Keimbahnmutationen die bei der Meiose entstehen, sie werden von dem jeweiligen betroffenen Elternteil auf die Kinder vererbt (=hereditär) und finden sich in jeder Körperzelle des Menschen wieder. Aufgrund des Vererbungsmodus ist meist nur ein Allel des Gens betroffen. Tritt nun im zweiten Allel eine zusätzliche sporadische Mutation auf, verliert oder verändert das Gen seine Funktion. Diese "two-hit" Hypothese wurde 1971 von Alfred Knudson bei seinen Untersuchungen zum Retinoblastom formuliert (Knudson AG 1971). Finden diese Mutationen z.B. in den sogenannten **Tumorsuppressorgenen** statt, ist die supprimierende Regulation des Zellwachstums gestört und es kommt zu unkontrollierter Proliferation des Zellklons (Böcker W., Denk H., Heitz Ph., Pathologie 2001). Tumorsuppressorgene, die bei der Entstehung von Mammakarzinomen eine Rolle spielen, sind z.B. die Gene BRCA1, BRCA2, p53, p27 und Skp2, sowie PTEN, ATM und Rb (Osborne C. et al. 2004). Wobei das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom mit 80-90% aller hereditären Mammakarzinome das häufigste darstellt. Die Mutationen liegen hier auf den Genen **BRCA1** (Breast Cancer1, Chromosom 17q21) oder **BRCA2** (Breast Cancer2, 13q12) (de Jong M.M. et al 2002). Die Proteine dieser Gene sind in mehrere essentielle zelluläre Vorgänge involviert, so z.B. in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Moynahan M.E et al. 1999). Mehr als 800 unterschiedliche Mutationen dieser Gene wurden gefunden, darunter "frameshift"- "nonsense"- und "splice site"- Mutationen (Kiechle M. et al. 2000). Das Risiko, bei Vorliegen einer Mutation im BRCA1-Gen am Mammakarzinom zu

erkranken, liegt bei 50-jährigen bei 49-73% und bei 70-jährigen bei 71-87%, vergesellschaftet mit einem Risiko von 20-30% am Ovarialkarziom zu erkranken. Die oben genannten Tumorsuppressorgene spielen nicht nur beim hereditären Mammakarzinom eine Rolle, sondern können auch bei Mammakarzinomen mit sporadisch auftretenden Mutationen eine Rolle spielen (Review Osborne C. et al. 2004).

### 1.5.3 Somatische genetische Veränderungen beim Mammakarzinom

Somatische oder sporadische genetische Veränderungen betreffen nicht alle Körperzellen gleichzeitig, da sie nicht über die Keimbahn vererbt werden. Nur einzelne Zellen sind von Mutationen betroffen. Können diese von der Zelle selbst nicht mehr repariert werden, entwickelt sie sich aufgrund der Veränderung zur Tumorzelle (siehe monoklonale Entwicklungstheorie 1.5.1) (Böcker W., Denk H., Heitz Ph., Pathologie 2001). Neben den oben erwähnten Wachstum hemmenden Tumorsuppressorgenen gibt es sogenannte Protoonkogene, die in mutierter oder aktivierter Form zu dominanten, wachstumsstimulierenden **Onkogenen** werden die Onkoproteine produzieren. Protoonkogene können durch Punktmutationen, chromosomale Translokation, Genamplifikation oder Deregulation der Expression aktiviert werden. Dies bewirkt unkontrolliertes Zellwachstum und deregulierte Differenzierungsprozesse. Nach ihrer Wirkung werden die Onkogene in vier Gruppen eingeteilt:

a) Wachstumsfaktoren, b) Wachstumsfaktorrezeptoren, c) intrazelluläre Signalvermittlung und d) nukleäre Transkriptionsfaktoren. (Böcker W., Denk H., Heitz Ph., Pathologie 2001).

Eines der relevantesten bisher bekannten Onkogene beim Mammakarzinom ist das Her2/neu Gen. Es gehört zu den Wachstumsfaktorrezeptoren und wurde in dieser Arbeit mitbestimmt. Her2/neu wird bei den Prognosefaktoren (siehe 1.6.3 S.16) näher beschrieben. Oncogene die Mammatumore betreffen weisen häufig eine DNA-Amplifikation auf. Bisher wurden mehr als 80 amplifizierte vorliegende Gene beim Mammakarzinom gefunden (Beckmann MW. et al. 1997). **DNA Amplifikation** ist ein wichtiger Faktor bei der Tumorentstehung (Schwab M. 1999). Bei vielen soliden Tumoren sowie auch bei haematologischen Erkrankungen wurden DNA-Veränderungen meist auf mehreren unterschiedlichen Chromosomen festgestellt (Review Zitzelsberger H. et al. 1997; Review Knuutila S. et al. 1998). Beim Mammakarzinom findet sich, neben DNA-Amplifikationen, eine Anhäufung von verschiedenen genetischen Veränderungen, dies unterstützt das Model einer multifaktoriellen Entstehung des Mammakarzinoms (Beckmann MW. 1997). Mit Hilfe der CGH (Comparative Genomic Hybridisation) können amplifizierte Chromosomenregionen und DNA-Verluste detektiert werden. Beim Mammakarzinom fanden Kallioniemi A. et al. (1994) 26 solcher Regionen, Isola J.J. et al. (1995) konnten sogar 55 verschiedene Veränderungen bei 48 Lymphknoten negativen Mammatumoren feststellen, wobei

der Median pro Tumor bei insgesamt sieben unterschiedlichen DNA-Amplifikationen und Verlusten lag (Streubereich 0-16). An den Chromosomen 1q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 17q, 20p und 20q wurden die meisten DNA-Zugewinne mittels CGH beim Mammakarzinom detektiert, wobei das Chromosom 20q in 55% der 38 untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien eine Amplifikation aufwies und damit an dritter Stelle nach den Chromosomen 8q (85%) und 1q (61%) rangiert (Forozan F. et al. 2000). Diese Daten der Zelllinien fanden weitgehende Übereinstimmung im Vergleich mit Daten aus 17 Studien die 698 untersuchte Mammatumore beinhalteten (Forozan F. et al. 2000). Isola J.J. et al. (1995) konnten außerdem feststellen, dass Patientinnen, die innerhalb von fünf Jahren ein Rezidiv entwickelten (n = 25), signifikant mehr genomische Veränderungen aufwiesen als diejenigen, die in den fünf Jahren kein Rezidiv entwickelten (n = 23). Dass DNA-Amplifikation mit einer schlechteren Prognose beim Mammakarzinom einhergeht konnten Tanner M.M. et al (1995) bestätigen. Sie fanden heraus, dass Patientinnen deren Lymphknoten noch nicht befallen waren, die aber eine hohe Amplifikationsrate der Chromosomenregion 20q13 aufwiesen, ein kürzeres rezidivfreies Überleben hatten.

#### 1.5.4 Chromosom 20q

Nicht nur beim Mammakarzinom sondern auch beim Magen-, Kolon-, Ovarial-, Prostata-, Pankreas- und Harnblasenkarzinom sowie beim Osteosarkom konnte eine Amplifikation am langen Arm des **Chromosoms 20** (20q) gefunden werden (Review Knuutila S. et al. 1998; Hodgson JG. et al. 1998). Auch bei Hirntumoren zeigte sich eine Amplifikation dieser Region (Mohapatra G. et al. 1995). Kallioniemi et al. (1994) fanden als erste beim Mammakarzinom eine Amplifikation der Region **20q13**, welche mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patientinnen in Zusammenhang gebracht wird (Tanner M.M. et al. 1995, s.o.). Es wird vermutet, dass sich in dieser amplifizierten Region Onkogene befinden, die sich auf die Entstehung und die aggressivere Fortentwicklung des Mammakarzinoms auswirken (Review Hodgson et al. 2003). Es wurde z.B. in 64% der Mammakarzinome eine Überexpression des Gens **AIB1** gefunden, welche in 10% mit einer, mittels FISH-Technik nachgewiesenen, Amplifikation einherging (Anzick S.L. et al. 1997). Die Region, in der dieses Gen liegt, konnte auf 20q12 eingeschränkt werden (Guan X.Y. et al. 1996). Diese Autoren fanden auch die Gene AIB3 und AIB4 in der Region 20q11 vermehrt amplifiziert. Im Bereich 20q12 bis 20q13.1 liegt die Adenosin deaminase (**ADA**) (Jhanwar S. E. et al 1989). Die meisten Kandidaten, die verantwortlich für die Amplifikation auf 20q sein könnten und eventuell als Onkogene fungieren, liegen auf der hoch amplifizierten Region 20q13; hierunter fallen die Gene **ZNF217**, ZNF218, NABC1(**BCAS1**), PIC1L, und CYP24 (Collins C. et al. 1998). Weitere bis dahin noch unbekannte Gene konnten dieser Region zugeordnet werden, NABC3, NABC4, NABC5 und Prefoldin 4 (**PFDN4**) (Collins

C. et al. 2001). Tanner M.M. et al. (1996) konnten das Gen **PTPN1** 3 Megabasen proximal der Region 20q13.2 lokalisieren und **PTK6** wurde distal dieser Region, auf 20q13.3 gefunden (Park S.H. et al. 1997). Welches dieser Gene, wenn überhaupt, mitverantwortlich für die Amplifikation 20q ist, und welche Konsequenzen sich daraus ergeben, ist noch nicht sicher nachgewiesen worden. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, der Beantwortung dieser Frage ein Stück näher zu kommen und bestehende Hypothesen eventuell zu untermauern. Die von uns untersuchten sieben Gene der Region 20q werden in der Diskussion näher beschrieben (siehe 5.1.3 S.66).

## **1.6 Prognosefaktoren**

### 1.6.1 Allgemein

Die Prognose des Mammakarzinoms hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Prognosefaktoren dienen dazu, den Krankheitsverlauf für jede betroffene Patientin möglichst genau abzuschätzen. Es können diejenigen Prognosefaktoren, die Einzug in den klinischen Alltag gehalten haben und durch Studien belegt sind (etablierte), von den so genannten "neueren", deren Aussagekraft noch nicht gesichert ist (nicht etablierte), unterschieden werden. Von den Prognosefaktoren werden die prädiktiven Faktoren, die den Therapieerfolg und das Therapieansprechen vorhersagen, differenziert. (Sauer H. Mammakarzinom Manual 2005, S.80)

### 1.6.2 Prognosefaktoren mit klinischer Relevanz

#### ⇒ **TNM-Status**

Unter Punkt 1.4.2 wurde die Einteilung der Tumore in die TNM-Klassifikation der WHO beschrieben. Je nach dem in welchem Ausbreitungsstadium sich der Tumor befindet wird er in die TNM-Klassifikation eingeteilt. Die Größe bzw. Ausbreitung des Tumors, die Anzahl der befallenen Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen nimmt Einfluß auf die Prognose der betroffenen Patientin. Nach wie vor ist der axilläre Lymphknotenstatus der wichtigste Prognosefaktor, wobei die Anzahl der befallenen Lymphknoten mit dem Risiko ein Rezidiv zu erleiden und der Überlebensrate direkt korreliert. Weisen Patientinnen einen negativen Lymphknotenstatus bei Diagnosestellung auf, so beträgt ihre 5-Jahres-Überlebensrate (JÜR) 94,8% und die 10-JÜR 86,4%. Sind bei Diagnosestellung schon zehn und mehr Lymphknoten befallen, sinkt die 5-JÜR auf 48,1% und die 10-JÜR auf 27,3%. Desweiteren besteht eine Korrelation zwischen der Größe des Tumors und dem axillären Lymphknotenbefall. Die Tumorgöße ist vor allem bei den Lymphknoten negativen Patientinnen ein wichtiger Prognosefaktor. (Sauer H. Mammakarzinom-Manual 2005, S.7 u. S.80)

#### ⇒ **Morphologie**/Histopathologie

Auch das morphologische Bild nimmt Einfluß auf die Prognose, so gelten das muzinöse, das papilläre, das medulläre und das tubuläre Karzinom mit einer 10 JÜR von ca. 60-65% als prognostisch günstiger (Böcker W., Denk H., Heitz Ph., Pathologie 2001). Volpi A. et al (2004) konnten in ihrer Studie, in der sie Daten von 372 Patientinnen mit Lymphknoten negativen Mammakarzinomen statistisch auswerteten eine Korrelation des **Gradings** (G1-3) mit der Überlebenszeit ohne Fernmetastasen finden. Es korrelierte auch die Gesamtüberlebenszeit mit dem Grad des Tumors, ein Zusammenhang zwischen dem Grading und dem rezidivfreien Überleben konnte statistisch nicht gefunden werden. Allgemein gilt, dass höhere Grade mit einer höherem Rezidivrate und Metastasenrate einhergehen (Böcker W., Denk H., Heitz Ph., Pathologie 2001)

#### ⇒ **Steroidhormonrezeptoren**

Der Steroidhormon-Rezeptorstatus ist vor allem aufgrund seiner prädiktiven Bedeutung ein therapierelevanter Faktor. Seine prognostische Vorhersagekraft nimmt mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit ab und ist stark von der adjuvanten Therapie beeinflusst (Sauer H. Mammakarzinom-Manual 2005, S.80). Etwa 60-70% der Mammakarzinome weisen einen positiven Estrogenrezeptorstatus auf, wobei nur ca. die Hälfte auf eine Hormontherapie anspricht (Walker RA. et al. 1997). Neben dem Estrogenrezeptorstatus hat auch der Progesteronrezeptor therapeutische Relevanz bezüglich der endokrinen Therapie.

Die erwähnten Prognosefaktoren stehen in Übereinstimmung mit den Prognosefaktoren, die laut der 8. Internationalen Konsensuskonferenz über adjuvante Therapie des primären Mammakarzinoms in St. Gallen 2005 bestimmt werden sollen. Ein Alter unter 35 Jahren bei Beginn der Erkrankung wird hier zusätzlich als ungünstiger Prognosefaktor aufgeführt. Als prädiktive Faktoren werden der Hormonrezeptorstatus für das Ansprechen einer endokrinen Therapie, der Her2/neu Status für das Ansprechen der Antikörpertherapie mit Trastuzumab sowie der Menopausenstatus genannt. Anhand der genannten Prognose- und prädiktiven Faktoren wurde auf der Konsensuskonferenz eine neue Einteilung der drei Risikokategorien niedriges, mittleres und hohes Risiko vorgenommen. Anhand dieser Eingruppierung wird die adjuvante Therapie für die betreffende Patientin bestimmt (Janni W. et al. 2005).

### 1.6.3 Neuere / Nicht etablierte Prognosefaktoren

Diese berücksichtigen morphologische, biochemische, zellkinetische und genetische Aspekte, weit über hundert werden in der Literatur diskutiert. Ein Prognosefaktor nützt den Patientinnen und den Ärzten aber nur dann etwas, wenn er eine zuverlässige Vorhersage über den Krankheitsverlauf zulässt und nicht nur unnötig zur Verunsicherung beiträgt (Sauer H. Mammakarzinom-Manual 2005, S.81). Hayes D.F. et al. (1996) stellten deshalb Kriterien zur besseren Beurteilung der neuen Prognosefaktoren auf:

Klinischer Nutzen von Tumormarkern: "Level of evidence (LOE)"

- I Einzelne prospektive Studien mit hoher statistischer Power, die entworfen wurde, um den Nutzen eines spezifischen Markers zu testen (auch mit therapeutischer Implikation) oder Metaanalyse
- II Prospektive Studie mit Tumormarkeranalyse als sekundärem Studienziel
- II Große retrospektive Studien
- IV Kleine retrospektive Studien, "Matched-Pair"-Analysen etc.
- V Kleine Pilotstudien, Korrelationen zu anderen bekannten Faktoren

Als einzigste unter den neueren Prognosefaktoren haben die tumorassoziierten Proteolysefaktoren, Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (**uPA**) und sein Inhibitor **PAI-1** (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) den höchsten Level of Evidence (LOE I) erreicht. Sind diese Faktoren im Primärtumor erhöht, steigt das Metastasierungsrisiko und das Gesamtüberleben der Patientinnen sinkt (Look M.P. et al. 2002). Patientinnen, die noch keine Lymphknotenmetastasen bei Diagnosestellung aufweisen und eine niedrige Konzentration von uPA und PAI-1 im Primärtumor zeigen, haben eine sehr gute Prognose. Es wurde in diesen Fällen schon in Erwägung gezogen, den Patientinnen die adjuvante Chemotherapie zu ersparen (Jänicke F. et al. 2001).

Als prädiktiver Faktor hat der Wachstumsfaktorrezeptor **Her2/neu** in die Klinik Einzug gehalten. Her2/neu ist in ca. 30% der Mammakarzinome amplifiziert bzw. überexprimiert (Slamon D.J. et al. 1987 u. 1989) und geht mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf (Slamon D.J. et al. 1987, Press M.F. et al. 1997), mit einer Herunterregulierung des Hormonrezeptorstatus (Konecny G. et al. 2003) und in frühen Tumorstadien mit einer Resistenz gegenüber einer Tamoxifen-Therapie einher (Carlomagno C. et al. 1996). Die prognostische Relevanz einer Her2/neu-Überexpression ist allerdings noch nicht endgültig geklärt, obwohl in den letzten 15 Jahren über 200 Berichte über das Gen Her2/neu bei Mammakarzinomen veröffentlicht wurden

(Yamauchi H. et al. 2001). Es wurde ein humanisierter monoklonaler Antikörper (Trastuzumab = Herceptin®) gegen den Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu entwickelt, der zur Zeit in klinischen Studien eingesetzt wird. Hierbei hat sich gezeigt, dass das Rezidivrisiko bei Patientinnen mit Her2/neu positivem und metastasiertem Mammakarzinom nahezu halbiert werden konnte. Dabei wurde Trastuzumab ein Jahr lang im Anschluß an eine Chemotherapie den ausgewählten Patientinnen verabreicht (Janni W. et al 2005). Ob dieser Effekt auch bei metastasenfremen Patientinnen zu finden ist, wird derzeit in weiteren Studien (z.B. HERA) untersucht.

Weitere neuere Prognosefaktoren wie zum Beispiel Kathepsine und Matrixmetalloproteinasen, die ebenfalls zu den tumorassoziierten Proteolysefaktoren gehören, sowie zellkinetische Parameter wie S-Phase, Ploidie, Ki-67, MIB1, PCNA werden momentan noch erforscht und sind ebenfalls noch nicht in der klinischen Diagnostik und Therapie ausserhalb von Studien einsetzbar. Dies gilt auch für die potenziellen prädiktiven Marker wie Topoisomerase II alpha, EGFR, VEGF TIMP-3 und YB-1. (Sauer H. Mammakarzinom-Manual 2005, S.83).

## 2 ZIELSETZUNG

Bei unterschiedlichen Tumorentitäten wurde mit Hilfe der CGH eine Vervielfachung der DNA auf dem langen Arm des Chromosoms 20 (20q) gefunden (Review Knuutila S. et al. 1998). Eine Amplifikation an dieser Stelle wurde zuerst von Kallioniemi et al. 1994 für das Mammakarzinom beschrieben, weitere folgten (Review Hodgson et al 2003, Forozan F. et al. 2000). Ausserdem wurde herausgefunden, dass die Amplifikation der Region 20q13 mit einem aggressiveren Tumorverhalten einhergeht (Tanner M.M. et al. 1995, Isola J.J. et al. 1995). Seit diesen Veröffentlichungen wird nach den Genen gesucht, die verantwortlich für die Amplifikation an 20q sind und eventuell den schlechteren prognostischen Verlauf der Erkrankung mitverursachen. Unterschiedliche Gene werden als Kandidaten diskutiert (Hodgson JG. et al 2003).

Zielsetzung dieser Arbeit ist es,

- ▶ die von uns ausgesuchten acht Gene (PTPN1, AIB1, ZNF217, ADA, PTK6, BCAS1, PFDN4, Her2/neu), wovon sieben als potentielle 20q-Kandidatengene diskutiert werden, auf genomischer und auf Expressionsebene an 54 invasiv duktalem Mammakarzinomen mit der Real-Time PCR zu quantifizieren,
- ▶ die Gene statistisch auf Korrelation untereinander zu untersuchen und
- ▶ statistisch den Zusammenhang der Genamplifikation und Genüberexpression mit den klinischen und histopathologischen Parametern zu vergleichen.

Das Gen Her2/neu (Chromosom 17q) wurde, aufgrund seiner therapeutischen Relevanz mitbestimmt, um den Zusammenhang des schon bekannten Wachstumsfaktorrezeptors mit Genen der Region 20q abzuklären.

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Gewebe**

Es wurden 54 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete invasiv-duktales Mammakarzinome (IDC) aus dem Archiv des Pathologischen Institutes des Klinikums rechts der Isar, Universitätsklinik der Technischen Universität München, verwendet. Alle IDC sind Grad 2 (G2) Tumore, das heißt, die Tumorzellen sind mäßig differenziert. Berücksichtigt wird bei der Differenzierung die Kernpolymorphie, die Mitoserate und die Tubulusausbildung (siehe Tabelle 1.1 S.10). Die klinischen und histopathologischen Parameter der hier untersuchten 54 IDC sind im Anhang 8.2 (S.94) zu finden.

#### **3.1.2 Zelllinien**

Methodische Untersuchungen wurden an den permanenten Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und MCF7 durchgeführt, die Laborbestand des Instituts für Pathologie der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) in Neuherberg (München) sind.

#### **3.1.3 Primer und Sonden**

*DNA:*

Die passenden Sequenzen für die genomische Untersuchung wurden mit der PrimerExpress Software von ABI (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgesucht (siehe Anhang 8.4 S.96). Die Primer wurden mit dem Oligonukleotid Synthesizer Typ 395 (ABI) in der GSF hergestellt, die fluoreszenzmarkierten Sonden bei Thermo Hybaid in Ulm bestellt.

*RNA:*

Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden für die Expressionsanalyse wurden als „Assay on demand“ von ABI bezogen, nur für die Gene PFDN4 und TBP (TATA-box binding protein) wurden die Primer und die zugehörige Sonde, wie oben unter *DNA* beschrieben, ausgesucht und hergestellt bzw. erworben. (siehe Anhang 8.4 S.97)

#### **3.1.4 FISH-Sonden**

Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurde die Her2/neu Sonde der Firma Vysis verwendet (Vysis, Inc., Downers Grove, Illinois), sowie ein PAC-(P1 derived artificial chromosome) Klon (RP4-697K14) ([www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)), der die DNA Sequenz des PTK6-Gens abdeckt.

### **3.1.5 Reagenzien**

#### **Färbungen der histologischen Schnitte**

- Hämatoxilin-Färbung nach Mayer
- Hämatoxilin-Eosin-Färbung
- Schnell-Hämalaun-Färbung

Rezepte siehe Anhang 8.3 (S.95)

#### **Zellkultur**

MCF7: - MEM (Minimum essential medium) + Earle's Salze (Invitrogen, Karlsruhe)

- 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren (Invitrogen, Karlsruhe)
- 10% FCS (foetales Kälberserum) Gold, standardisiert (PAA, Linz, Österreich)
- Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)

BT474: - RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe)

- 10% FCS (foetales Kälberserum) Gold, standardisiert
- 10µg/ml Humaninsulin (Sigma-Aldrich, München)
- Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)

#### **Formalinfixierung und Paraffineinbettung der Zelllinien**

Trypsin/EDTA (1x) Lösung 0,05% (Invitrogen, Karlsruhe)

Plasma (human) (Sigma-Aldrich, München)

Thrombin (Rind) (Sigma-Aldrich, München)

Formalin (Sigma-Aldrich, München)

#### **Isolierung der DNA**

QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

QIAamp DNA Mikro Kit (Qiagen, Hilden)

## **Isolierung der RNA**

5 x SDS-Lysepuffer: 50 mM Tris pH 8,0 (Sigma-Aldrich, München)  
0,5 mM EDTA pH 8,0 (Invitrogen, Karlsruhe)  
10 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) (Invitrogen, Karlsruhe)

Phenolextraktion 3M Natriumacetat pH 4,0 (Merck, Darmstadt)  
Phenol pH 4,0 (Invitrogen, Karlsruhe)  
Chloroform (Merck, Darmstadt)

Präzipitation Glycogen (Roche, Mannheim),  
Isopropanol, (Merck, Darmstadt)  
70% Ethanol (Merck, Darmstadt)

## **Reverse Transkription**

Random Primer (Roche, Mannheim)  
Superscript-Kit™ (Invitrogen, Karlsruhe)  
dNTPs 10mM (Amersham, Freiburg)  
RNaseOUT (=RNase Inhibitor) (Invitrogen, Karlsruhe)

## **Gelelektrophorese**

SeaKem® LE Agarose (FMC BioProducts, USA)  
1xTBE Puffer (=Tris-Borat-EDTA: 100ml EDTA 0,5M pH 8, 270g Trisbase, 137,5g Borsäure auf 5000ml A. dest. = 5xTBE Verdünnen zu 1xTBE)  
Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser) (Merck, Darmstadt)  
Längenmarker Nr. V (Roche, Mannheim)  
Längenmarker 50bp (Invitrogen, Karlsruhe)

## **Real-Time-PCR**

TaqMan™ Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, Weiterstadt)  
Ampuwa® (Fresenius Kabi, Bad Homburg)

## **Sequenzierung**

MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)  
Big Dye™ Terminator (Applied Biosystems, Weiterstadt)  
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, München)  
3M Natriumacetat (Merck, Darmstadt), Formamide (Sigma-Aldrich, München)

## **FISH**

### **A) Her2/neu – Sonde:**

Citratpuffer: 18 ml Lsg. A + 82 ml Lsg. B ad 1000 ml Aqua dest., pH 6,0

Lsg. A: 0,1 M Zitronensäure (Merck, Darmstadt) (= 21,01g  $C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$  in 1000ml A.dest.)

Lsg. B: 0,1 M Natriumcitrat (Merck, Darmstadt) (= 19,41g  $C_6H_5O_7 \cdot xH_2O$  in 1000ml A.dest.)

Pronase E (aus *Streptomyces griseus*) (Merck, Darmstadt)

0,05% (50 mg Pronase in 100 ml 1x PBS)

Sörensenpuffer:

61,2ml  $Na_2HPO_4$  (Lsg. B) mit  $KH_2PO_4$  (Lsg. A) auf 100ml auffüllen (entspr. pH 7,0)

Lsg. A: 9,08g Kalium-di-hydrogenphosphat in 1000ml A. dest. (66,7mM)

Lsg. B: 11,88g di-Natrium-hydrogenphosphat Dihydrat in 1000ml A. dest. (66,7mM)

Paraformaldehyd 4% (4g PFA in 100 ml Sörensenpuffer pH 7,0)

50% Formamid/2xSSC: 50 ml Formamid + 10 ml 20x SSC + 40 ml A. dest

70% Formamid/2xSSC: 70 ml Formamid + 10 ml 20xSSC + 20 ml A. dest., pH 7,5

Nonidet P40 (NP 40) (jetzt Igepal Ca-630 von Sigma I8896)

DAPI-Stammlösung (Sigma-Aldrich, München): 1mg/1ml bidest

DAPI-Gebrauchslösung: 15µl Stammlösung auf 100ml 2xSSC

### **B) PTK6 PAC- Klon:**

LB Medium (Amersham, Freiburg)

Kanamycin (Invitrogen, Karlsruhe)

Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden)

Metaphasen Chromosomen (Vysis, Inc., downers Grove, Illinois)

Biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim)

50% FA: 50ml Formamide + 10ml 20xSSC ad 100ml)

PN-Puffer: Natriumphosphatpuffer mit Detergenz 0,1% Nonidet P40 (NP40)

(Merck, Darmstadt)

PNM: PN-Puffer mit 5% Milchpuver und 0,02% Natriumacetat

Cy2-Konjugiertes Steptavidin und anti-Streptavidin

(Amersham Buchler, Braunschweig)

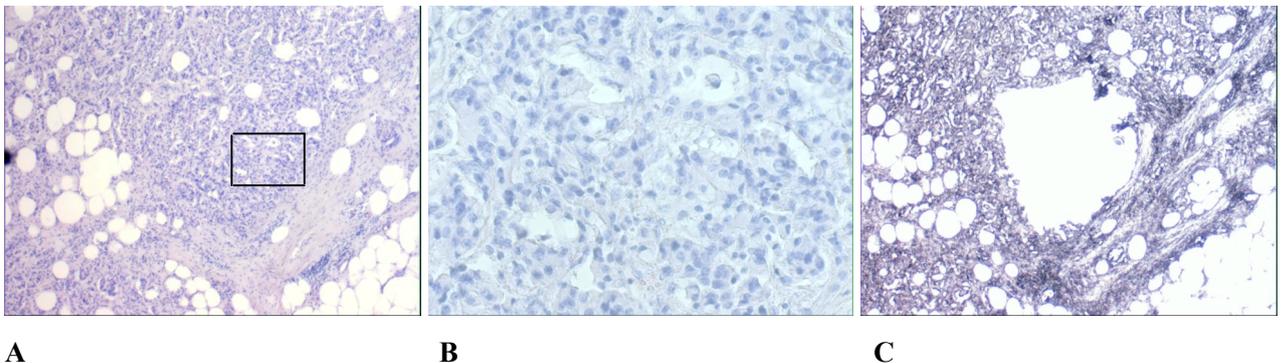
## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mikrodissektion

*DNA:*

Die aus dem Archiv ausgesuchten relevanten Gewebeblöcke wurden vor Beginn der Arbeit von einer Pathologin auf ihre Eignung geprüft. Danach wurden mit dem Mikrotom (Microm/HM 355S; MICROM International, Walldorf) 5 µm dünne Schnitte angefertigt und auf unbeschichtete Objektträger aufgezo-gen. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung und Färbung (Hämatoxilin nach Mayer Anhang 8.3 S.95) zur Vorbereitung für die Mikrodissektion. Zusätzlich wurde zur besseren Orientierung am Anfang, in der Mitte und am Ende der Schnittserie ein Schnitt Hämatoxilin-Eosin gefärbt (Abb. 3.1 A u. B).

Unter dem Stereomikroskop "Stemi" 2000 (Zeiss, Jena) wurden die Schnitte - zur besseren Beurteilung - mit 70 %igem Alkohol angefeuchtet und die Tumoreale mit sterilen Kanülen in sterile Eppendorfgefäße überführt (Abb. 3.1 C). Es wurde darauf geachtet, dass nur Areale dissektiert wurden die einen Tumorzellanteil von mind. 70-80% aufwiesen. Bei zu hohem Stromaanteil wurde dieser mit dem Lasermikroskop (Laser-MicroBeam System P.A.L.M., Wolfratshausen) vor der Tumorzellentnahme mit dem Laser entfernt.



**Abbildung 3.1:**

Histologischer Schnitt vor und nach der Mikrodissektion

**A:** HE gefärbter Schnitt mit geeignetem Tumoreal

**B:** Ausschnitt aus Abb. A, Tumorzellen bei höherer Auflösung

**C:** Schnitt nach Zellentnahme

Bilder wurden mit dem Axiovert 100M der Firma Zeiss (Jena) aufgenommen.

*RNA:*

Es wurden wie für die DNA Untersuchung 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf unbeschichtete Glasobjektträger aufgezogen, entparaffiniert (2x20 Min Xylol, je 1x5 Min 100%-90%-70%-50% Ethanol, 1x5 Min DEPC-Wasser) und anschließend für die Mikrodisektion mit der Schnell-Hämalaun-Färbung gefärbt (Anhang 8.3. S. 95). Um die Möglichkeit einer Kontamination mit RNasen beim Arbeiten mit RNA gering zu halten, wurden häufig die Handschuhe gewechselt, die Arbeitsflächen mit RNase ZAP (Ambion, Huntingdon, GB) behandelt, Glasgeräte vor Gebrauch drei bis vier Stunden im Brutschrank bei 180° C gebacken, RNase-freie Lösungen und Einwegmaterialien benutzt oder die Lösungen und Geräte mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) (Sigma-Aldrich, München) behandelt. Es wurden nicht autoklavierte Eppendorfgeläße und gestopfte Pipettenspitzen verwendet und auf zügiges Arbeiten geachtet, um die RNA nicht länger als nötig bei Raumtemperatur zu belassen.

### **3.2.2 Zellkultur**

Für die MCF7 Zelllinie wurde ein Nähransatz mit 500ml Minimum essential medium (MEM) inklusive Earle's Salzen, 50ml foetales Kälberserum (FCS), 5ml nicht essentielle Aminosäuren und 2,5ml Penicillin-Streptomycin hergestellt. Die Zellen wurden in den Zellkulturflaschen bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> und 94-95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Für die Zelllinie BT474 wurde ein Nähransatz aus 500ml RPMI 1640 Medium, 50ml FCS, 2,5 ml Penicillin-Streptomycin und 10µg/ml Humaninsulin hergestellt und die Zellen ebenso wie die MCF7 Zellen kultiviert.

Die Zellen wurden anschließend zum Ablösen mit 1ml Trypsin behandelt und danach im Kulturmedium suspendiert. Die Zellpellets wurden zweimal mit 1xPBS gespült. Ein Teil wurde in einem Guanidiniumthiocyanat basierten Lysepuffer aufgenommen und kurzfristig bei -70°C tiefgefroren, um die RNA-Extraktion später durchzuführen. Die Extraktion wurde nach einer Standardmethode, die auf einer Phenolextraktion und anschließender Präzipitation mit Natriumacetat und Ethanol bei pH 4,0 basiert, durchgeführt (Chromczynski P. et al. 1987). Der zweite Teil der Zellen wurde entsprechend des Volumens des Zellpellets mit 1 Volumen Plasma und 1 Volumen Thrombin (500 U/ml) gemischt. Nach ca. 1-2 Minuten bildete sich ein Fibrinnetz aus, welches den Zusammenhalt der Zellen bewirkte. Der Zellverbund wurde in eine Einbettkapsel gegeben, über Nacht in Formalin fixiert und nach einer standardisierten Dehydrierung in Paraffin eingebettet (TISSUE-TEK<sup>®</sup> VIP; CRYOCONSOLE). Wie unter Punkt 3.2.1 (S.23) beschrieben wurden histologische Schnitte angefertigt, entparaffiniert und die Zellen zur DNA Isolierung entnommen.

### 3.2.3 Isolierung und Messung der DNA und RNA

#### *DNA:*

Die gewonnenen Zellen (aus Tumormaterial und Zelllinien) wurden über Nacht mit 10µl Proteinase K (20mg/ml) und 15µl Puffer des QIAamp DNA Micro Kits bei 56°C verdaut. Die Reinigung der DNA erfolgte laut Handbuch des QIAamp DNA Micro Kits. Die gereinigte DNA wurde anschließend photometrisch gemessen und die Konzentration nach der folgenden Formel berechnet:

$$c = OD260 \times 2,5$$

(c:Konzentration; OD260: optische Dichte bei 260nm, Faktor 2,5 errechnet sich aus der Verdünnung und dem Absorptionsspektrum der DNA).

#### *RNA:*

Die mikrodisektierten Zellen wurden in 200µl 1xSDS-Lysepuffer gegeben, mit 10µl Proteinase K (50mg/ml) versetzt und über Nacht bei 60° C verdaut. Nach dem Proteinaseverdau wurde Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurden 2µl 3M Natriumacetat pH 4,0, 200µl Phenol pH 4,0 und 100µl Chloroform zugegeben, gut durchmischt und anschließend 6 Min. bei 12000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Der wässrige Überstand mit der RNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Präzipitation wurden 2µl Glycogen und 220µl Isopropanol zugegeben, das Gemisch mindestens 2 Stunden bei -20°C belassen, anschließend die ausgefallene RNA 30 Min. bei 4°C abzentrifugiert (12000 U/min) und der Überstand abpipettiert. Das im Eppendorfgefäß verbliebene Pellet wurde mit 180µl 70% Ethanol gewaschen und der Überstand nach erneutem Abzentrifugieren (4°C, 12000 U/min) von 10 Min wiederum abpipettiert. Das Pellet wurde nach Lufttrocknung und Resuspendierung in Ampuwa (Menge je nach Zellmenge, z.B. bei 2000 bis 4000 Zellen, 20µl Ampuwa zur Resuspendierung) bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C aufbewahrt. Wegen der geringen RNA Menge wurde die Konzentration nicht photometrisch bestimmt, sondern basierend auf Erfahrungswerten anhand der Anzahl der mikrodisektierten Zellen (1cm<sup>2</sup> mikrodisektiertes Tumorareal entspricht ca. 50 000 Tumorzellen) abgeschätzt und entsprechend in die PCR (ca. 1200 Zellen pro PCR-Reaktionsmix von 20µl) eingesetzt.

### 3.2.4 Testung der Spezifität der Primer und Sonden

*DNA:*

#### Gelelektrophorese

Die synthetisierten Primer wurden mit Ampuwa® so verdünnt, dass eine Konzentration von 3µM vorlag, die entsprechenden Sonden wurden auf eine Konzentration von 2µM verdünnt. Als Standard-DNA wurde DNA aus morphologisch unauffälligem, humanem Kolongewebe isoliert und auf 12,5ng/µl verdünnt. Damit wurde zur Testung der Primer und Sonden eine quantitative Real Time PCR durchgeführt. Für jede Reaktion wurde ein Gesamtvolumen von 30µl in eine 96-Loch-Platte eingesetzt, welches sich aus 15µl Universal PCR Master Mix, je 3µl Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, 3µl Sonde, 4µl (100ng) der Standard-DNA und 2µl Ampuwa® zusammensetzte. Die Amplifikate wurden anschließend auf ein 2,5%iges Agarosegel aufgetragen (siehe Ergebnisse 4.1.1.1 S.36)

#### Sequenzierung

Für jedes der selbst entworfenen Primerpaare wurden jeweils ca. 100ng des PCR-Produkts mit dem MinElute PCR Purification Kit gereinigt und anschließend mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach der Methode von Frederick Sanger (Sanger et al. 1977, Sterky S. et al. 2000) sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion enthielt 2µl BigDye™ Terminator, 0,3µl DMSO, 4,7µl Ampuwa®, ca. 0,1 µg (gelöst in 4µl Ampuwa®) des gereinigten DNA-Fragments und 1µl (10 pmol) des Vorwärts- oder des Rückwärts-Primers. Anschließend wurde zur Reinigung des PCR-Produkts eine Lösung aus 3ml Natriumacetat, 18ml Ampuwa® und 90ml 100%igem Ethanol hergestellt und das PCR-Produkt in 100µl dieser Lösung gegeben, gut gemischt und 30 Min. abzentrifugiert (4700 U/min). Danach wurde der Überstand abpipettiert und das Produkt nochmals mit 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum 15 Min. zentrifugiert (4700 U/min). Das luftgetrocknete Pellett wurde in 1,5µl Formamide gelöst und auf das 4,8%ige Sequenzierungsgel aufgetragen.

*RNA:*

Die Primer und Sonden für die Quantifizierung der RNA wurden als fertige Assays „on-demand“ bei ABI (Weiterstadt) angefordert und direkt ohne Testlauf verwendet. Nur für die Gene PFDN4 und TBP wurden die passenden Sequenzen für die Primer und die Sonden selbst ausgesucht. Für diese Gene wurde so verfahren wie im Abschnitt *DNA* beschrieben.

### 3.2.5 Reverse Transkription

10µl der gereinigten RNA (ca. 250.000 Zellen) wurden mit 1µl Random Primer (1µg/µl) versetzt, und die Anlagerung (annealing) für 10 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reverse Transkription wurde mit 4 µl First-Strand-Buffer (Superscript-Kit), 2µl DTT 0,1 M (Superscript-Kit), 1µl dNTPs 10mM, 1µl RNaseInhibitor (RNaseOut von Invitrogen) und 1µl Superscript II Reverse Transkriptase (Superscript-Kit) für eine Stunde bei 42°C in einem Heizblock durchgeführt und anschließend das Enzym bei 95°C 5 Min. deaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C bis zur Durchführung der Real-Time PCR aufbewahrt.

### 3.2.6 Quantitative Real-Time PCR

#### 3.2.6.1 Allgemein

Mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) lässt sich DNA hochspezifisch und sehr sensitiv nachweisen (Frohman et al. 1988; Erlich et al., 1991). Die quantitative Real-Time PCR (TaqMan™ PCR) ist eine Methode, bei der unter Zuhilfenahme von fluoreszenzmarkierten Sonden das bei der PCR entstehende Amplifikat im selben Reaktionsschritt quantitativ bestimmt werden kann (Holland et al. 1991; Lee et al., 1993).

Zeitaufwendige Nachweismethoden des PCR-Produkts, wie z.B. Southern Blotting, entfallen. „Die fluoreszenzmarkierten Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist. Das 3'-Ende trägt einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) und ist mit einem Phosphatrest blockiert. Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs wird aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen, die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase wird aktiviert und die Sonde geschnitten. Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird unterbrochen und somit auch der FET, der Reporter gibt seine Fluoreszenz ab. Diese wird in jedem PCR Zyklus vom ABI PRISM 7700 erfaßt. Durch die Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz in jedem Zyklus an.“<sup>1</sup> Diese Veränderung der Fluoreszenz wird mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector Zyklus für Zyklus erfaßt.

Mit der TaqMan™ PCR besteht die Möglichkeit, eine absolute oder eine relative Quantifizierung durchzuführen. Bei der absoluten Quantifizierung kann dem gemessenen Signal

eine bestimmte Startkopienzahl oder DNA-Konzentration zugeordnet werden. Die relative Quantifizierung bestimmt die Menge der zu untersuchenden Sequenz relativ zur vorhandenen Menge eines Referenzgens. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung angewandt. Als Referenzgene wurden  $\beta$ -Globin für die Untersuchung der DNA und TBP (TATA-box-binding-protein) für die Untersuchung der RNA verwendet, denn diese Gene weisen beim Mammakarzinom keine Amplifikation bzw. erhöhte Expression auf. Bei jedem Reaktionszyklus wurden diese Gene mitbestimmt.

<sup>1</sup>(Dr. Thomas A. Schild, 7700 SDS Workshop, "Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie" Vers. 2.1, Kapitel 1 Einführung in die TaqMan™ PCR, S.6/7,ABI)

### 3.2.6.2 Standardkurven

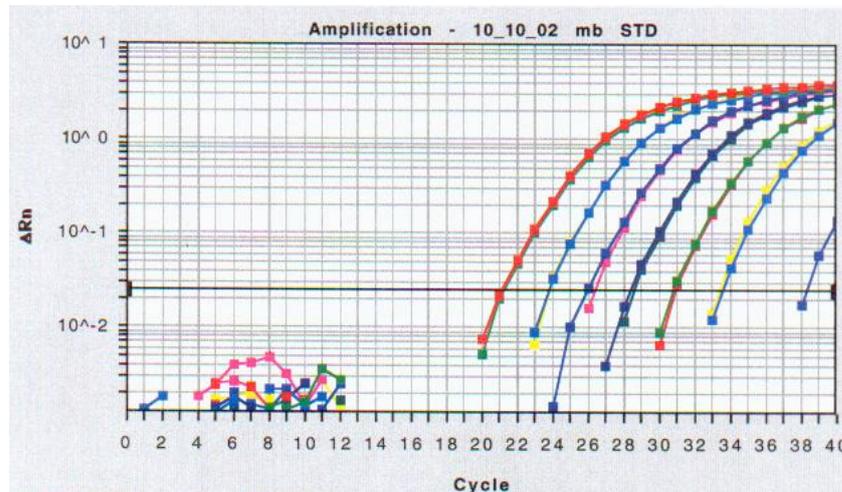
Die DNA- bzw. RNA-Menge wird mit Hilfe von Standardkurven ermittelt:

#### *A) Standardkurven - DNA:*

Für die Standardkurven der DNA Untersuchung wurde morphologisch unauffälliges, humanes Kolongewebe als Standard-DNA verwendet. Für jedes zu untersuchende Gen und für das Referenzgen Globin wurde eine Standardkurve erstellt. Hierfür wurde von der Standard-DNA eine Verdünnungsreihe erstellt, mit folgenden 5-fach Verdünnungen: 500ng / 100ng / 20ng / 4ng / 0,8ng / 0,16ng / 0,032ng, wobei die Exaktheit der Verdünnungsstufen von großer Wichtigkeit ist. Mit dieser Verdünnungsreihe wurde ein TaqMan™-PCR Lauf für jedes der zu untersuchenden Gene und für das Referenzgen Globin durchgeführt (Abbildung 3.2). Pro Verdünnungsstufe wurde ein PCR Reaktionsmix mit einem Volumen von 30 $\mu$ l pro Vertiefung in eine 96-Loch-Platte pipettiert, bestehend aus:

15 $\mu$ l	TaqMan™ Universal PCR MasterMix
3 $\mu$ l	Vorwärtsprimer (Konzentration in 30 $\mu$ l entspricht 300nM)
3 $\mu$ l	Rückwärtsprimer (Konzentration in 30 $\mu$ l entspricht 300nM)
3 $\mu$ l	fluoreszenzmarkierte Sonde (Konzentration in 30 $\mu$ l entspricht 200nM)
4 $\mu$ l	DNA (Menge der Verdünnungsreihe entsprechend)
2 $\mu$ l	Ampuwa®.

Für jede Verdünnung liefen Duplikate im selben PCR-Lauf, so erhielt man pro Verdünnung zwei Ct-Werte aus dem TaqMan™ Gerät.



**Abbildung 3.2:**

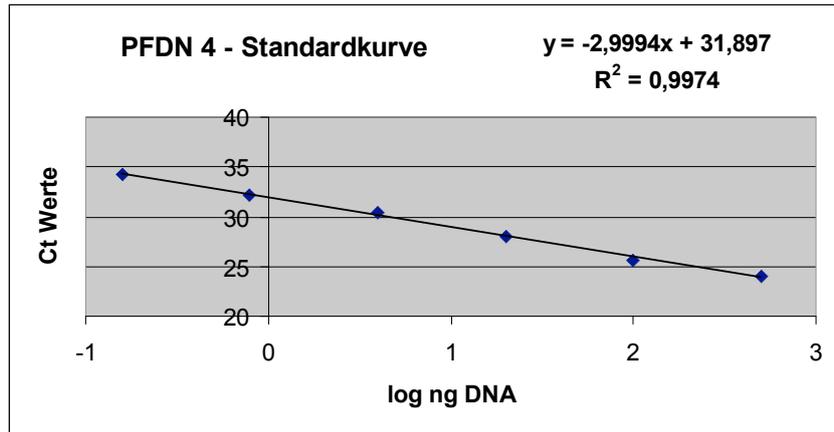
TaqMan™ PCR Diagramm: Amplifikations-Plot des Gens PFDN4 in sieben verschiedenen DNA-Verdünnungen. Das Diagramm zeigt die exponentiell zunehmenden, detektierten Signale für die unterschiedlichen DNA Konzentrationen der Verdünnungsreihe (jeweils Duplikate = zwei Farben pro Kurve). Je höher die Konzentration der Standard-DNA (morphologisch unauffälliges humanes Kolongewebe) um so geringer die Anzahl der PCR-Zyklen, die für eine Detektion notwendig sind (x-Achse). Je weniger DNA der Reaktion zu Beginn zugegeben wird, umso mehr PCR-Zyklen werden benötigt, bis die Fluoreszenz die festgesetzte Schwelle erreicht, bei der ein Ct-Wert bestimmt wird.

**$\Delta Rn$ :** normalisiertes Reportersignal

**Cycle:** PCR-Reaktionszyklus

**Ct-Wert:** Threshold Cycle; drückt die Zyklenzahl aus bei der zum ersten Mal ein signifikanter Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über der Schwelle erfaßt wird.

Aus den oben ermittelten Ct-Werten der Duplikate wurde der Mittelwert berechnet und gegen die logarithmierte DNA-Menge aus der Verdünnungsreihe aufgetragen (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3:**

Darstellung der Regressionsgeraden aus der logarithmierten Standard-DNA Verdünnungsreihe und den erhaltenen Ct-Werten.

*CT-Wert* = Threshold Cycle: Drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein signifikanter Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über der pro PCR-Lauf festgesetzten Schwelle erfaßt wird.

*log ng DNA*: Logarithmische Darstellung der als Verdünnungsreihe eingesetzten Standard-DNA.

Die Punkte geben den Mittelwert der Duplikate pro Verdünnung an.

$R^2$ : Gibt die Effizienz der Reaktion wieder, je näher  $R^2$  am Wert 1 liegt, um so höher die Effizienz der Reaktion.

Man erhält eine Regressionsgerade bzw. Standardkurve (Abbildung 3.3) mit der Gleichung  $y = -2,9994x + 31,897$ . Für  $y$  wird der jeweilige Ct-Wert der untersuchten Tumorprobe eingesetzt,  $-2,9994x$  gibt die Steigung der Geraden an,  $+31,897$  den Schnittpunkt der Geraden mit der  $y$ -Achse. Die Gleichung wird zur Berechnung der Menge an DNA nach  $x$  umgeformt. Dadurch entsteht die Gleichung:

$$x = \frac{Ct - 31,9}{-2,9}$$

Wird nun für  $y$  der Ct-Wert der Tumorprobe eingesetzt, erhält man als Ergebnis die logarithmierte Ausgangsmenge an DNA für das zu untersuchende Gen.

Die Effizienz der Reaktion wird durch  $R^2$  wiedergegeben, je näher  $R^2$  am Wert 1 liegt um so höher die Effizienz der Reaktion. Bei den in dieser Arbeit erstellten Standardkurven zeigte  $R^2$  einen Wert  $\geq 0,99$  für die DNA-Standardkurven und  $\geq 0,98$  für die RNA-Standardkurven.

### *B) Standardkurven - RNA:*

Für die Standardkurven der RNA Untersuchung wurde die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 als Standard-RNA verwendet. Nach reverser Transkription der RNA wurde aus der gewonnenen cDNA ebenfalls eine 5-fach Verdünnungsreihe erstellt: 50ng / 10ng / 2ng / 0,4ng / 0,08ng / 0,016ng / 0,0032ng. Mit dieser Verdünnungsreihe wurde, wie oben für die DNA beschrieben, für jedes zu untersuchende Gen und das Referenzgen TBP (TATA-box-binding-protein) eine Standardkurve erstellt. Für jede Verdünnungsstufe wurde ein PCR Reaktionsmix mit einem Volumen von 20µl pro Vertiefung in eine 96-Loch-Platte pipettiert, bestehend aus:

10µl	TaqMan™ Universal PCR MasterMix
1µl	Assay (enthält vorgefertigt Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie die Sonde)
4µl	cDNA (Menge der Verdünnungsreihe entsprechend)
5µl	Ampuwa®

### 3.2.6.3 Durchführung der TaqMan™-PCR

Durchführung der TaqMan™-PCR mit der DNA bzw. RNA aus Tumorgewebe. Für jede Reaktion wurde ein Gesamtvolumen von 30µl (DNA-Untersuchung) bzw. 20µl (cDNA-Untersuchung) pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte eingebracht.

30µl PCR Ansatz (DNA):

15µl	TaqMan™ Universal PCR MasterMix
3µl	Vorwärtsprimer (Konzentration in 30µl entspricht 300nM)
3µl	Rückwärtsprimer (Konzentration in 30µl entspricht 300nM)
3µl	fluoreszenzmarkierte Sonde (Konzentration in 30µl entspricht 200nM)
4µl	DNA (ca. 100 ng)
2µl	Ampuwa®

Anmerkung: Die Primer für das Gen PTPN1 wurden in einer Konzentration von 9µM eingesetzt (900nM in 30µl), da die Austitrierung der Primer mit einer Primermatrix in diesem Fall bei einer Konzentration von 9µM das beste PCR-Ergebnis lieferte.

20µl PCR Ansatz (cDNA):

10µl	TaqMan™ Universal PCR MasterMix
1µl	Assay (enthält vorgefertigt Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie die Sonde)
4µl	cDNA (nach Erfahrungswert anhand der Anzahl an mikrodisektierten Zellen)
5µl	Ampuwa®

Es wurden insgesamt 40 PCR-Zyklen durchlaufen. Für die Sonden von Applied Biosystems wird eine zweistufige PCR empfohlen, bei der jeder Zyklus mit einer Denaturierung von 15 Sekunden bei 95°C beginnt und die Anlagerung (Annealing) sowie die Verlängerung (Elongation) für 1 Minute bei 60°C in nur einem Schritt erfolgen. Bei jedem PCR Lauf wurde für jedes Gen ein Kalibrator (Ansatz mit Standard-DNA) als Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle (Ansatz ohne DNA bzw. cDNA) mit amplifiziert. Es wurden immer Duplikate amplifiziert und aus der delogarithmierten DNA-Menge der beiden Duplikate dann der Mittelwert berechnet. Der Mittelwert der DNA-Menge des Gens wird durch den Mittelwert der DNA-Menge des Referenzgens Globin, das bei jedem Lauf mitbestimmt wurde, dividiert. So erhält man einen relativ zur Menge an Globin normalisierten Wert für die untersuchten Gene.

Zur Fehlerrechnung wurde von den Mittelwerten (MW) die Standardabweichung (STD) und der Koeffizient der Abweichung ( $CV = \text{STD}/\text{MW}$ ) berechnet. Aus dem CV des untersuchten Gens und dem CV des Globins wird die Quadratsumme gebildet und die Wurzel gezogen, so erhält man den Gesamtfehler (CV-gesamt). Die Gesamtstandardabweichung (Gesamt-CV x rel. DNA-Menge) sollte weniger als 30% betragen.

### **3.2.7. FISH**

Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, die es ermöglicht, genetische Veränderungen auch in Interphase-Zellkernen untersuchen zu können (Hopman et al. 1991). Sie kann an frischen zytologischen Präparaten und an FFPE-Gewebe durchgeführt werden. Dazu wird die DNA der Zellen denaturiert, so daß sie einzelsträngig vorliegt. Nun wird eine fluoreszenzmarkierte einzelsträngige DNA-Sonde, welche die gesuchte Sequenz repräsentiert, auf das zu untersuchende Zellmaterial aufgebracht (hybridisiert). Durch Doppelmarkierung kann z.B. auch gleichzeitig das Zentromer des Chromosoms, auf dem die gesuchte DNA-Gensequenz liegt, spezifisch markiert werden. Von dem hybridisierten Schnitt werden mit speziellen Mikroskopen Schichtaufnahmen gefertigt, an denen anschließend die Fluoreszenzsignale ausgewertet werden (Wolman SR. 1994).

#### 3.2.7.1 Präparation der histologischen Schnitte für die FISH mit der Her2/neu Sonde

Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurden die angefertigten histologischen Schnitte entparaffiniert (siehe Anhang 8.3 S.95), 5 Min in 1xPBS pH 7,0 gewaschen und 20 Minuten im Citratpuffer in der Mikrowelle gekocht. Nach Spülen in 1xPBS erfolgte der Proteinverdau in 0,05%iger PronaseE für 7 Min bei 37°C. Nach nochmaligem Spülen in 1xPBS wurde der Schnitt für 5 Min in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Zur Denaturierung wurden die Objektträger in

50%igem Formamid/2xSSC gespült und anschließend 15 Min in 70%igem Formamid/2xSSC bei 75°C belassen. Nach jeweils 5 Min eiskaltem Ethanol (70%, 90%, 100%) wurden die Schnitte auf einer 37°C warmen Heizplatte luftgetrocknet, anschließend das Sondengemisch auf das Gewebe pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Zur Hybridisierung wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C mind. 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Präparate kurz in 2xSSC/0,3% NP40 bei Raumtemperatur angefeuchtet, das Deckglas entfernt, 2 Min in 2xSSC/0,3% NP 40 bei 73°C gewaschen und im Dunkeln getrocknet. Nach anschließender Rehydrierung in 2xSSC und Färben für 1 Min in DAPI-Lsg. bei RT wurden die Präparate mit Vectashield (Linaris, Wertheim) eingedeckt.

#### 3.2.7.2 Auswertung der FISH mit der Her2/neu Sonde

FISH-Bilder aus mehreren Schichten der Schnitte wurden mit dem Epifluoreszenz Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena) aufgenommen, welches mit einer Apotome Extension (Zeiss Vision, Jena) ausgestattet ist. Die Auswertung der FISH-Signale erfolgte an diesen aufgenommenen Bildern (siehe Abbildungen 4.2 A-C S.40). Die Her2/neu Sonde markiert das Zentromer 17 (grüne Signale) und das Gen Her2/neu (rote Signale). Es wurden Signale von ungefähr 200 Kernen pro Tumor ausgezählt und die Mittelwerte der Her2/neu-Signale pro Kern, die Mittelwerte der Zentromer-Signale pro Kern, sowie das Verhältnis roter:grüner Signale berechnet. In normalen Zellen beträgt die mittlere Signalfrequenz pro Zellkern = 2, im histologischen Schnitt - bedingt durch einige angeschnittene Zellkerne bei 5 µm dicken Schnitten - liegt die mittlere Signalfrequenz zwischen 1,5 und 1,8. Ergibt sich nach Auszählung der Signale ein Wert >2 für die Zentromersignale, geht man von einer Polysomie 17 aus, bei einem Wert >2 für die roten genspezifischen Signale, von einer Her2/neu Amplifikation. Das rot:grün Verhältnis der Signale liegt nicht nur bei normalem genetischen Status bei 1, sondern auch bei einer Polysomie 17. Dagegen beschreibt ein rot:grün Verhältnis von >1 eine Her2/neu Amplifikation.

#### 3.2.7.3 FISH mit dem PTK6 PAC-Klon

Der PAC-Klon wurde in LB Medium und Kanamycin nach Empfehlung des Lieferanten kultiviert und die DNA mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert und gereinigt. Von dieser wurden 1000ng in einem Nick-Translations-Ansatz von 100µl nach Standardprotokoll mit Biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim) markiert. Die Spezifität des PAC-Klons wurde durch Hybridisierung auf Metaphasen Chromosomen (Vysis, Frankreich) bestätigt. Die Vorbehandlung der histologischen Schnitte erfolgte wie unter Absatz 3.2.7.1 (S.32). beschrieben. Für die

Hybridisierung wurden 500ng DNA pro Schnitt eingesetzt. Das anschließende Waschen der Schnitte erfolgte im 43°C warmen Wasserbad mit 3x15 Min 50% FA und 1x15 Min 2xSSC, gefolgt von 10 Min bei RT in PNM. Detektiert wurde bei 37°C mit Streptavidin Cy2 (10µl + 500µl PNM) für 45 Min, 2x5 Min PN, 45 Min Anti-Streptavidin (10µl+500µl PNM), 2x5 Min PN und noch einmal 45 Min Streptavidin Cy2. Die Gegenfärbung erfolgte für 2 Min bei RT mit DAPI (7µl in 100ml 2xSSC). Die abgetropften Präparate wurden mit Vectashield (Linaris, Wertheim) eingedeckt.

#### 3.2.7.4 Auswertung der FISH mit dem PTK6 PAC-Klon

Die Bilder wurden wie oben in Absatz 3.2.7.1 (S.32) beschrieben aufgenommen und es wurden ebenfalls die Signale von ca. 200 Kernen ausgezählt. Bei dieser FISH-Markierung finden sich allerdings nur Signale für das PTK6 Gen, das Zentromer wurde nicht markiert (siehe Abbildungen 4.3 A-C S. 41).

### **3.2.8 Statistik**

#### 3.2.8.1 Paarweiser t-Test

Es werden die Erwartungswerte von zwei paarweise verbundenen, normalverteilten Stichproben verglichen, und die Differenz für die jeweils zusammengehörenden Wertepaare gebildet. Hieraus errechnet sich die durchschnittliche Wertepaar Differenz. Der mittlere Fehler der durchschnittlichen Wertepaar Differenz wird mit der Varianz der Wertepaar Differenz berechnet. Die Stichprobe unterscheidet sich, wenn die mittlere Wertepaar Differenz signifikant größer oder kleiner Null ist.

Dieser Test wurde zur statistischen Auswertung der TaqMan™ Ergebnisse von tiefgefrorenen versus fomalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Zelllinien verwendet.

#### 3.2.8.2 Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient

Mit diesem Test wird der Korrelationskoeffizient berechnet, wenn die zu prüfenden Variablen nicht normalverteilt sind. Die Meßwerte werden ihrer Größe nach in eine Rangfolge gebracht, so daß jeder Meßwert einen bestimmten Rangplatz erhält. Aus den Rangwerten wird der Korrelationskoeffizient berechnet, welcher Werte zwischen +1 und -1 annehmen kann. Der Betrag des Korrelationskoeffizienten gibt an, wie eng die Beziehung zwischen den beiden Variablen ist. Bei Werten von +1 oder -1 läßt sich aus der Variablen a die Variable b errechnen, bei Werten um Null sind die Variablen unabhängig voneinander. Der Test wurde für die Fragestellung verwendet, ob einzelne Gene in Bezug zueinander, oder in Bezug zu den

klinischen und histopathologischen Parametern (Alter der Patientinnen, Größe des Tumors, Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Menopausenstatus) stehen.

#### 3.2.8.3 Wilcoxon-Test für Stichproben

Der Wilcoxon-Test ist ein Rangsummentest. Die Meßwerte werden ebenfalls ihrer Größe nach in eine Rangfolge gebracht, wobei Rangsummen von zwei Stichproben miteinander verglichen werden. Für diesen Test wurden die gefundenen Ergebnisse nach den klinischen und histopathologischen Parametern (s.o.) jeweils in zwei Gruppen unterteilt und statistisch ausgewertet.

#### 3.2.8.4 p-Werte

Die p-Werte können aus Tabellen entnommen oder mit einem Computer-Programm bestimmt werden. Hier wurde SAS (Procedure corr, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) verwendet. In dieser Arbeit wurden generell p-Werte kleiner 0,05 als signifikant angenommen.

## **4 ERGEBNISSE**

### *4.1 Ergebnisse der methodischen Untersuchungen*

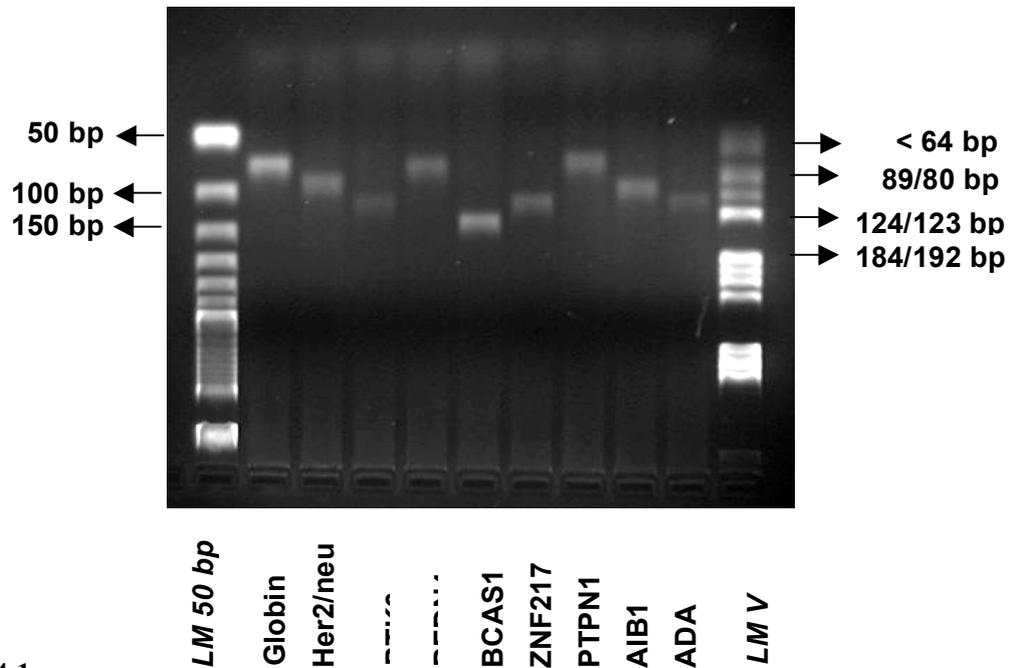
#### **4.1.1 Spezifität der Primer und Sonden**

##### 4.1.1.1 Primer

Die Spezifität der Primer, die für die vorliegende Arbeit entworfen wurden, wurde unter Zuhilfenahme der Gelelektrophorese und Gensequenzierung auf ihre Eignung überprüft. Es muß zur Durchführung der quantitativen Real Time PCR (TaqMan™) gewährleistet sein, dass für jede Primersequenz nur eine homologe Sequenz im gesamten menschlichen Genom vorhanden ist. Ausschließlich das gewünschte Gen soll amplifiziert und quantitativ bestimmt werden.

##### Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate

Die Amplifikate, die pro Primerpaar bei der PCR entstanden sind, wurden auf ein 2,5 %iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.1 S.37). Nach der Elektrophorese sollte nur eine Bande pro Primerpaar sichtbar werden. Damit ist gewährleistet, dass die Primer tatsächlich nur an einer Stelle im Genom binden. Unter Zuhilfenahme eines Längenmarkers (LM) kann zur Kontrolle die ungefähre Größe der Amplifikate abgelesen und mit der Sequenzgröße in den Datenbanken verglichen werden.



**Abbildung 4.1:**

Gelelektrophorese: Sie zeigt die bei der PCR entstandenen, auf das Gel aufgetragenen Amplifikate der zu untersuchenden Gene. Es ist jeweils nur eine Bande pro Gen zu erkennen. Anhand der Längenmarker am rechten und linken Bildrand kann die ungefähre Größe der Amplifikate abgelesen werden.

#### Sequenzierung

Für jedes pro Primerpaar entstandene Amplifikat aus Standard-DNA (cDNA) wurde je ein PCR-Produkt wie unter Abschnitt 3.2.4 (S. 26) beschrieben sequenziert. Die dabei entstandenen Sequenzen wurden mit der Sequenz des gesamten menschlichen Genoms bzw. mit der mRNA Sequenz in einer Gendatenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) verglichen. Für jede Amplifikat-Sequenz fand sich jeweils nur eine homologe Sequenz im Genom innerhalb des gewünschten Genbereichs. Dies beweist die Spezifität der selbst entworfenen Primer, welche für die quantitative DNA-Bestimmung der acht ausgesuchten Gene sowie für 2 Gene der Expressionsanalysen verwendet wurden. Für die von Applied Biosystems bezogenen 'Assays-on-Demand' garantiert die Firma die Spezifität.

#### 4.1.1.2 Sonden

Die Sequenzen der fluoreszenzmarkierten Sonden liegen zwischen dem jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Ihre Spezifität ist gewährleistet, wenn bei der TaqMan™ PCR Signale vom ABI PRISM 7700 Sequence Detection System detektiert werden können. Denn nur wenn die Sonde zwischen den Primern bindet, kann sie von der 5'-3' Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase abgespalten und geschnitten werden und dadurch das Fluoreszenzsignal abgeben.

## 4.1.2 Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der Methode

### 4.1.2.1 Vergleich von Her2/neu und PTK6 TaqMan™ Werten mit den FISH-Signalfrequenzen von Her2/neu und PTK6

Um die Zuverlässigkeit der erhaltenen DNA-TaqMan™ PCR-Werte zu überprüfen, wurde bei einigen der klinischen IDC Fälle eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit einer Her2/neu-Sonde bzw. mit einem PTK6 PAC-Klon durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 (S.39) dargestellt. Die Fälle mit den Nummern 11 und 32, bei welchen leicht erhöhte (2,3- und 2,7-fach) DNA-TaqMan™-Werte für Her2/neu gefunden wurden, zeigten bei der FISH-Untersuchung eine Polysomie für das Chromosom 17 sowie eine Her2/neu Genamplifikation, das heißt, es waren vermehrt Signale sowohl für die Her2/neu-Sonde als auch für die Zentromersonde vorhanden mit einem Verhältnis rot:grün größer als 1. Zum Vergleich sind in Tabelle 4.1 (S.39) auch die Expressionswerte (RNA) mitdargestellt. Die beiden Fälle (11 u. 32) zeigten auch erhöhte RNA-TaqMan™ Werte (7,7- bzw. 3,1-fach). Bei einem der Fälle (19) zeigte sich bei der FISH eine Polysomie von Chromosom 17. Hier war kein erhöhter DNA-TaqMan™-Wert vorhanden, jedoch ein leicht erhöhter RNA-TaqMan™-Wert (2,4-fach). Die erhöhten Her2/neu Expressionen der Fälle 3, 6, 20 und 24 zeigten dagegen normale DNA-Werte, sowohl mit TaqMan™-PCR als auch mit FISH.

Bei 6 dieser Fälle wurde die FISH-Technik auch mit dem PTK6 PAC-Klon durchgeführt. Auch hier kann eine Übereinstimmung mit den TaqMan™-Werten gefunden werden. Die Fälle 9, 20 und 32 zeigen leicht erhöhte DNA-TaqMan™-Werte (2,3-, 2,1- und 2,9-fach) und auch eine erhöhte mittlere Signalfrequenz bei der FISH (2,2, 1,9 und 3,7). Bei den drei Fällen mit normalen DNA-TaqMan™-Werten lieferte auch die FISH-Technik normale Signalfrequenzen.

Generell widerspiegeln also die DNA-TaqMan™-Werte durchaus die vorliegenden genomischen Verhältnisse, die mittels FISH-Technik bestimmt wurden. Die Abbildungen 4.2 und 4.3 (S.40 u. 41) zeigen Beispiele der FISH-Untersuchung.

Fall- nummer	F I S H		TaqMan <sup>TM</sup> Werte <u>Her2/neu</u>	TaqMan <sup>TM</sup> Werte <u>Her2/neu</u>	F I S H <u>PTK6</u>	TaqMan <sup>TM</sup> Werte <u>PTK6</u>	TaqMan <sup>TM</sup> Werte <u>PTK6</u>
	<u>Zentromer Chr. 17</u> Polysomie	<u>Her2/neu</u> Amplifi- kation	DNA	RNA	erhöhte Signal- frequenz	DNA	RNA
<b>3</b>	-	-	1,3	<b>3,0</b>	-	1,9	<b>2,7</b>
<b>6</b>	-	-	0,8	<b>2,9</b>			
<b>7</b>	-	-	1,4	1,2			
<b>9</b>	-	-	1,6	1,2	<b>+</b>	<b>2,3</b>	<b>6,6</b>
<b>11</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>2,7</b>	<b>3,1</b>			
<b>13</b>	-	-	1,0	1,2	-	1,9	<b>2,9</b>
<b>17</b>	-	-	0,7	0,8			
<b>19</b>	<b>+</b>	-	1,0	<b>2,4</b>			
<b>20</b>	-	-	0,9	<b>3,5</b>	<b>+</b>	<b>2,1</b>	<b>9,4</b>
<b>24</b>	-	-	1,0	<b>8,7</b>	-	0,6	<b>15,7</b>
<b>26</b>	-	-	0,6	0,7			
<b>32</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>2,3</b>	<b>7,7</b>	<b>+</b>	<b>2,9</b>	<b>5,7</b>

**Tabelle 4.1:**

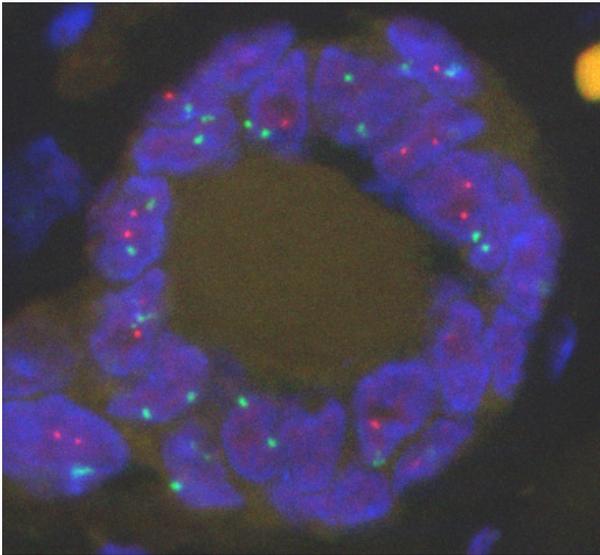
Vergleich der TaqMan<sup>TM</sup> Werte für Her2/neu und PTK6 mit der FISH-Signalfrequenz von Her2/neu (n = 12) und PTK6 (n = 6).

+ = erhöhte Signalfrequenz der FISH Her2/neu-Sonde, wobei ein rot:grün Verhältnis von 1einer Polysomie entspricht bzw. > 1 einer Amplifikation

+ = erhöhte Signalfrequenz des PTK6 PAC--Klons

TaqMan<sup>TM</sup>-Werte = x-fach zum jeweiligen Referenzgen Globin bzw. TBP

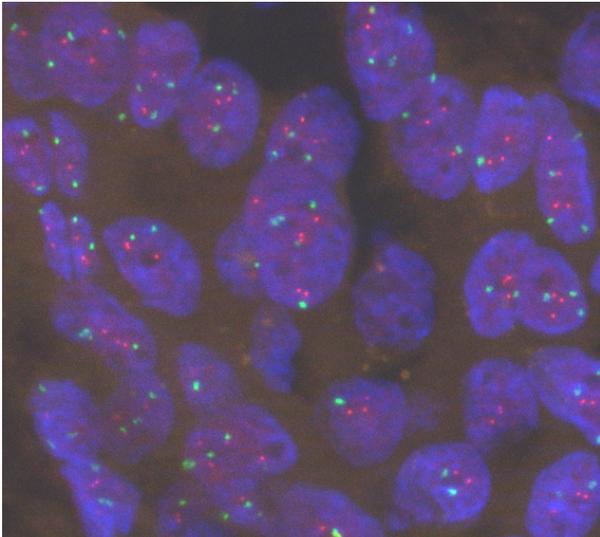
**Abbildungen 4.2 A-C** FISH mit der Her2/neu Sonde in histologischen Schnitten von Mammakarzinomen. Grüne Signale = Zentromersonde; rote Signale = Sonde für das Gen Her2/neu



**Abbildung 4.2 A:**  
Normales Mamma-Drüsenepithel.

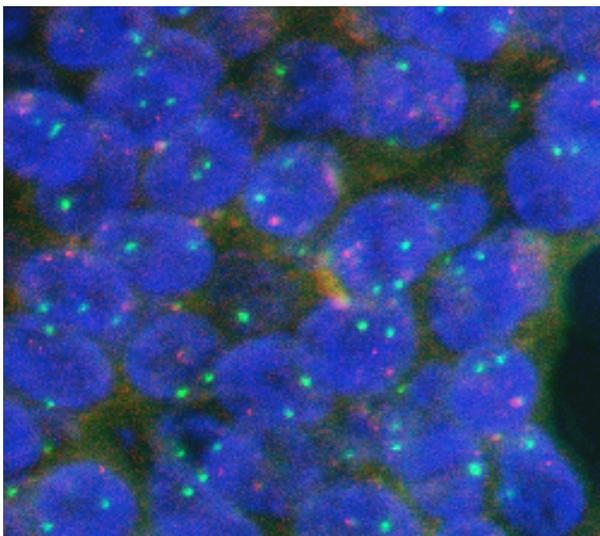
Bei gesundem Mammagewebe sollten jeweils zwei Signale pro Zellkern zu erkennen sein. Im histologischen Schnitt, bedingt durch einige angeschnittene Zellkerne bei 5 µm dicken Schnitten, liegt die Anzahl der Signale im Durchschnitt zwischen 1,5 und 1,8.

Wenn mehr als zwei grüne Signale pro Zellkern zu erkennen sind, spricht dies für eine Polysomie wenn das Verhältnis rot:grün = 1 ist. Eine Genamplifikation liegt vor, wenn das rot:grün Verhältnis >1 ist.



**Abbildung 4.2 B:**

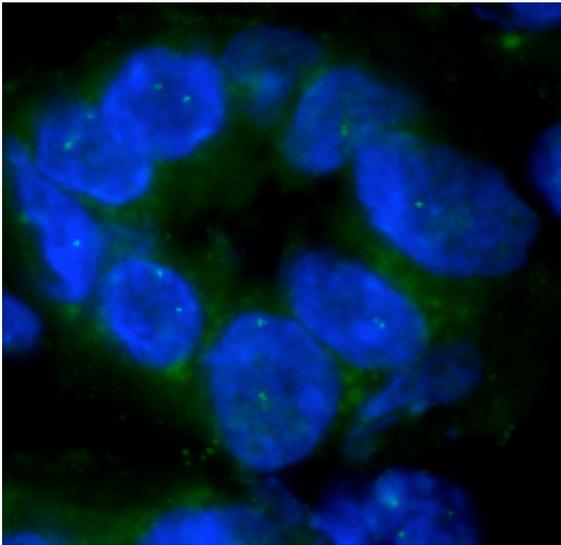
Der Fall Nr. 32 (23149) zeigt eine Polysomie und eine Amplifikation (siehe Beschreibung Abb. 4.2.a oben). Der DNA-TaqMan™-Wert ermittelte eine 2,3-fache Genkopienzahl relativ zum Referenzgen Globin.



**Abbildung 4.2 C:**

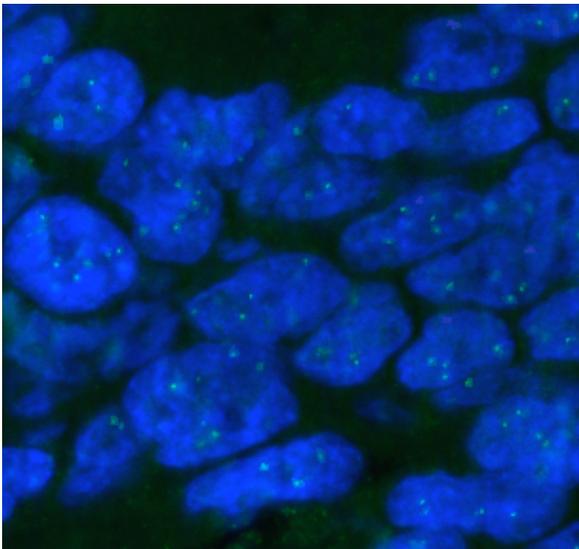
Der Fall Nr. 24 (10378) zeigt normale Signalfrequenzen in den Zellkernen. Der DNA-TaqMan™-Wert ermittelte eine 1,0-fache Genkopienzahl relativ zum Referenzgen Globin.

**Abbildungen 4.3 A-C** FISH mit dem PTK6 PAC-Klon (grüne Fluoreszenzsignale) in histologischen Schnitten von Mammakarzinomen



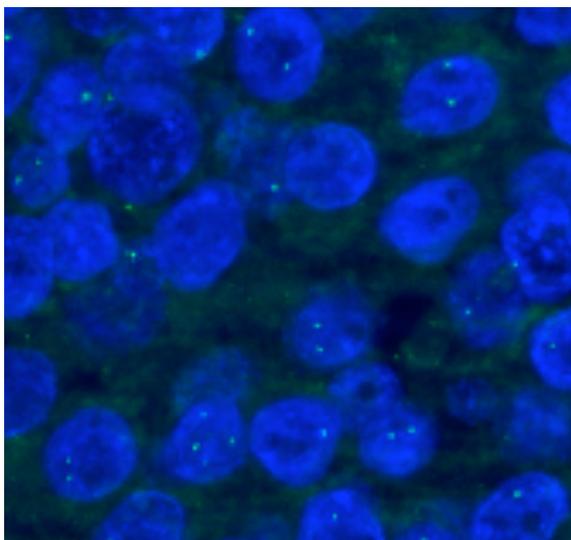
**Abbildung 4.3 A:**

Normales Mamma-Drüsengewebe mit jeweils 1 bzw. 2 Signalen pro Zellkern. (s.Text Abb. 4.2.a)



**Abbildung 4.3 B:**

Der Fall Nr. 32 (23149) zeigt eine Amplifikation. Es sind vermehrt grüne Signale pro Zellkern zu erkennen. Der DNA-TaqMan™-Wert ermittelte eine 2,9-fache Genkopienzahl relativ zum Referenzgen Globin.



**Abbildung 4.3 C:**

Der Fall Nr. 24 (10378) zeigt eine normale Signalfrequenz in den Tumorzellkernen. Der DNA-TaqMan™-Wert ermittelte eine 0,6-fache Genkopienzahl relativ zum Referenzgen Globin.

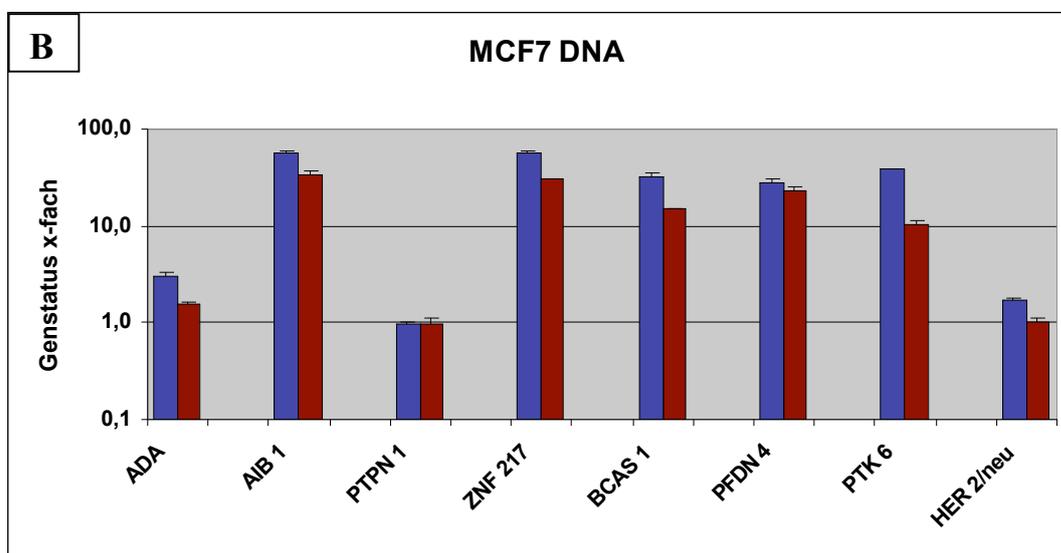
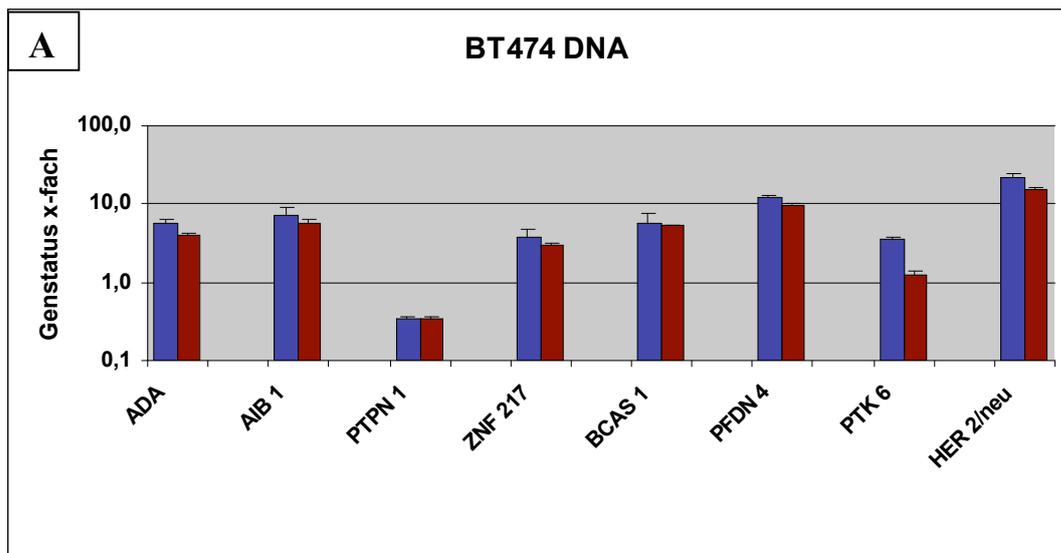
#### 4.1.2.2 Vergleichbarkeit der TaqMan™ Methode an tiefgefrorenen bzw. formalinfixierten und paraffinierten Zelllinien

Um herauszufinden, ob die Formalinfixierung und Paraffineinbettung der Tumorgewebe Auswirkungen auf die DNA bzw. RNA TaqMan™-Werte hat, wurden zwei Zelllinien (BT474, MCF7) unterschiedlich vorbehandelt, und anschließend die 8 ausgesuchten Gene mit der TaqMan™-Methode bestimmt.

Die Mammakarzinom-Zelllinien BT 474 und MCF 7 wurden aufgrund der in der Literatur (Kallioniemi et al. 1994) beschriebenen erhöhten Anzahl an Genkopien am Chromosom 20q13 ausgewählt. Ein Teil der im Kulturmedium gezüchteten Zellen wurde bei –70°C tiefgefroren, der andere Teil formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. An diesen beiden unterschiedlich vorbehandelten Zellverbänden wurde DNA bzw. RNA der ausgesuchten Gene mit TaqMan™-PCR zweimal in unterschiedlichen PCR-Läufen bestimmt und Mittelwerte bzw. die Standardabweichung berechnet (siehe Abb. 4.4 und 4.5 S.43/44).

Für jede Zelllinie wurden die Mittelwerte der unterschiedlich vorbehandelten Zellen mit dem paarweisen T-Test statistisch ausgewertet, wobei ein p-Wert kleiner 0,05 als signifikant betrachtet wurde. Der p-Wert für die Mittelwerte lag für die DNA der BT474 Zelllinie bei 0,025 und für die DNA der MCF7 Zelllinie bei 0,023. Statistisch kann also auf DNA-Ebene ein signifikanter Unterschied der TaqMan™-Werte nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Zelllinien nachgewiesen werden. Dies stellt einen Verlust der Sensitivität der DNA TaqMan™ Methode bei formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Zellmaterial zur Diskussion.

Bei der statistischen Auswertung der für die RNA ermittelten Mittelwerte ergab der paarweise T-Test für die Zelllinie BT474 einen p-Wert von 0,386 und für die Zelllinie MCF7 ein p-Wert von 0,715. Die Formalinfixierung und Paraffineinbettung hat also keinen signifikanten Einfluß auf die RNA TaqMan™-Ergebnisse.

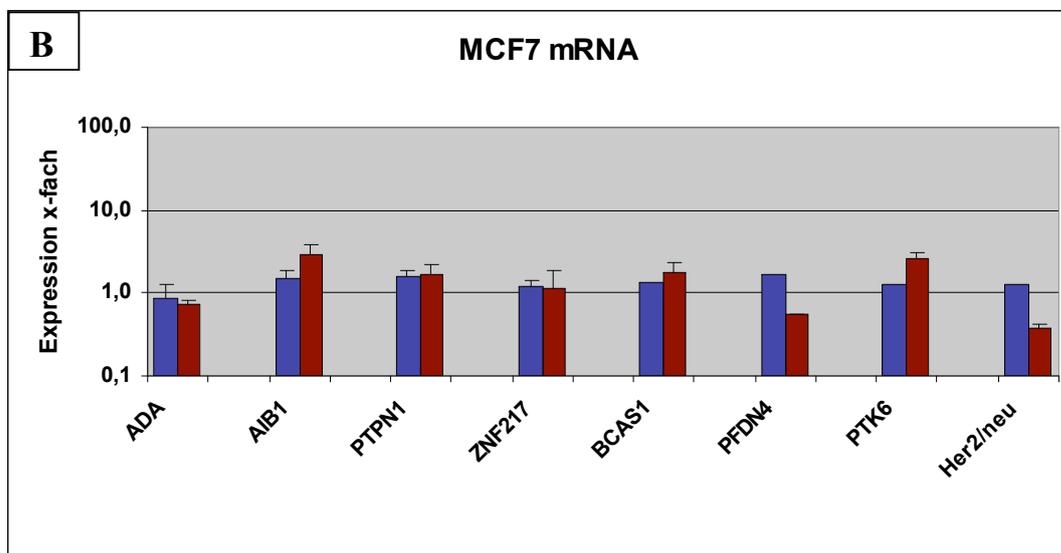
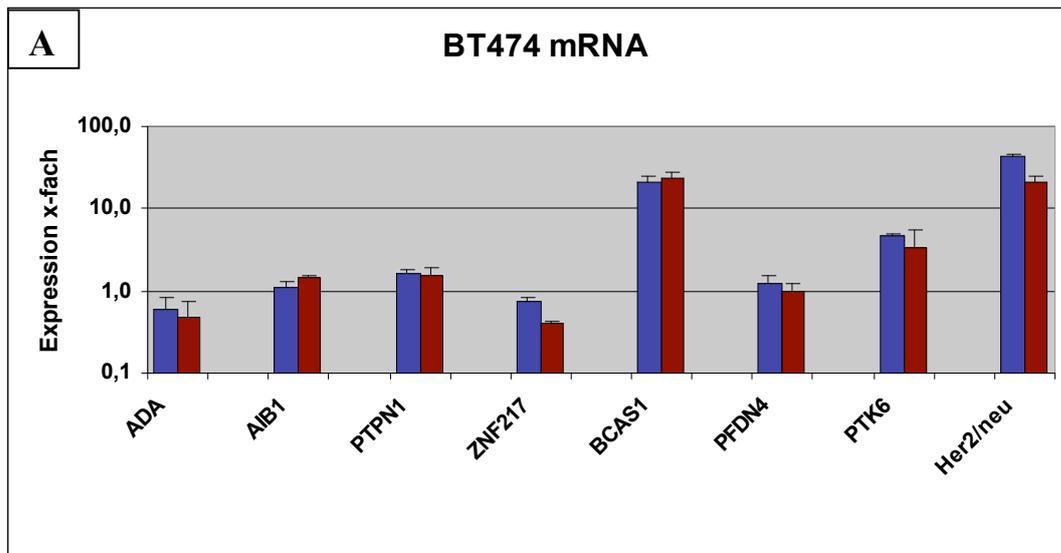


**Abbildung 4.4 A und B:**

Histogramme der DNA-TaqMan™ Ergebnisse der 8 ausgesuchten Gene (MW+STD). Die DNA wurde aus den Zelllinien BT474 (Abb. A) und MCF7 (Abb. B) gewonnen. Die Zelllinien wurden vor der DNA-Isolierung entweder bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren (blaue Säulen) oder formalinfixiert und in Paraffin eingebettet (rote Säulen).

Genstatus x-fach = Anzahl der ermittelten Genkopien relativ zum Referenzgen Globin.

Der p-Wert aus dem paarweisen T-Test zeigte einen signifikanten Unterschied bei unterschiedlicher Vorbehandlung (BT474  $p=0,025$ ; MCF7  $p=0,023$ )



**Abbildung 4.5 A und B:**

Histogramme der RNA-TaqMan™ Ergebnisse der 8 ausgesuchten Gene (MW+STD). Die RNA wurde aus den Zelllinien BT474 (Abb. A) und MCF7 (Abb. B) gewonnen. Die Zelllinien wurden vor der RNA-Isolierung entweder bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren (blaue Säulen) oder formalinfixiert und in Paraffin eingebettet (rote Säulen)

Expression x-fach = Expression relativ zum Referenzgen TBP.

(p-Wert aus paarweisem T-Test, für BT474  $p=0,303$ ; für MCF7  $p=0,823$ )

## 4.2 Ergebnisse der untersuchten IDC Fälle

### 4.2.1 DNA Ergebnisse

#### 4.2.1.1 Morphologisch unauffälliges Mammagewebe: DNA-Werte der acht ausgesuchten Gene

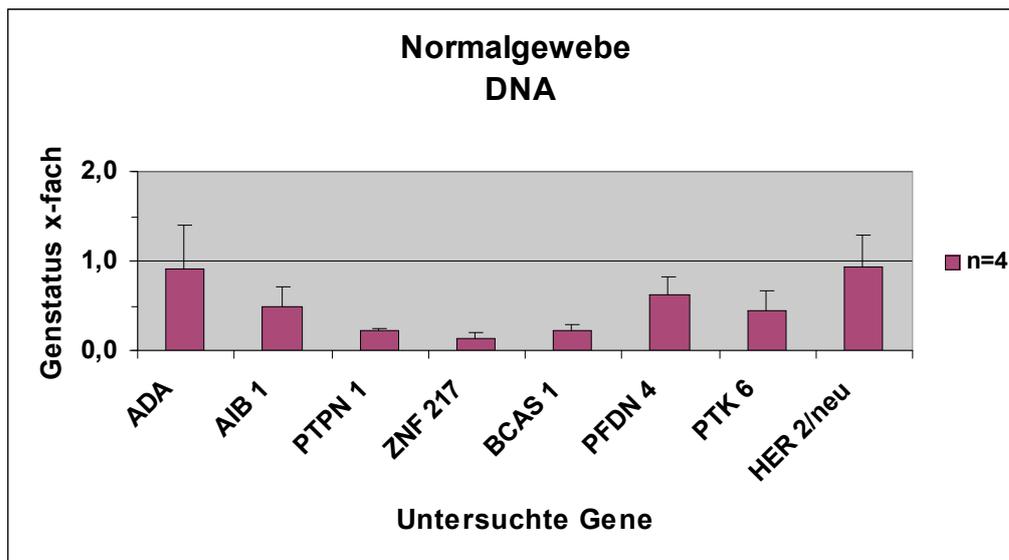
Um den Vergleich zwischen malignem und morphologisch unauffälligem Gewebe vornehmen zu können, wurden die 8 Gene an vier als morphologisch unauffällig befundenen Mammageweben, ebenfalls aus dem Pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar in München, untersucht. Die DNA des gesunden Mammagewebes wurde isoliert, gereinigt und mittels TaqMan<sup>TM</sup>-PCR die Genkopienzahl relativ zum Referenzgen Globin berechnet.

Die Ergebnisse des gesunden Mammagewebes sind in Tabelle 4.2 (S.46) dargestellt. Für normales Gewebe sollten die TaqMan<sup>TM</sup>-Werte relativ zum Referenzgen ungefähr den Wert 1 ergeben. Dies entspricht einem normalen Genstatus von 2 Allelen pro Gen. Um zu bestimmen, ab wann Werte >1 eine erhöhte Anzahl von Genkopien bedeutet, wurde für jedes an gesundem Mammagewebe untersuchte Gen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Wie in Abbildung 4.6 (S.46) dargestellt, liegen alle Mittelwerte ( $n = 4$ )  $\pm$  Standardabweichung deutlich unter dem Wert 2. Aus diesem Grund wurde dieser Wert als Schwellenwert für normale Genkopienzahl (= Werte < 2) bzw. Werte  $\geq 2$  als erhöhte Genkopienzahl gewertet.

DNA	ADA	AIB 1	PTPN 1	ZNF 217	BCAS 1	PFDN 4	PTK 6	HER 2/neu
Fall I	0,44	0,17	0,23	0,12	0,10	0,80	0,04	0,98
Fall II	1,48	0,94	0,23	0,20	0,34	0,66	0,74	0,36
Fall III	1,34	0,40	0,20	0,19	0,17	0,81	0,35	1,61
Fall IV	0,42	0,47	0,20	0,06	0,24	0,26	0,60	0,77
<b>Mittelwert</b>	0,92	0,50	0,22	0,14	0,21	0,63	0,43	0,93
<b>STD</b>	0,49	0,22	0,02	0,05	0,08	0,19	0,24	0,36
<b>MW + STD</b>	1,41	0,72	0,23	0,19	0,29	0,82	0,67	1,29

**Tabelle 4.2:**

Ermittelte DNA TaqMan™ Werte (=x-fach zum Referenzgen Globin) des normalen Mammagewebes (n = 4), berechnete Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (STD)



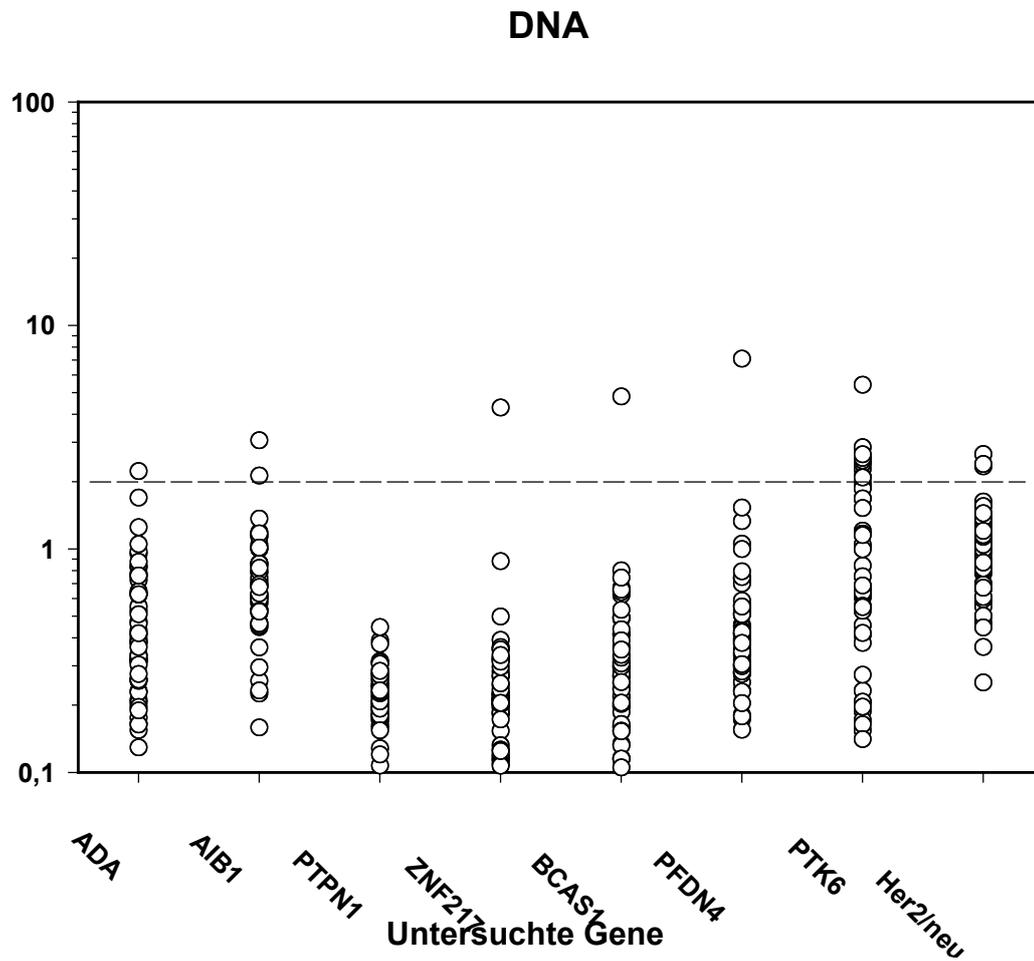
**Abbildung 4.6:**

Histogramm der DNA-Mittelwerte (+STD), ermittelt aus vier normalen Mammageweben.

#### 4.2.1.2 DNA-Ergebnisse der 53 primären invasiv duktafen Mammakarzinome (IDC)

Nach dem Schneiden, Färben und Mikrodisektieren der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten, invasiv-duktafen Mammakarzinome wurde die DNA isoliert, gereinigt und der DNA-Gehalt photometrisch gemessen. Es wurden jeweils 100ng DNA in die quantitative Real Time PCR eingesetzt.

Von insgesamt 54 IDC Fällen lieferten 53 Fälle brauchbare DNA TaqMan™-Werte. Ein Fall zeigte auch bei Wiederholungsuntersuchungen keine verwertbaren PCR-Ergebnisse, da die Fluoreszenzsignale zu schwach waren und eine zu hohe Variabilität aufwiesen. An jedem der 53 IDC Fälle wurden die 8 ausgesuchten Gene untersucht. Die Abbildung 4.7 (S.48) zeigt die Verteilung der ermittelten Werte für die untersuchten Gene: Nur wenige Werte liegen über dem Schwellenwert (Werte  $\geq 2$ ). Das bedeutet, dass die 8 Gene, die in den 53 IDC Fällen untersucht wurden, einen nur gering erhöhten Genstatus relativ zu Globin aufweisen. Nur die beiden Gene PTK6 und Her2/neu zeigen in wenigen Fällen eine erhöhte Anzahl der Genkopien. Die detaillierte Liste der ermittelten TaqMan™-Werte der 53 IDC Fälle und die dazugehörenden klinischen Daten sind im Anhang 8.5 zu finden (S.98).



**Abbildung 4.7:**

Graphische Darstellung der DNA TaqMan™ PCR Werte für jedes der untersuchten Gene in 53 IDC. Die TaqMan™ Werte sind logarithmisch aufgetragen und geben das x-fache Vorhandensein des Gens relativ zum Referenzgen Globin an. Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert 2 an, der durch Untersuchung von normalem Mammagewebe ermittelt wurde. Werte  $< 2$  werden als normal betrachtet und Werte  $\geq 2$  als vermehrtes Vorliegen des entsprechenden Gens im Tumor gewertet.

#### 4.2.1.3 Verteilung der erhöhten DNA-TaqMan™-Werte auf die 8 untersuchten Gene

In Tabelle 4.3 ist die Verteilung der erhöhten TagMan™-Werte auf die einzelnen Gene dargestellt. Es ist jeweils die Anzahl der Fälle mit Werten  $\geq 2$  in der Tabelle verzeichnet. Es zeigt sich deutlich, dass lediglich für das Gen PTK6 in insgesamt 11 Fällen (20,8%) erhöhte Werte gefunden werden konnten, für Her2/neu in insgesamt 3 Fällen (5,7%) und für AIB1 in insgesamt 2 Fällen (3,8%). Die restlichen 5 Gene zeigten nur einen bzw. das Gen PTPN1 keinen erhöhten Wert.

<i>Gene</i>	<b>Anzahl der IDC mit Genkopien <math>\geq 2</math></b>
<b>ADA</b>	<b>1</b>
<b>AIB1</b>	<b>2</b>
<b>PTPN1</b>	<b>-</b>
<b>ZNF217</b>	<b>1</b>
<b>BCAS1</b>	<b>1</b>
<b>PFDN4</b>	<b>1</b>
<b>PTK6</b>	<b>11</b>
<b>HER2/neu</b>	<b>3</b>

**Tabelle 4.3:**

Anzahl der Fälle, die eine Genkopienanzahl  $\geq 2$  relativ zum Referenzgen Globin aufwiesen.

#### 4.2.1.4 Verteilung der erhöhten DNA-TaqMan™-Werte auf die einzelnen Fälle

Lediglich bei einem der untersuchten IDC-Fälle (Nr. 32) zeigte sich eine gleichzeitige Erhöhung von insgesamt sieben der ausgewählten Gene (ADA, AIB1, BCAS1, PTK6, ZNF217, PFDN4, Her2/neu). Hier könnte eine Amplifikation der gesamten Region 20q13 vorliegen, zusätzlich zur Amplifikation des Her2/neu Gens. Bei zwei IDC-Fällen konnte eine gleichzeitige Erhöhung der DNA-TaqMan™ Werte von jeweils 2 Genen gefunden werden. Leicht erhöhte Werte zeigten beim Fall Nr.11 PTK6 (2,1-fach) und Her2/neu (2,7-fach) sowie beim Fall Nr.36 die Gene PTK6 (5,4-fach) und AIB1 (2,1-fach). Insgesamt neun IDC-Fälle zeigten nur bei jeweils einem Gen einen erhöhten Wert, darunter befand sich achtmal PTK6 (Werte zwischen 2,1 und 2,7-fach) und einmal Her2/neu (2,4-fach).

#### 4.1.2.5 Korrelation der Gene untereinander

Die DNA TaqMan™-Ergebnisse wurden statistisch auf Korrelation (Spearman) untersucht. Lässt man alle TaqMan™-Werte der 53 Fälle zu, korrelieren alle Gene untereinander außer PFDN4 und BCAS1 (Tab.4.4). Eine Korrelationsuntersuchung nur mit erhöhten Werten war hier – wegen der zu wenig vorhandenen Werte  $\geq 2$  – nicht möglich. Als statistisch signifikant wurde  $p \leq 0,05$  gewertet.

	<b>AIB1</b>	<b>BCAS1</b>	<b>PTK6</b>	<b>PTPN1</b>	<b>ZNF217</b>	<b>PFDN4</b>	<b>Her2/neu</b>
<b>ADA</b>	x	x	x	x	x	x	x
<b>AIB1</b>		x	x	x	x	x	x
<b>BCAS1</b>			x	x	x	-	x
<b>PTK6</b>				x	x	x	x
<b>PTPN1</b>					x	x	x
<b>ZNF217</b>						x	x
<b>PFDN4</b>							x

**Tabelle 4.4:** Signifikante Korrelation (x) der TagMan™ Werte auf DNA-Ebene.

#### 4.1.2.5 Korrelation der DNA Ergebnisse mit klinischen/histopathologischen Parametern

Mit dem Wilcoxon Score wurde die Korrelation der gefundenen Ergebnisse mit den klinischen und histopathologischen Parametern (Lymphknotenstatus, Größe des Tumors, Alter der Patientinnen, Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Menopausenstatus) statistisch ausgewertet. Es konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen der DNA Ergebnisse mit klinischen und histopathologischen Parametern ermittelt werden.

#### 4.1.2.6 Zusammenfassung der DNA Ergebnisse

Bei der quantitativen Bestimmung der acht Gene an 53 invasiv duktalem Mammakarzinomen konnten lediglich für das Gen PTK6 mehrere leicht erhöhte TaqMan™-Werte (n = 11) gefunden werden. Die restlichen sieben Gene, Her2/neu (n = 3), AIB1 (n = 2), ADA(n = 1), ZNF217 (n = 1), BCAS1 (n = 1), PFDN4 (n = 1) und PTPN1 (n = 0) zeigten nur in wenigen Fällen eine leicht erhöhte Genkopienzahl. Statistisch korrelierten alle Gene untereinander ausgenommen PFDN4 und BCAS1. Eine Korrelation der Gene mit klinischen und histopathologischen Parametern konnte statistisch nicht festgestellt werden.

### **4.2.2 RNA Ergebnisse**

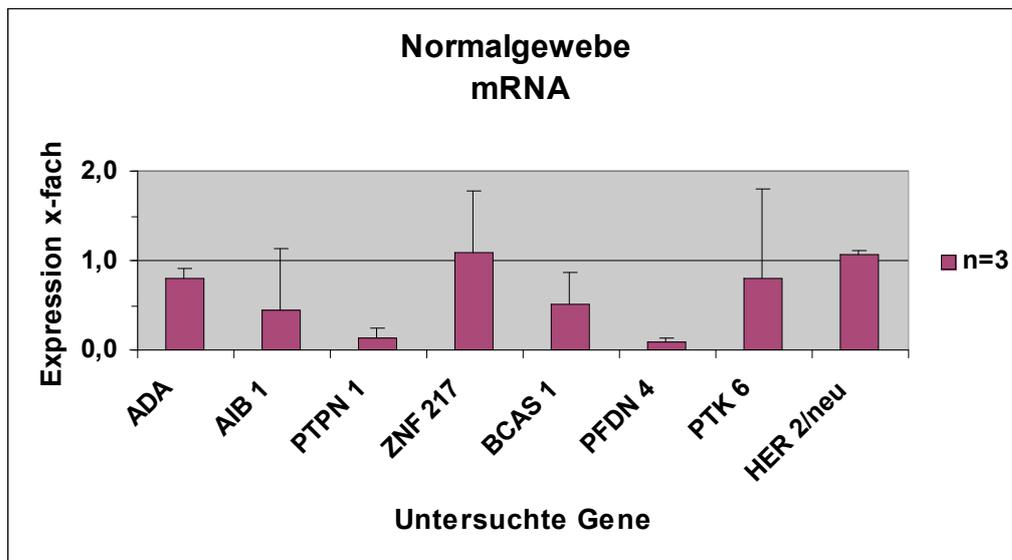
#### 4.2.2.1 Morphologisch unauffälliges Mammagewebe: RNA Werte der acht ausgesuchten Gene

Wie für die DNA wurden auch für die RNA die TaqMan™ Werte für morphologisch unauffälliges Mammagewebe ermittelt. Nach RNA Isolierung und reverser Transkription wurde mit der cDNA die quantitative Real-Time PCR (TaqMan™) durchgeführt. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 4.5 (S.52) dargestellt. Abbildung 4.8 (S.52) bildet die Mittelwerte mit Standardabweichung ab. Bei normaler Expression sollten die TaqMan™-Werte relativ zum Referenzgen ungefähr den Wert 1 ergeben. Um zu bestimmen, ab wann Werte >1 eine erhöhte Genexpression bedeuten, wurden für jedes Gen an normalem Mammagewebe (n = 3) die Mittelwerte berechnet, die alle unterhalb dem Wert 1,5 zuliegen kommen. Addiert man die einfache Standardabweichung, liegen sämtliche Werte unter dem Werte 2. Für die RNA wurde wie für die DNA der Schwellenwert für normale bzw. erhöhte Expression beim Wert 2 festgelegt.

RNA	ADA	AIB1	PTPN1	ZNF217	BCAS1	PFDN4	PTK6	HER2/neu
Fall I	1,09	0,07	0,28	0,06	0,14	0,03	2,30	1,00
Fall II	1,21	0,08	0,08	1,97	0,73	0,12	0,04	1,14
Fall IV	0,89	1,63	0,05	1,25	1,15	0,13	0,03	1,04
<b>Mittelwert</b>	0,80	0,44	0,14	1,09	0,50	0,09	0,79	1,06
<b>STD</b>	0,11	0,69	0,10	0,69	0,36	0,04	1,01	0,05
<b>MW + STD</b>	0,91	1,13	0,23	1,78	0,86	0,13	1,80	1,11

**Tabelle 4.5:**

Ermittelte RNA TaqMan™-PCR Werte (=x-fach zum Referenzen TBP) des normalen Mammagewebes (n = 3), berechnete Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (STD)



**Abbildung 4.8:**

Histogramm der RNA Mittelwerte (+STD), ermittelt aus drei normalen Mammageweben.

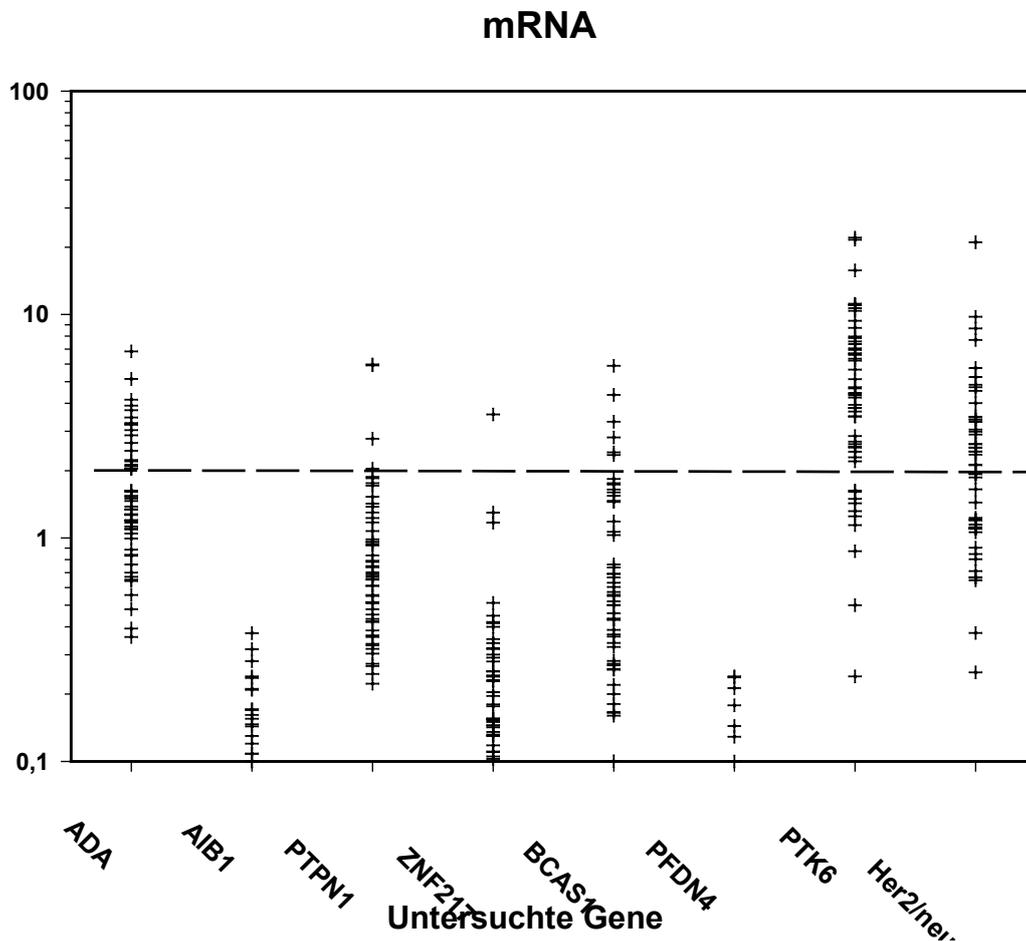
#### 4.2.2.2 RNA-Ergebnisse der 54 primären invasiv dukalen Mammakarzinome (IDC)

Zur RNA Gewinnung wurden Folgeschnitte von denselben Paraffinblöcken angefertigt, die ebenfalls gefärbt und dann mikrodisektiert wurden. Hier wurde darauf geachtet, dass das Tumorgewebe bzw. die Tumorzellen nicht mit RNase verunreinigt wurden. Die RNA wurde isoliert und gereinigt und der eingesetzte RNA Gehalt anhand der Menge der mikrodisektierten Zellen abgeschätzt: 1cm<sup>2</sup> mikrodisektierten Tumorgewebes entspricht ungefähr 50000 Zellen. Die cDNA von ca. 1250 Tumorzellen wurde pro untersuchtem Gen eingesetzt.

Auf Expressionsebene wurden dieselben acht Gene an jedem der 54 IDC Fälle mit quantitativer Real Time PCR (TaqMan™) untersucht, die auch auf DNA-Ebene untersucht wurden. Die ermittelten RNA TaqMan™ Werte der 8 Gene an 54 Patienten, sind im Diagramm der Abbildung 4.9 (S.54) dargestellt. Der Schwellenwert, der durch normales Mammagewebe (n = 3) ermittelt wurde (siehe Abschnitt 4.2.2.1 S.51), ist mit einer gestrichelten Linie auf Höhe des Wertes 2 eingezeichnet. Alle Werte  $\geq 2$  werden als erhöhte Expression des Gens gewertet, alle Werte  $< 2$  als normal.

Bei PTK 6 und Her2/neu zeigt sich eine deutliche Ansammlung der erhöhten TaqMan™ Werte für viele der untersuchten IDC. Ebenso konnten für das Gen ADA einige erhöhte Expressionswerte gefunden werden, für PTPN1, ZNF217 und BCAS1 nur bei vereinzelt Fällen. Bei AIB1 und PFDN4 fanden sich in den von uns untersuchten 54 IDC Fällen keine erhöhten TaqMan™-Werte.

Die detaillierte Liste der ermittelten RNA TaqMan™-Werte der 54 IDC Fälle und die dazugehörigen klinischen und histopathologischen Parameter finden sich im Anhang 8.6 (S.100).



**Abbildung 4.9:**

Graphische Darstellung der RNA TaqMan™-PCR Werte für jedes der untersuchten Gene. Die TaqMan™-Werte sind logarithmisch aufgetragen und geben die x-fache Expression relativ zum Referenzgen TBP an. Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert 2 an, der durch Untersuchung von normalem Mammagewebe (n = 3) ermittelt wurde. Werte < 2 werden als normal betrachtet, Werte  $\geq 2$  als erhöhte Expression des entsprechenden Gens gewertet.

#### 4.2.2.3 Verteilung der erhöhten RNA-Taq-Man™ Werte auf die 8 untersuchten Gene

Die Tabelle 4.6 zeigt die Häufigkeit erhöhter Werte pro Gen. PTK6 zeigt mit insgesamt 43 der 54 untersuchten IDC Fälle (79,6 %) am häufigsten eine erhöhte Expression, für Her2/neu konnten in 27 Fällen (50%) erhöhte TaqMan™-Werte gefunden werden, für das Gen ADA in 20 Fällen (37%), BCAS1 in 6 Fällen (11,1%), PTPN1 in 4 Fällen (7,4%), und ZNF217 in einem Fall (1,9%).

	Anzahl der Fälle mit mäßig erhöhter Expression	Anzahl der Fälle mit hoher Expression	Anzahl der Fälle mit <u>sehr</u> hoher Expression
<i>Gene</i>	Werte $\geq 2$ und $< 6$	Werte $\geq 6$ und $< 10$	Werte $\geq 10$
<b>ADA</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	-
<b>AIB1</b>	-	-	-
<b>PTPN1</b>	<b>4</b>	-	-
<b>ZNF217</b>	<b>1</b>	-	-
<b>BCAS1</b>	<b>6</b>	-	-
<b>PFDN4</b>	-	-	-
<b>PTK6</b>	<b>22</b>	<b>13</b>	<b>8</b>
<b>HER2/neu</b>	<b>23</b>	<b>3</b>	<b>1</b>

**Tabelle 4.6:**

Die Tabelle gibt die Anzahl der Fälle mit erhöhten Expressionswerten pro Gen an. Unterteilt wurde in mäßig ( $\geq 2$  und  $< 6$ -fach), hoch ( $\geq 6$  und  $< 10$ -fach) und sehr hoch ( $\geq 10$ -fach) exprimiert, relativ zum Referenzgen TBP. Untersucht wurde die RNA von insgesamt 54 IDC Fällen.

#### 4.2.2.4 Verteilung der erhöhten RNA-Taq-Man™ Werte auf die einzelnen Fälle

Am häufigsten, bei insgesamt 25 der 54 IDC Fälle (= 46,3%), waren PTK6 und Her2/neu parallel vermehrt exprimiert. Bei 13 dieser 25 IDC Fälle war gleichzeitig zu PTK6 und Her2/neu auch ADA erhöht. 1 Fall (Nr.36) zeigte gleichzeitig eine erhöhte Expression von 5 Genen (ADA, PTPN1, BCAS1, PTK6, Her2/neu) und ein weiterer (Nr. 24) von 4 Genen (ADA, BCAS1, PTK6, Her2/neu).

#### 4.1.2.5 Korrelation der Expressionswerte untereinander

Die RNA TaqMan™ Ergebnisse wurden statistisch auf Korrelation (Spearman) untersucht. Lässt man alle TaqMan™-Werte der 54 IDC Fälle zu, so finden sich mehrere signifikante Korrelationen, die in der Tabelle 4.7 mit einem "x" gekennzeichnet sind. Als statistisch signifikant wurde  $p \leq 0,05$  gewertet.

	<b>AIB1</b>	<b>BCAS 1</b>	<b>PTK6</b>	<b>PTPN1</b>	<b>ZNF217</b>	<b>PFDN4</b>	<b>Her 2/neu</b>
<b>ADA</b>	x			x	x		x
<b>AIB1</b>			x	x	x	x	x
<b>BCAS1</b>			x		x		
<b>PTK6</b>				x	x		x
<b>PTPN1</b>							
<b>ZNF217</b>						x	x
<b>PFDN4</b>							x

**Tabelle 4.7:** Signifikante Korrelation (x) der Expressionswerte.

#### 4.1.2.5 Korrelation der RNA Ergebnisse mit klinischen/histopathologischen Parametern

Mit dem Wilcoxon Score wurde die Korrelation der gefundenen RNA Ergebnisse mit den klinischen und histopathologischen Parametern (Lymphknotenstatus, Größe des Tumors, Alter der Patientinnen, Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Menopausenstatus) statistisch ausgewertet. Es konnten auch bei den Expressionsergebnissen keine statistisch signifikanten Korrelationen mit den klinischen und histopathologischen Parametern ermittelt werden.

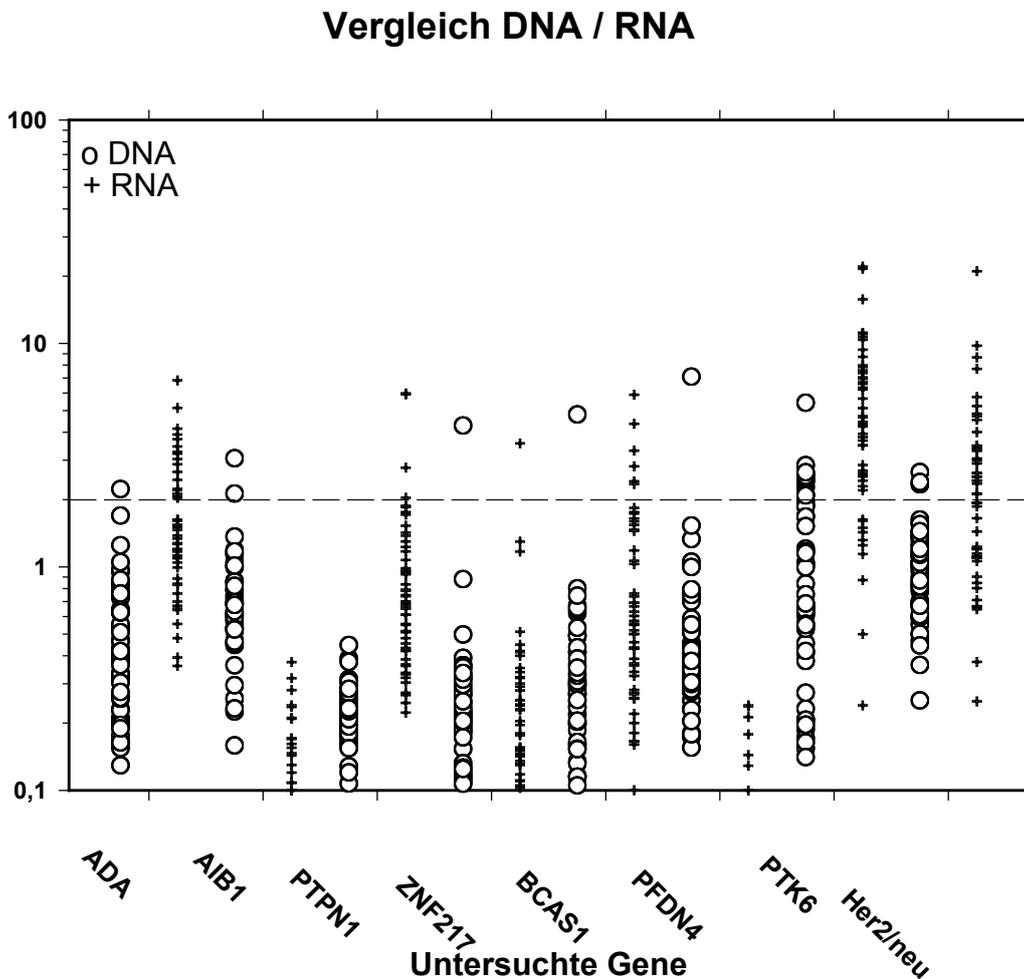
#### 4.1.2.6 Zusammenfassung der RNA Ergebnisse

Bei der quantitativen Bestimmung der Expression von acht Genen in 54 invasiv duktalem Mammakarzinomen konnten die meisten erhöhten Werte für PTK6 (n = 43), Her2/neu (n = 27) und ADA (n = 20) identifiziert werden. PTPN1 (n = 4), ZNF217 (n = 1) und BCAS1 (n = 6) zeigten nur in wenigen Fällen eine erhöhte Expression. Die beiden Gene AIB1 und PFDN4 waren in keinem der IDC Fälle verstärkt exprimiert. Für die beiden am häufigsten überexprimierten Gene (PTK6 und Her2/neu) konnte eine Korrelation festgestellt werden. Eine Korrelation der Gene mit klinischen und histopathologischen Parametern konnte statistisch nicht festgestellt werden.

## 4.2.3 Vergleich DNA / RNA Ergebnisse

### 4.2.3.1 Vergleich aller DNA und RNA Werte

Wenn man die DNA-Ergebnisse mit den RNA-Ergebnissen vergleicht, so findet man deutlich seltener erhöhte DNA Werte als erhöhte Expressionswerte. Abbildung 4.10 macht deutlich, dass eine erhöhte Anzahl der Genkopien nicht immer mit einer erhöhten Expression des Gens einhergeht oder bei einer erhöhten Expression nicht immer zeitgleich eine erhöhte Anzahl von Genkopien vorliegen muss.



**Abbildung 4.10:**

Gegenüberstellung aller ermittelten TaqMan™-Werte für DNA und RNA.

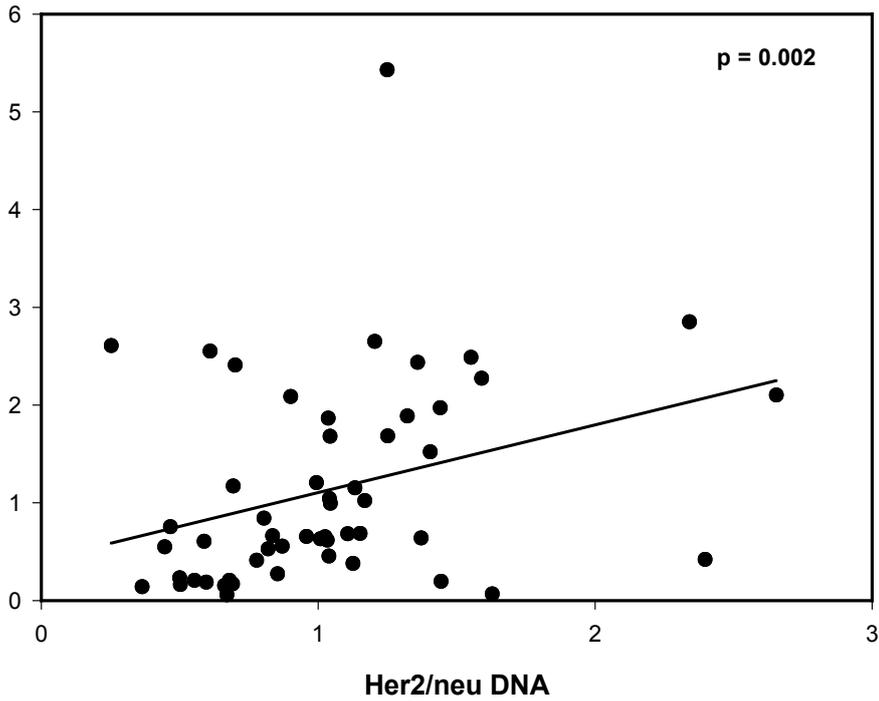
+ = RNA Werte, o = DNA Werte

#### 4.3.2.2 Statistische Korrelation der DNA und RNA Werte

Alle DNA und RNA TaqMan™ Ergebnisse wurden statistisch auf Korrelation (Spearman) untersucht. Unter Berücksichtigung des Signifikanzwertes  $p \leq 0,05$  korrelierten die DNA und RNA Werte des Gens Her2/neu ( $p = 0,036$ ) sowie die des Gens ADA ( $p = 0,028$ ) untereinander. Dies bedeutet, dass bei diesen beiden Genen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Genkopienanzahl und dem Expressionsstatus besteht. Bei allen anderen Genen konnte keine statistische Korrelation der DNA mit den zugehörigen RNAWerten gefunden werden.

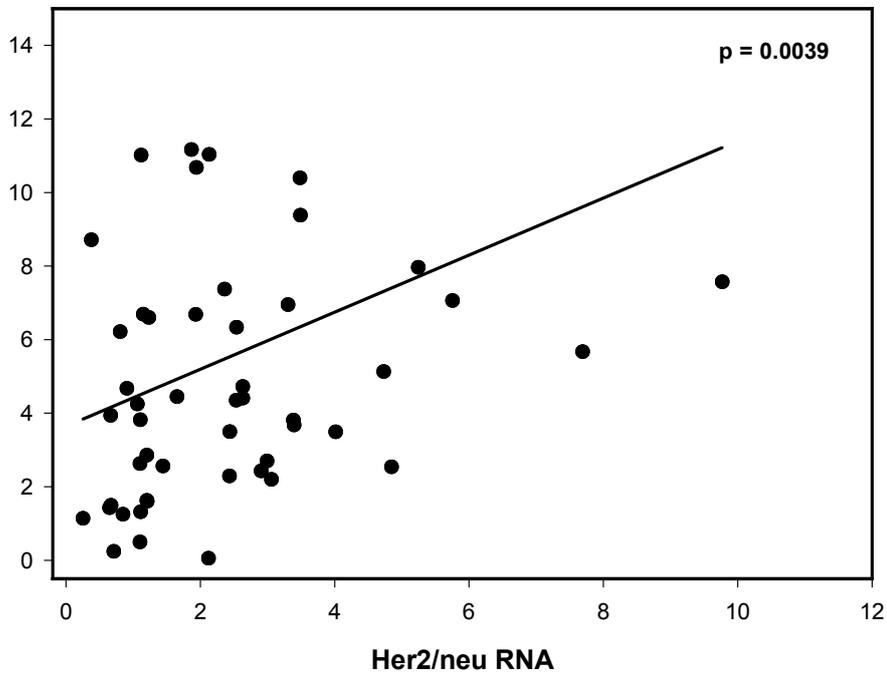
#### **4.2.4 Zusammenhang der Gene PTK6 und Her2/neu**

Die von uns untersuchten 54 (RNA) bzw. 53 (DNA) invasiv duktales Mammakarzinome zeigten auf DNA-Ebene sowie auf Expressionsebene für die beiden Gene PTK6 und Her2/neu am häufigsten erhöhte TaqMan™ Werte. Die Genkopienzahl von PTK6 und Her2/neu korreliert signifikant mit einem p-Wert von 0,002, wobei der Korrelationskoeffizient nur bei 0,414 lag (sollte über 0,7 liegen). Dies bedeutet, dass zwar bei den von uns untersuchten Fällen einige einen statistisch signifikanten Zusammenhang der beiden Gene aufweisen, was aber nicht grundsätzlich gilt. Auf Expressions-Ebene korrelierten PTK6 und Her2/neu signifikant mit einem p-Wert von 0,0039 und einem Korrelationskoeffizienten von 0,333. Auch hier bedeutet dies, dass in einigen Fällen einen statistisch signifikanten Zusammenhang besteht, jedoch nicht generell. Die Korrelation der Gene ist in den Abbildungen 4.10 und 4.11 (S.60) graphisch dargestellt.



**Abbildung 4.10:**

Graphische Darstellung der statistischen Korrelation von PTK6 und Her2/neu auf DNA-Ebene. Untersucht wurden 53 IDC-Fälle. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,414.

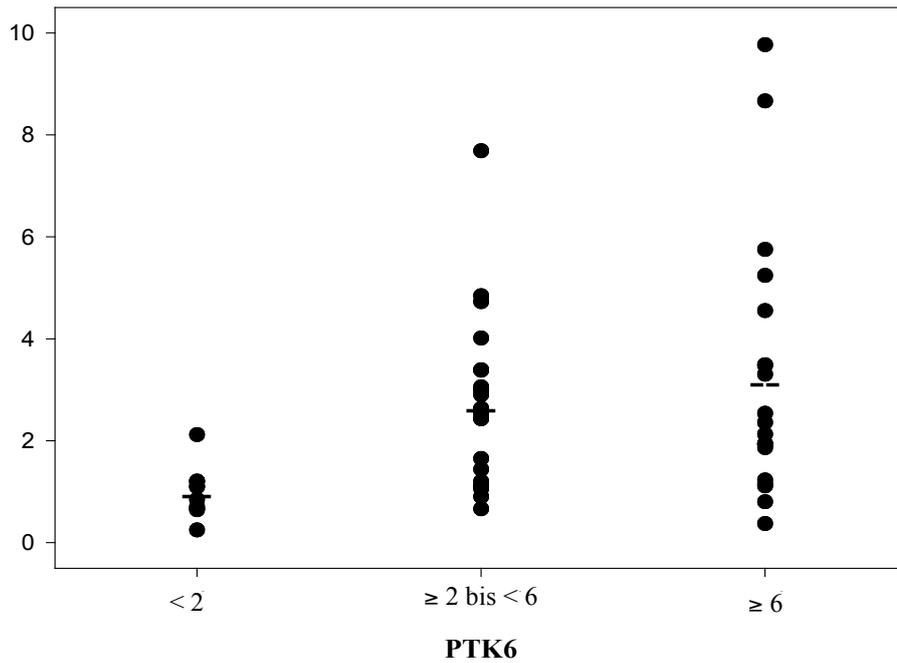


**Abbildung 4.11:**

Graphische Darstellung der statistischen Korrelation von PTK6 und Her2/neu auf RNA-Ebene. Untersucht wurden 54 IDC Fälle, wovon ein Ausreißer nicht mit berücksichtigt wurde. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,333.

Da sich auf Expressionsebene genügend erhöhte Werte für PTK6 und Her2/neu fanden, konnte eine Gruppierung der Werte vorgenommen werden. Die Expressionswerte des Gens PTK6 wurden in drei Gruppen eingeteilt: als normale Expression des Gens wurden Werte  $< 2$ , als mäßig erhöhte Expression Werte  $\geq 2$  bis  $< 6$  und als hohe Expression Werte  $\geq 6$  gruppiert. Es wurden für jede der drei Gruppen die Mittelwerte errechnet. Diese lagen bei normaler Expression bei 1,05 (0,1 bis 1,6; n = 10), bei mäßig erhöhter Expression bei 3,64 (2,2 bis 5,7; n = 22) und bei hoher Expression bei 9,96 (6,2 bis 22,1; n = 20). Ebenso wurden für diese 3 Gruppen die entsprechenden Her2/neu Expressionsmittelwerte berechnet. Diese lagen für normale PTK6-Expression bei 0,99, für mäßig erhöhte PTK6-Expression bei 2,67 und für hohe PTK6-Expression bei 3,18. Die Mittelwerte für Her2/neu sind in Abbildung 4.12 (S.62) als kleine Striche im Diagramm dargestellt. Die 20 Tumore mit hoher PTK6 Expression zeigen einen großen Streubereich für die Her2/neu-Werte, wobei ungefähr die Hälfte der Werte in den Bereichen normal und mäßig erhöhte Expression zu liegen kommen. In der Gruppe der Tumore mit mäßig erhöhter PTK6 Expression zeigten die meisten (n = 13) auch eine mäßig erhöhte Expression für Her2/neu. 9 der 10 Tumore mit normaler PTK6 Expression zeigten auch eine normale Expression für Her2/neu.

Dieser gefundene Zusammenhang lässt die Vermutung zu, dass die beiden Tyrosinkinasen Her2/neu und PTK6 in Abhängigkeit zueinander stehen und eventuell gemeinsam eine Rolle bei der Entstehung und Progression von Mammakarzinomen spielen.



**Abbildung 4.12:**

Das Diagramm veranschaulicht den Zusammenhang der Expression von Her2/neu und PTK6. Dazu wurden die PTK6 Werte in drei Gruppen eingeteilt, Werte  $< 2$  wurden als normale Expression, Werte  $\geq 2$  bis  $< 6$  als mäßig erhöhte Expression und Werte  $\geq 6$  als hohe Expression bewertet. Die Striche deuten die Her2/neu Mittelwerte dieser PTK6 Expressions-Gruppen an.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Genstatus- und Expressionsanalyse der ausgewählten Gene

#### 5.1.1 Genetische Veränderungen an Chromosom 20q beim Mammakarzinom

Auf der Suche nach Parametern, die Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf des Mammakarzinoms nehmen, rückten in den letzten Jahren immer mehr die genomischen Veränderungen in den Forschungsmittelpunkt. Mit der Technik der "Comparative Genomic Hybridization" (CGH) wurden viele Tumore auf DNA-Zugewinne bzw. -Verluste an Chromosomenregionen untersucht (Review Zitzelsberger et al. 1997). Bei Mammakarzinomen zeigten sich an mehreren Chromosomen Vervielfachungen, aber auch Verluste von DNA. Forozan F. et al. (2000) verglichen 17 CGH-Studien an Mammakarzinomen, insgesamt 698 Tumore, mit ihren CGH-Untersuchungen an 38 etablierten Mammakarzinom-Zelllinien. An den Zelllinien wurde unter anderem in 55% ein DNA-Zugewinn an Chromosom 20q gefunden. Die Chromosomenregion 20q13 zeigte in 29% sogar einen sehr hohen DNA-Zugewinn. Verglichen mit den Ergebnissen aus 698 Mammatumoren konnten die Autoren eine weitgehende Übereinstimmung ihrer Daten feststellen. Einzeln betrachtet konnten allerdings nur 11 der 17 Studien einen DNA-Zugewinn an Chromosom 20q beim Mammakarzinom finden, 6 Studien fanden mittels CGH normale DNA Verhältnisse an diesem Chromosom (Forozan F. et al. 2000). Auch die Zahlen über die Häufigkeit des DNA-Zugewinns an 20q bzw. 20q13 variieren, waren es bei Kallioniemi et al. (1994) 18% der primären Tumore (n = 33) und 40% der Zelllinien (n = 5), die einen DNA-Zugewinn aufwiesen, beschrieben Muleris M. et al (1994) bei einer ähnlichen, kurz darauf erschienen Studie 12% der primären Mammatumore (n = 17) mit Zugewinn an 20q13. Roylance R. et al. (1999) fanden sogar in 38% der von ihnen untersuchten Mammakarzinome (n = 90) diesen Zugewinn. Die Ersten, die die Amplifikation der Region 20q13 beim Mammakarzinom beschrieben, waren 1994 Kallioniemi et al.. Sie äußerten die Vermutung, dass sich in dieser Region Gene befinden, die eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielen. Tanner M.M. et al. beschrieben 1995, dass diese Amplifikation mit einem hohen histologischen Grad in Zusammenhang steht, mit einer erhöhten proliferativen Aktivität der Tumorzellen einhergeht, und dass bereits metastasierende Tumore eine höhere Amplifikationsrate aufweisen als Tumore bei welchen noch keine Metastasen festgestellt werden konnten. Außerdem geht eine hohe Amplifikation mit einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit bei Patientinnen, deren Lymphknoten noch nicht befallen waren, einher (Tanner

M.M. et al. 1995). Daraus schlossen sie, dass eine Amplifikation dieser Region mit einer schlechten klinischen Prognose einhergeht. Neben der Region 20q13 wurden noch weitere vermehrt amplifizierte Regionen auf dem langen Arm des Chromosoms 20 gefunden, nämlich 20q11 und 20q12-20q13 (Tanner M.M. et al. 1996). Die Frage, welche Gene sich in diesen Regionen befinden und somit die Amplifikation hervorrufen, und welche Auswirkungen dies auf die Zellen hat, ist ein komplexes, in den letzten Jahren intensiv beforschtes Untersuchungsgebiet. Gefunden wurden bisher folgende häufig amplifizierte Gene in der Region 20q: PTPN1, AIB1-AIB3, ZNF 217, ZNF 218, NABC1 (auch BCAS1), NABC3-NABC5, PIC1L, CYP24, PFDN 4 (Review Hodgson GJ. et al. 2003) sowie auch ADA (Jhanwar S. E. et al 1989) und PTK6 (S.-H. Park et al. 1997). Der Einfluss dieser Gene auf die Entstehung der Tumore und deren Verhalten ist noch nicht eindeutig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden sieben der oben genannten Gene der Region 20q (PTPN1, AIB1, ZNF217, ADA, PTK6, BCAS1, PFDN4) sowie das Gen Her2/neu auf Chromosom 17q12 an 54 invasiv duktalem Mammakarzinomen (IDC) mit Real-Time-PCR quantifiziert, der Genstatus sowie das Expressionsniveau untereinander verglichen und die Daten mit den entsprechenden klinischen und histopathologischen Parametern statistisch ausgewertet. Ziel war es herauszufinden, ob einzelne oder mehrere amplifizierte u./o. überexprimierte Gene dieser Region untereinander in Zusammenhang stehen u./o. ob sie mit den klinischen und histopathologischen Parametern in Zusammenhang stehen. Das Gen Her2/neu wurde mitbestimmt, um den Zusammenhang des schon bekannten Wachstumsfaktorrezeptors mit Genen der Region 20q abzuklären. Ein statistischer Zusammenhang der Überexpression von PTPN1 und Her2/neu konnte bisher festgestellt werden (Wiener J.R. et al 1994a), sowie ein Zusammenhang von erhöhter AIB1-Expression und starker Her2/neu immunhistochemischer Färbung (Bouras T. et al. 2001). Desweiteren wurde eine positive Korrelation zwischen Her2/neu und Cathepsin D gefunden (Anim J.T. et al. 2005).

### **5.1.2 Genstatus der 8 untersuchten Gene**

Die von uns untersuchten acht Gene zeigten bei der DNA-Quantifizierung der 53 invasiv duktalem Mammakarzinome nur in wenigen Fällen (insgesamt in 12 Fällen, entspricht 6,4%) gering erhöhte Real-Time-PCR Werte relativ zum Gen Globin. Lediglich das Gen PTK6 wies in insgesamt 11 Fällen eine 2,0 bis 5,4-fache Genkopienzahl auf, während Her2/neu in 3 Fällen nur sehr gering erhöhte Werte (2,3 bis 2,7-fach) zeigte. Das Gen AIB1 war in 2 Fällen mit Werten von 2,1 bis 3,1-fach vertreten. Bei allen anderen Genen mit Ausnahme von PTPN1 wurde jeweils nur ein erhöhter Wert gefunden, der immer denselben Fall (Nr. 32) betraf. Dies lässt eine

Amplifikation der gesamten Region 20q13 in diesem Fall vermuten, was wir allerdings bei mehreren Fällen erwartet hätten. Grund für diese Erwartungshaltung fanden wir in verschiedenen Veröffentlichungen, die zwar mit unterschiedlicher Häufigkeit von DNA-Zugewinn am langen Arm des Chromosoms 20 berichten, aber den von uns ausgewählten 7 Genen durchaus eine Rolle in der Tumorprogression zusprechen (Review Hodgson et al 2003). Unsere Stichprobe von 53 IDC besteht jedoch ausschließlich aus Tumoren, die histologisch dem Grad 2 zugeordnet wurden. Tanner M.M. et al. beschrieben 1995, dass die Amplifikation an 20q13 mit einem hohen histologischen Grad verknüpft ist. Studien an DCIS beschreiben ebenso, dass die Amplifikationsrate zunimmt, je höher der histologische Grad des Tumors ist (Glöckner S. et al. 2001). In weiteren Studien zeigten allerdings bereits intraduktale Hyperplasien, bei CGH-Untersuchungen, Amplifikationen der Region 20q13. Gleichzeitig wurde eine zunehmende Signalfrequenz der FISH von intraduktalen Hyperplasien über duktales Carcinomata in situ bis hin zu invasiv duktales Karzinomen beschrieben (Aubele M. et al. 2000; Werner et al 1999). Eine Amplifikation der Region 20q scheint also ein sehr frühes Ereignis in der Tumorentstehung zu sein, die im weiteren Verlauf der Tumorerkrankung in zunehmendem Maße auftritt. Ein Grund für die geringe Amplifikationsrate und deren geringe Ausprägung in unserer Arbeit könnte, also der einheitliche histologische Grad (G2) der Tumore sein. Andererseits wäre bei G2-Tumoren ein häufigeres Vorkommen dieser Amplifikation zu erwarten gewesen, wenn sie schon in intraduktalen Hyperplasien gefunden werden kann. Von Roylance R. et al. (2002) wurde die These aufgestellt, dass sich Tumore unterschiedlichen histologischen Grades auf verschiedenen genetischen Wegen entwickeln. Die Autoren stellten fest, dass eine 16q-Deletion in Grad 1 Mammatumoren in 65%, in Grad 3 Tumoren aber nur in 16% auftrat. Es könnte also die Möglichkeit bestehen, dass Grad 2 Tumore aufgrund ihres Entwicklungsweges weniger häufig eine 20q Amplifikation zeigen als Tumore der histologischen Grade 1 und 3. Man sollte auch die Frage stellen, ob die Region 20q13 tatsächlich eine so große Rolle in der Mammakarzinomentwicklung spielt. Tanner M.M. et al. (1994) fanden in ihrer Stichprobe von 36 Mammakarzinomen unterschiedlichen histologischen Grades, die sie mit FISH untersuchten, nur 3 (=8%) Fälle starker und 6 (17%) Fälle mit geringer Kopienzahlerhöhung der Region 20q13. Auch die Untersuchung von Forozaan et al. (2000) zeigte, wie oben schon erwähnt, dass nur 11 von 17 Studien einen DNA-Zugewinn an 20q13 aufwiesen, wohingegen die Region 1q zum Bsp. in allen 17 Studien einen DNA-Zugewinn lieferte. Die in unserer Arbeit am häufigsten aufgetretene Amplifikation betraf das Gen PTK6, es zeigte in 11 der 53 untersuchten IDC Fällen (20,8%) eine gering erhöhte Genkopienzahl, was vermuten lässt, dass dieses Gen eventuell eine Rolle in der Karzinogenese spielt. Bei Untersuchungen, die nur einen selektiven Anteil des Tumors verwenden -wie auch in unserer Studie- sollte auch immer die Tumorerheterogenität und

vor allem die intratumorale Heterogenität berücksichtigt werden (Aubele M. et al. 1999; Lehmann U. et al. 2000). Es können dadurch experimentelle Ergebnisse auftreten, die nicht unbedingt den gesamten Tumorverhältnissen entsprechen. In unserer Arbeit könnten überdurchschnittlich häufig Areale mikrodisssektiert worden sein, die die Amplifikation der Region 20q13 nicht aufzeigen. Obwohl wir ausschließlich Tumoreale mit 70-80% Tumorzellen aus mehreren Folgeschnitten verwendet haben, können wir nicht sicher sein, ob sich in anderen Tumorealen nicht ein anderes Bild der genetischen Veränderungen zeigen würde.

Durch methodische Untersuchungen versuchten wir zu klären, inwieweit die Vorbehandlung des Tumormaterials die Sensitivität der Real-Time-PCR beeinflusst. Möglich wäre, dass die Formalinfixierung und Paraffineinbettung der Tumore die Qualität der DNA so in Mitleidenschaft zieht, dass die Sensitivität der Real-Time Methode dadurch abnimmt (siehe Diskussionspunkt 5.2 S.75). Diese mangelnde Sensitivität könnte zumindest zum Teil die Ursache für die von uns sehr selten identifizierten DNA-Veränderungen sein.

Der statistische Vergleich der DNA-Ergebnisse mit klinischen und histopathologischen Parametern zeigte in unserer Arbeit keine signifikanten Zusammenhänge, was an der geringen Anzahl erhöhter Ergebnisse liegen könnte. Es wurden jedoch statistische Zusammenhänge beschrieben. So fanden z.B. Cingoz S. et al. (2003), dass die Amplifikation der Region 20q in Zusammenhang mit Estrogenrezeptor positiven Tumoren steht.

### **5.1.3 Expression der 8 untersuchten Gene**

Wie in einigen der Studien schon festgestellt wurde, konnten auch wir zeigen, dass einer vermehrten Amplifikation eines Gens nicht unmittelbar eine erhöhte Expression folgt und dass eine erhöhte Expression eines Gens nicht unbedingt auf einer Amplifikation beruht. Die Wege, wie es zu einer vermehrten Amplifikation bzw. Expression einzelner Gene kommt, sind noch wenig geklärt. In manchen Fällen zeichnet sich ein Zusammenhang zwischen Amplifikation und Expression, wie zum Beispiel beim Gen PTK6 in unserer Arbeit, oder auch bei Her2/neu (Slamon DJ et al. 1989) ab. Bei anderen, z.B. bei ADA, konnten wir nur eine erhöhte Expression, aber keine vermehrte Amplifikation finden. Bei AIB1 wurden erhöhte Expressionswerte gefunden, die aber selten mit einer erhöhten Amplifikation einhergehen (Anzick SL. et al 1997). Die intrazellulären Abläufe, was das Abschreiben der genetischen Information und deren Auswirkung auf die Zellabläufe betrifft, sind sehr komplex. Wie es zu Fehlern in diesen Abläufen kommt, ist Gegenstand der heutigen molekularbiologischen Forschung. In unserer Arbeit lieferte die Untersuchung der Expression der Gene mehr erhöhte Werte als die Untersuchung der Gene auf DNA Ebene. So zeigte sich bei der Durchführung der Real-Time PCR beim Gen PTK6 in 79,6% der 54 untersuchten IDC-Fälle eine erhöhte

Expression, beim Gen Her2/neu in 50%, bei ADA in 37%, bei BCAS1 in 11,1% und bei PTPN1 in 7,4%. ZNF217 war nur in einem Fall vermehrt exprimiert und AIB1 und PFDN4 zeigten in keinem der Fälle eine erhöhte Expression. Die in unserer Arbeit untersuchten Tumore wiesen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Collins et al. (2001) keine vermehrte Expression der Gene ZNF217 und PFDN4 auf, welche im Amplifikationsmaximum der Region 20q13.2 liegen.

Es wird vermutet, dass **ZNF217** (Zinkfingerprotein 217) für einen Transkriptionsfaktor codiert mit 8 C2H2 Kruppel-like DNA- Bindungsmotiven (Pieler T. et al. 1994) und einer prolinreichen Transkriptions-Aktivierungsdomäne. Kruppel-like Transkriptionsfaktoren wurden mit einigen menschlichen Tumoren in Verbindung gebracht, z.B. mit Leukämie, Lymphomen, Glioblastomen, Wilms Tumor und Magenkarzinom (Collins C. et al. 1998). Rooney PH et al. (2004) untersuchten 100 Kolonkazinome mit Real-Time PCR und fanden eine vermehrte Amplifikation bei 61 der untersuchten Fälle, 15 zeigten einen Verlust von ZNF 217. Veränderungen an diesem Gen gehen mit einer geringeren Überlebenszeit einher (Rooney PH et al. 2004). Auch beim Urothelkarzinom der Harnblase konnte eine vermehrte Genkopienanzahl von ZNF 217 mittels microarray-FISH gefunden werden (Toncheva D. et al. 2005). Dies untermauert den Verdacht, dass ZNF217 eine Rolle als Onkogen spielen könnte. ZNF 217 wurde außerdem für die Immortalisation von kultivierten humanen Mammaepithelzellen verantwortlich gemacht (Nonet et al. 2001). In unserer Arbeit zeigte sich allerdings nur in einem Fall eine erhöhte Expression, der aber keine Amplifikation zugrunde lag.

Das Gen **PFDN4** (Prefoldin 4) zeigte in keinem der von uns untersuchten Fälle eine erhöhte Expression. PFDN4 gehört zu einer Untergruppe der "heterohexameren chaperon protein prefoldin" Familie (Vainberg et al. 1998). Ihm wird entweder die Funktion eines Transkriptionsfaktors oder die eines Cofaktors in der Zellzyklusregulation zugeordnet, wodurch es durchaus in der Lage wäre, das Verhalten von Zellen dahingehend zu beeinflussen, dass sich Wachstumsgeschwindigkeit und Vermehrung der Zellen verändern. Dass diese beiden Gene keine signifikanten Ergebnisse lieferten, könnte wie auch unter Punkt 5.1.2 beschrieben an unserer Auswahl von ausschließlich Grad 2 Tumoren liegen, so dass hier die genetischen Veränderungen in den Zellen noch nicht so stark nachweisbar sind wie zum Bsp. in Tumorzellen, die schon den histologischen Grad 3 erreicht haben und eine höhere Mitoserate, Kernpolymorphie und Tubulusausbildung zeigen.

Das Gen **AIB1** (Amplified in Breast Cancer 1) zeigte in unserer Arbeit in keinem der 54 IDC-Fälle eine erhöhte Expression, aber in zwei Fällen (3,8%; 2,1-3,1-fach) eine leicht erhöhte DNA-Kopienzahl. Anzick et al. (1997) fanden eine erhöhte Expression in 60% der von ihnen untersuchten Mammakarzinome, wobei 10% gleichzeitig eine Amplifikation aufwiesen. Bautista S. et al (1998) fanden in 1157 untersuchten Mammakarzinomen in 4,8% der Fälle eine vermehrte

Amplifikation (2-8-fach mit Southern Blot) von AIB1. Die Expressionsdaten wurden in ihrer Arbeit nicht bestimmt, eine statistische Korrelation ergab sich für die Amplifikation von AIB1 und dem positiven Hormonrezeptorstatus von Estrogen und Progesteron sowie der Tumorgröße (> 2cm). Trotz dieser Korrelation wurde auch eine Amplifikation des Gens AIB1 in 2% der Hormonrezeptor negativen Mammatumore gefunden. Moderate bis hohe Expressionslevel erwiesen sich in 26 von 83 (31%) invasiven Mammakarzinomen, die Bouras T. et al. (2001) untersuchten, außerdem konnten sie einen Zusammenhang zwischen hoher Expression von AIB1 und einem hohen Tumorgrad sowie auch einem hohen histologischen Grad feststellen (63% der Grad 3 Tumore, 18% der Grad 2 Tumore und 20% der Grad 1 Tumore). Erhöhte Expressionslevel zeigten sich auch in DCIS und in Metastasen (Bouras T. et al. 2001). Leicht erhöhte Expression bei RNA in situ Hybridisierung bzw. immunhistochemischer Färbung von AIB1 zeigte sich auch in dem den Tumor umgebenden normalen bzw. morphologisch unauffälligen Brustdrüsengewebe (Bouras T. et al. 2001, List H.J. et al. 2001). Bouras T. et al. (2001) konnten desweiteren einen statistischen Zusammenhang zwischen hoher AIB1-Expression mittels RNA in situ Hybridisierung und negativer Immunhistochemie der Progesteron- und Estrogenrezeptoren sowie starker IHC- Färbung für Her2/neu feststellen. In einer Studie von Zhao Ch. et al. (2003) zeigte AIB1 in 12 von 38 (32%) untersuchten Tumoren eine hohe Expression und in 26 der 38 (68%) Mammakarzinome eine gering erhöhte Expression. Bei ihrer statistischen Auswertung korrelierte die erhöhte Expression von AIB1 mit einer kürzeren rezidivfreien und gesamten Überlebenszeit der Patientinnen, aber nicht mit positivem oder negativem Hormonrezeptorstatus von Estrogen und Progesteron (Zhao Ch. et al. 2003). Aufgrund ihrer Ergebnisse stuften sie AIB1 als einen unabhängigen prognostischen Faktor ein, der bei Überexpression eine schlechte Prognose vorhersagen kann. Sakakura et al (2000) kamen bei ihrer Untersuchung von 72 Magenkarzinomen (40% zeigten eine AIB1 Überexpression) ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine Überexpression von AIB1 mit einer schlechten Prognose einhergeht. Dies trifft auch auf Ovarialkarzinome zu (Tanner M.M. et al. 2000) sowie auf Prostatakarzinome, bei welchen eine kürzere Überlebenszeit bei Überexpression von AIB1 statistisch festzustellen war (Gnanapragasam VJ. et al. 2001). Auch beim Kolorektalenkarzinom wurde in 35% der 85 untersuchten Fälle eine vermehrte Expression gefunden vorallem in höheren klinischen Stadien (T3), 10% wiesen eine vermehrte Amplifikation auf (Xie D. et al. 2005). Zeigte sich bei der Einstufung von AIB1 Überexpression als prognostischen Faktor eine weitgehende Übereinstimmung, so gingen die Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen AIB1 Überexpression und dem Hormonrezeptorstatus eher auseinander. Eine Arbeit von Louie MC. et al. (Juni 2004) zeigte, dass AIB1, welches zur Familie der p160 SCR-1 Koaktivatoren der intrazellulären Rezeptoren gehört und ein Koaktivator des Estrogenrezeptors (ER) ist (Anzick et

al. 1997, McKenna et al 1999), neben estrogenabhängiger auch für die hormonunabhängige Proliferation der Mammakarzinomzellen verantwortlich ist. Sie fanden auch, dass eine Überexpression von AIB1 ER-positive Tumorzellen resistent gegen Antiestrogene macht, da eine Überexpression von AIB1 den Wiedereintritt in den Zellzyklus (G1 → S-Phase) induziert. AIB1 interagiert mit E2F1 (Zellzyklusregulator), welcher wiederum selektiv E2F1 empfindliche Gene induziert, die entscheidend für den Übergang der Zellen von der G1 in die S-Phase sind. Louie MC. et al (2004) kommen zu dem Ergebnis, dass die Überexpression von AIB1 die estrogenabhängige Zellproliferation erleichtert und vor allem die hormonunabhängige Zellproliferation über eine Interaktion mit dem Zellzyklusregulator E2F1 fördert. Dieses Ergebnis könnte ein Grund für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Korrelation von AIB1-Überexpression und dem Estrogenrezeptorstatus sein. In welchem Zusammenhang der Progesteronrezeptor mit einer erhöhten Expression von AIB1 steht, bleibt noch offen. Sarvilinna N. et al. (2005) fanden die Expression des Progesteronrezeptors herunterreguliert bei gleichzeitiger Überexpression von AIB 1. Als eindeutig kann die schlechte Prognose, der Einfluß des Gens auf die Regulation des Zellzyklus sowie sein Einfluß auf die weibliche Entwicklung in der Pubertät (Xu J. et al 2000) betrachtet werden. Daß eine AIB1-Überexpression für die Resistenz der Mammatumore gegenüber Antiestrogenen wie z.B. Tamoxifen verantwortlich sein könnte, korreliert mit den Ergebnissen von Osborn CK. et al. (2003a). Die Autoren haben den Expressionsstatus von 316 Tumoren und die Nachuntersuchungen der Patientinnen ausgewertet und herausgefunden, dass bei hoher AIB1 Überexpression die Patientinnen ohne Tamoxifen-Therapie eine längere Überlebenszeit hatten als die Patientinnen mit Tamoxifen-Therapie. Eine erhöhte AIB1-Expression in ER-positiven Tumoren macht die Wirkung der Antiestrogene zunichte, indem die hormonunabhängige Zellproliferation durch AIB1 stimuliert wird (Louis MC. et al. 2004). Iwase H. et al. (2003) stellten wiederum in ihrer Untersuchung von 5 Frauen, deren Tumore eine AIB1 positive Immunhistochemie aufwiesen, fest, dass diese besser auf eine Hormontherapie ansprachen (4 von 5 mit AIB1 positiver IHC) als 21 Frauen, deren Tumore eine negative IHC aufwiesen (4 von 16). Mittlerweile wird auch diskutiert, ob die AIB1 und Her2/neu Signalwege gemeinsam für die Tamoxifenresistenz verantwortlich sein könnten (Osborne KC et al. 2003b), da Patientinnen mit Überexpression beider Gene (AIB1 und Her2/neu) unter Tamoxifen-Therapie die schlechteste Prognose von allen Tamoxifen behandelten Patientinnen haben. Die vielen unterschiedlichen und sich zum Teil auch widersprechenden Ergebnisse zeigen, dass dieses Forschungsgebiet noch jung ist und viele Gruppen daran arbeiten, die offenen Fragen zu beantworten. Die Diskrepanz spiegelt sich auch in unseren Ergebnissen wieder, da in keinem unserer Fälle AIB1 vermehrt exprimiert ist, was den oben erwähnten Ergebnissen zum Teil widerspricht. Erklären lässt sich dies eventuell durch die unterschiedlichen Techniken, die

zur Untersuchung der Überexpression des Gens AIB1 verwendet wurden: Anzick et al. wendeten FISH an, Bouras T. et al. benutzten tissue-arrays für die RNA in situ Hybridisierung, Bautista S. et al. untersuchten mit Southern-Blot und in unserer Arbeit wurde mit Real-Time-PCR gearbeitet. Da die Real-Time-PCR als sehr sensitiv gilt (Lehmann U. et al 2000) und in der Immunhistochemie schon in morphologisch unauffälligem Gewebe erhöhte AIB1 Konzentrationen gefunden wurden (List H.J. et al. 2001), hätten wir bei vorliegender Überexpression in unseren Tumoren auch erhöhte Expression mit der Real-Time-PCR finden müssen. Da jedoch alle von uns untersuchten Mammatumore keine AIB1 Überexpression zeigen, wäre denkbar, dass wir durch die kleine Stichprobe von 54 Tumoren zufällig nur AIB1-negative Tumoren selektiert haben. Ebenfalls wäre denkbar, dass wir durch unsere Ausschließlichkeit an G2-Tumoren eine Gruppe untersucht haben, die aufgrund des histologischen Grades noch keine Überexpression des Gens AIB1 zeigt, da wie von Bautista et al. gefunden, die Häufigkeit der Überexpression mit höherem Tumorgrad zunimmt. Zusammenfassend kann man die Vermutung äußern, dass aufgrund der Unterschiede in der Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials (tiefgefroren oder formalinfixiert und in Paraffin eingebettet), der unterschiedlichen histopathologischen und klinischen Morphologie der Tumore in den einzelnen Studien sowie der unterschiedlichen Methoden zur Untersuchung des Materials (FISH, Immunhistochemie, PCR, Souther-Blot, Western-Blot etc.), der unterschiedlichen statistischen Auswertungen und der relativ kleinen Stichproben immer wieder widersprüchliche Ergebnisse auftreten werden.

**PTPN1** (Protein-Tyrosine Phosphatase, Nonreceptor-Type 1) zeigte in unserer Arbeit in vier Fällen eine erhöhte Expression, die in zwei Fällen über 5-fach relativ zum Referenzgen TBP lag. Der erhöhten Expression lag in keinem Fall eine Amplifikation zugrunde. Das Gen liegt im Bereich der mittels CGH festgestellten hohen Amplifikation auf Chromosom 20q13.1 bis 20q13.2, die bei Mammakarzinomen und Ovarialkarzinomen gefunden wurde (Tanner M.M. et al. 1996, 2000). In beiden Karzinomen fanden sich auch erhöhte Proteinexpressionswerte für dieses Gen, die mit Immunhistochemie bestimmt wurden. Statistisch stellte sich eine Korrelation der PTPN1 Überexpression mit dem Vorhandensein von Mammakarzinomen, ebenso zwischen der Überexpression von PTPN1 und Her2/neu heraus (Wiener J.R. et al 1994a/b). Dieser Zusammenhang wurde in unserer statistischen Auswertung nicht gefunden. Im Barrett-Ösophaguskarzinom konnte mittels array-CGH eine vermehrte Amplifikation von PTPN1 in 33% der 23 untersuchten Tumore gefunden werden (Albrecht B. et al 2004). Auch beim Magenkarzinom zeigte sich eine Amplifikation von PTPN1 (Yang SH et al. 2005). PTPN1 ist eine nicht rezeptorgebundene Protein-Tyrosin-Phosphatase, die in die Wachstumsregulation der Zellen über insulinrezeptorabhängige Signaltransduktion eingreift (Hashimoto N. et al. 1992) und dadurch wahrscheinlich auch die Proliferation von Tumorzellen beeinflusst. PTPN1 ist in

der Zelle am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Jones ML et al. 2004) und wirkt in Mammakarzinom-Zelllinien auf die Dephosphorylierung der c-SRC-Kinase, die in einigen Tumorentitäten erhöht ist (Bjorge JD et al. 2000). SCR-Kinasen sind ebenfalls nicht rezeptorgebundene Protein-Tyrosin-Kinasen, die Einfluß auf unterschiedliche Signaltransduktionswege nehmen; sie spielen eine Rolle bei Zellwachstum, -migration, -adhäsion, bei der Apoptose und der Angiogenese (Summy JM u. Gallick GE. 2003; Russello SVu. Schore SK 2004). Welche weiteren Konsequenzen sich aus der Überexpression von PTPN1 bei Mammakarzinomen ergeben, bedarf noch weiterer Studien.

In sechs Fällen lieferte das Gen **BCAS1** (Breast carcinoma amplified sequence 1) eine erhöhte Expression, der nur in einem Fall auch eine erhöhte DNA-Kopienzahl zugrunde lag. BCAS1 ist ein Protein, welches aus 585 Aminosäuren besteht. Es wurde vermutet, dass es als Onkogen fungiert, da es in drei Mammakarzinom-Zelllinien vermehrt exprimiert wird, in denen es auch amplifiziert ist (SKBR3, BT474, MDA436). In der Zelllinie MCF7 war es amplifiziert, aber nicht überexprimiert (Collins C. et al. 1998). Der von Zhao et al. (2003) gefundene Zusammenhang von BCAS1 Überexpression in Mammakarzinomen und einem positiven Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus konnte in unserer statistischen Auswertung nicht bestätigt werden. Beardsley D.I. et al (2003) fanden heraus, dass BCAS1 für ein Protein mit einer Größe von 61,7 kDA kodiert und bei Überexpression in den Mammakarzinomzellen in einer homodimerisierten Form akkumuliert, wodurch es eventuell eine maligne Entartung der Zellen fördert. Sie konnten keinen Einfluß von BCAS1 Überexpression auf die zelluläre Transformation feststellen und kommen zu der Ansicht, dass BCAS1 vermutlich kein typisches Onkogen ist, sondern eher zusammen mit ZNF217, welches im Genom in der Nähe von BCAS1 lokalisiert ist, auf die Entstehung von Brustkrebs Einfluß nehmen könnte. Die genaue Funktion konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Correa R.G. et al. (2000) fanden eine neue "splicing Variante", die sie NABC1\_5B nannten. Diese Variante ist überexprimiert in Mammakarzinomen und herunterreguliert in Kolontumoren. Dies führten die Autoren auf die sehr instabile genomische Region zurück, in der sich das Gen befindet. Sie weist ein sehr komplexes Veränderungsmuster auf. Die Autoren sind sich einig, dass es noch weiterer Forschung bedarf, um das Gen BCAS1 und dessen Funktion genauer aufzuklären.

**ADA** (Adenosine deaminase) war in 20 unserer IDC (37%) vermehrt exprimiert, wobei nur ein Fall auch eine gering erhöhte Gen-Kopienzahl aufwies. Erhöhte Serumlevels von ADA, die nach Mastektomie signifikant sanken, wurden bei 25 Mammakarzinompatientinnen festgestellt (Walia M. et al 1995). Auch in Mammakarzinomzellen wurde eine höhere Aktivität der ADA gefunden im Vergleich zu nicht kanzerogenen Zellen (Canbolat O. et al. 1996). ADA reguliert den zellulären Level von Adenosin und Deoxyadenosin. 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) induziert die

Expression der mRNA von ADA in der MCF7-Zelllinie. Auch IGF-I induziert die Expression von ADA, allerdings über den Estrogenrezeptor alpha, durch den der MAPK (mitogen-aktiviertes Protein kinase)-Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Xie W. et al. 1999 u. 2001).

**Her2/neu** auf Chromosom 17q12 ist das Gen, über welches in den letzten Jahren am meisten geforscht und berichtet wurde. Es kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die in ca. 30% der Mammakarzinome vermehrt amplifiziert bzw. überexprimiert ist (Slamon D.J. et al. 1987 u. 1989). In unserer Arbeit zeigten 50% der Fälle (n = 27) eine erhöhte Expression und 5,7% (n = 3) eine gering erhöhte DNA-Kopienzahl, die in zwei Fällen auch einer erhöhten Expression zugrunde lag. Dies widerspricht den bisher gefundenen Ergebnissen, dass eine erhöhte Expression meist mit einer vermehrten Amplifikation oder Polysomie des Chromosoms 17 einhergeht (Slamon D.J. et al. 1989, Szollosi J. et al. 1995). Dieser Widerspruch könnte an der von uns angewandten Methode zur Quantifizierung des Genkopienstatus liegen, da wir feststellten, dass in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Zelllinien die Real-Time-PCR auf DNA-Ebene weniger sensitiv zu sein scheint als in tiefgefrorenen Zellen. Auf RNA-Ebene konnten wir diesen Verlust der Sensitivität nicht feststellen (siehe Punkt 5.2.2 S.77). Eine andere mögliche Erklärung wären die Ergebnisse von Bofin A.M. et al (2004), die 49 Mammatumore mit FISH auf DNA-Ebene und mit immunhistochemischer Färbung (IHC) auf Proteinexpression untersuchten. Es zeigte sich, dass ein Verhältnis der FISH-Signale (Zentromer : Her2/neu-Locus) von 2,5 mit einem IHC 3+ korreliert, aber einem IHC von 1+ und 2+ nicht unbedingt eine Amplifikation zugrunde liegt. Dies könnte eine Erklärung für unseren geringen Zusammenhang zwischen Überexpression und Amplifikation sein, da die meisten unserer Expressionswerte (23 von 27) in einem Bereich von 2- bis 6-facher Überexpression relativ zum Referenzgen TBP, also auf nicht sehr hohem Expressionsniveau, liegen. Eine erhöhte Expression des Gens Her2/neu geht mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf ( Slamon D.J. et al. 1987), einer Herunterregulierung des Hormonrezeptorstatus (Konecny G. et al. 2003) und in frühen Tumorstadien mit einer Resistenz gegenüber einer Tamoxifen-Therapie einher (Carlomagno C. et al. 1996). Neben Mammakarzinomen ist HER2/neu auch in Cervix-, Kolon-, Endometrium-, Ösophagus-, Lungen- und Pankreastumoren vermehrt exprimiert (Salomon D.S. et al. 1995). Die prognostische Relevanz einer Her2/neu-Überexpression ist allerdings noch nicht endgültig geklärt, obwohl in den letzten 15 Jahren über 200 Berichte über das Gen Her2/neu bei Mammakarzinomen veröffentlicht wurden (Yamauchi H. et al. 2001). Wie oben erwähnt, wird ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu (Trastuzumab = Herceptin®) in klinischen Studien eingesetzt. Er wird bei metastasierenden Mammakarzinomen, die das Gen Her2/neu überexprimieren, verabreicht. Über die molekularbiologische Struktur und die Signaltransduktion, in die der Tyrosinkinasen-Rezeptor

p185-Her2/neu einbezogen ist, ist schon einiges bekannt. So weiß man, dass es ein Transmembranrezeptor ist, der in die Familie der EGF-Rezeptoren (Epidermal growth faktor rezeptor) gehört. Er bildet Heterodimere mit anderen EGF-Rezeptormitgliedern, an die dann Wachstumsfaktoren binden (Roskoski Robert Jr. 2004). In unserer Untersuchung korrelierte die erhöhte Expression von HER2/neu mit der erhöhten Expression der Tyrosinkinase PTK6.

**PTK6** (Protein-Tyrosin-Kinase 6) zeigte in unserer Untersuchung in den meisten Fällen (79,6%) eine erhöhte Expression, wobei in 10 Fällen eine gering erhöhte Genkopienzahl zugrunde lag. In den restlichen 32 Fällen lag der erhöhten Expression keine Amplifikation zugrunde. Bezüglich des Gens PTK6 konnten wir die Ergebnisse von Barker K.T. et al (1997) bestätigen. Sie hatten in zwei Drittel der Tumore eine erhöhte Expression von PTK6 gefunden, 27% ihrer Fälle zeigten bei der Untersuchung mit Western-Blot eine 5-fache bis 43-fache Proteinexpression. In unserer Arbeit lag der höchste Wert bei 22-fach relativ zum Referenzgen TBP. Protein-Tyrosin-Kinasen spielen eine wichtige Rolle als Regulatoren der zellulären Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Überaktivität der PTKs kommt in der Tumorentwicklung meist durch Mutation, Rearrangement oder Genamplifikation zustande (Kolibaba K.S, Druker B.J 1997). Die PTK6 ist eine nicht rezeptorgebundene Tyrosin-Kinase, die auf einem partiellen cDNA-Klon bei der Untersuchung von mRNAs von Melanocyten gefunden wurde (Lee S.T. et al. 1993). 1994 wurde sie von Mitchell et al. auch in metastasierenden Mammatumoren entdeckt. Sie wirkt auf die Brustdrüsenepithelzellen, indem sie deren Empfindlichkeit für EGF (Epidermal growth faktor) und damit die Proliferation der Zellen erhöht (Kamalati T. et al. 1996). Dies impliziert, dass PTK6 als Wachstumsregulator eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielt, denn die Aktivität der Protein-Tyrosin-Kinasen - im Zytosol und in der Zellmembran - ist bei den meisten malignen Mammadrüsen Geweben höher als in morphologisch unauffälligem Brustdrüsen Gewebe (Hennipman A. et al. 1989). Eine erhöhte zytosolische Konzentration der Protein-Tyrosin-Kinasen scheint mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben einherzugehen. Aus diesem Grund wurde den PTKs eine Rolle als prognostische Faktoren zugeschrieben (Bolla M. et al. 1993). Neuere Arbeiten belegen die Rolle der PTK6 bei der Proliferation von Mammakarzinomzellen (Harvey et al. 2003). Zhao et al. (2003) konnten kürzlich eine statistische Korrelation von PTK6 mit positivem Estrogenrezeptorstatus und Postmenopausenstatus beim Mammakarzinom finden, was in unserer Arbeit aber nicht reproduziert werden konnte. Dies mag durch die Untersuchung unterschiedlicher Kohorten bedingt sein. Zhao et. al. verwendeten überwiegend Lymphknoten positive pT2 Tumore, die zu 50% Hormonrezeptor positiv waren. In unserer Arbeit untersuchten wir überwiegend Hormonrezeptor positive pT1 Tumore, die zu 50% einen negativen Lymphknotenstatus aufwiesen. In welche Signaltransduktionswege die Protein-Tyrosin-Kinase

genau einbezogen ist, ist noch nicht endgültig gesichert und deshalb Gegenstand der momentanen Forschung. Könnte diese Frage geklärt werden, hätte man eventuell einen neuen therapeutischen Angriffspunkt, um der Proliferation von PTK6 überexprimierenden Mammakarzinomzellen Einhalt zu gebieten, indem auch hier mit Antikörpern gezielt Rezeptoren blockiert werden könnten. Desweiteren wäre von größtem Interesse, inwieweit der statistische Zusammenhang von PTK6 und Her2/neu auch biologisch begründet werden kann.

#### **5.1.4 Assoziation PTK6 und Her2/neu**

Wie schon erwähnt, fanden wir einen statistisch signifikanten Zusammenhang der beiden Gene PTK6 und Her2/neu auf DNA-Ebene sowie auch auf RNA-Ebene. Beide gehören zu zwei unterschiedlichen Familien der großen Gruppe der Tyrosin-Kinasen. Mehrere Tyrosin-Kinasen spielen eine Rolle bei der Zellproliferation, -migration und -differenzierung. Bei der Entstehung von Karzinomen nehmen sie Einfluss auf das Zellwachstum und die Progression der Tumore (Review Kolibaba K.S. u. Druker B.J. 1997; Yarden Y. 2001). Her2/neu, eine Rezeptor Tyrosin-Kinase, die in der Zellmembran lokalisiert ist, liegt als Monomer vor. Der Rezeptor dimerisiert mit einem der drei anderen Rezeptoren der selben Familie (Her1, 3 und 4), wenn ein Ligand bindet. Bevorzugt dimerisiert Her2/neu jedoch mit Her3 (Tzahar E. et al. 1996). Es konnte eine Korrelation der Überexpression von Her2/neu und Her3 festgestellt werden (Holbro T. et al. 2002). Her3 wird in Her2/neu überexprimierenden Tumorzellen benötigt, um die weitere Proliferation der Zellen aufrechtzuerhalten. (Holbro T. et al. 2002). Eine Überexpression von Her2/neu aktiviert den PI3K/Akt Signalweg, der die Zellproliferation fördert, indem er die Apoptose der Zellen verhindert. Dieser Signalweg ist normalerweise verknüpft mit dem Signal für Mitose, welches den MAPK-Signalweg (Mitogen-Activatet-Protein-Kinase) benötigt (Review Zhou B.P. u. Hung M.C. 2003; Ménard S. et al 2003). Kamalati T et al. (1996) fanden neben der höheren Sensitivität der Brustdrüsenepithelzellen gegenüber EGF bei Überexpression von PTK6 auch einen direkten Einfluß des Gens auf den EGF-Rezeptor. Mammakarzinom Zelllinien, die eine erhöhte Expression von PTK6 aufweisen, fördern über die Aktivierung von Her3 den Signalweg von EGF zur Phosphoinositol 3-Kinase (PI3-Kinase), die wiederum eine Phosphorylierung von Akt, einer Serin/Threonin Kinase, bewirkt (Kamalati T et al. 2000). Akt scheint ein Kreuzungspunkt unterschiedlicher Signalwege zu sein. Es agiert als ein Umwandler von Informationen, die von den Wachstumsfaktoren kommen, welche die PI 3-Kinase aktivieren (Kandel E.S. u. Hay N. 1999). Wird PTK6 mit interference RNA in Mammakarzinom Zelllinien herunterreguliert, so resultiert eine signifikante Reduktion der Proliferation (Harvey A.J. et al. 2003). Dies legt nahe, dass PTK6 eine wichtige Rolle im mitogenen Signalweg einnimmt.

Welche weiteren Konsequenzen für die Entstehung und weitere Entwicklung von Mammakarzinomen sich daraus ergeben, ist noch nicht ganz geklärt. Es bedarf noch weiterer Nachforschungen, die an die bisher gefundenen Ergebnisse anknüpfen, um die molekularbiologischen Abläufe und Zusammenhänge in den Tumorzellen noch genauer verstehen zu können.

## **5.2 Sensitivität der Real-Time PCR**

### **5.2.1 Bestimmung der Genkopienzahl**

Da in unserer Arbeit bei der Untersuchung der DNA mit Real-Time PCR deutlich weniger erhöhte Werte als erwartet gemessen wurden, haben wir mit den Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und MCF7 herauszufinden versucht, ob aus unterschiedlicher Vorbehandlung der Zellen - tiefgefroren oder formalinfixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) - auch unterschiedliche TaqMan-Ergebnisse resultieren. Die 8 Gene wurden in jeweils zwei getrennten Läufen zweimal an den Zelllinien bestimmt und anschließend mit dem paarweisen T-Test statistisch ausgewertet. Dabei wurde auf DNA-Ebene für beide Zelllinien ein p-Wert  $< 0,05$  ermittelt, was bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der unterschiedlich vorbehandelten Zellen besteht. Es scheint also, dass die Real-Time PCR auf DNA-Ebene bei FFPE Gewebe weniger sensitiv ist, was unsere wenigen erhöhten DNA-Werte bei den Primärtumoren erklären kann. Lehmann U. et al. (2000) fanden bei ihrem Vergleich von tiefgefrorenem und FFPE Mammakarzinomgewebe bei 4 von 5 Fällen keine signifikanten Unterschiede ihrer Ergebnisse. Ein Fall zeigte beim tiefgefrorenen Material schwächere Werte als beim FFPE Gewebe. Sie untersuchten zwei Gene, ebenfalls Her2/neu und Topoisomerase II $\alpha$  auf DNA-Ebene bezüglich des Amplifikationsstatus. Sie fanden allerdings auch, dass bei nicht vorbehandelten Zelllinien 5 Zellen pro Reaktion ausreichen, bei FFPE-Gewebe ca. 50 Zellen benötigt werden, um verwertbare TaqMan-Ergebnisse zu erhalten. In unserer Studie wurde die Spezifität der Primer und Sonden mittels Sequenzierung überprüft und bestätigt. Der Anteil der Tumorzellen im Gewebe (70-80%) dürfte ausreichend gewesen sein, da Lehmann U. et al. (2000) eine Amplifikation erst nicht mehr detektieren konnten, wenn der Tumorzellanteil unter 30% lag. Der Verdau der DNA wurde mit der in der Literatur veröffentlichten Methoden verglichen. Unterschiede konnten in der Konzentration der Proteinase K und der Temperatur des Verdaus festgestellt werden, allerdings dürften diese Unterschiede keinen wesentlichen Einfluß auf die Ergebnisse der Real-Time-PCR gehabt haben. Lehmann U. et al. (2000 + 2001), die einige Studien zum Thema Real-Time PCR an DNA veröffentlicht haben, verdauten ihre DNA über

Nacht bei 40°C in 30-50µl Puffer, der eine Konzentration von 10µg/ml bzw. 100µg/ml Proteinase K enthielt (Menge an Zellen unklar, Laser Microbeam). Unsere DNA wurde mit dem DNA Microkit der Firma Quiagen verdaut und gereinigt. Wir verwendeten laut Protokoll 10µl (entspricht 200µg) Proteinase K (20mg/ml laut Qiagen) in 15µl Puffer und verdauten über Nacht bei 56°C. De Preter et al. (2002) verwendeten einen DNA-Kit von Invitrogen. Bei Glöckner S. et al. (2000) konnten keine Angaben zur Konzentration der Proteinase K gefunden werden, sie konnten aber in 21 von 83 (25%) FFPE DCIS eine Amplifikation des Gens Her2/neu mit Real-Time PCR detektieren, und eine signifikant erhöhte Genkopienanzahl finden (6 Fälle 2-5 fach, 11 Fälle 5-10 fach, 4 Fälle >25 fach relativ zum Gen app). 20 der Fälle mit erhöhter Amplifikation wurden in den hohen histologischen Grad (Van Nuys 3) eingeteilt, so dass hier eventuell auch die vermehrt auftretende Amplifikation mit dem hohen histologischen Grad korreliert, wie zum Beispiel beim Gen AIB bei IDCs (Bouras T. et al. 2001). Dass die Formalinfixierung die Nukleinsäuren fragmentiert, ist mehrfach beschrieben worden (Godfrey T.I. et al. 2000; Review Lehmann U. u. Kreipe H. 2001). Es entstehen DNA-Fragmente mit einer Größe von 300 bis 400 bp und RNA-Fragmente von ca. 200 bp, deshalb müssen bei der Real-Time PCR die Amplifikate so klein wie möglich gewählt werden, um die Effizienz zu gewährleisten (Review Lehmann U. u. Kreipe H. 2001). Durch eine Formalinfixierung länger als eine Woche werden die Nukleinsäuren allerdings so stark fragmentiert, dass das Gewebe dann nicht mehr für die Real-Time PCR verwendet werden kann. Im Routinelabor wird normalerweise 24 h bei 4°C in 3,7%iger Formalinlösung fixiert. Diesen Ergebnissen zufolge dürfte eigentlich kein Sensitivitätsverlust der Real-Time-PCR bei FFPE-Gewebe vorliegen, da die durch die Formalinfixierung entstehenden Fragmente, anscheinend noch groß genug sind, um mit klein gewählten Amplifikaten (um die 100 bp) das gewünschte Gen zu detektieren. Dennoch könnte die Möglichkeit bestehen, dass das Formalin außer der Fragmentierung der DNA noch weitere Veränderungen an den Nukleinsäuren, vor allem an der DNA, bewirkt, die die Sensitivität der Real-Time-PCR herabsetzen. So entstehen Querverbindungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen, bei der RNA werden mono-methylol-Gruppen an die Basen der Nukleinsäurekette angehängt (Masuda N et al. 1999). Um unser Ergebnis zu verifizieren, müsste man eine größere Kohorte von FFPE-Gewebe und tiefgefrorenem Gewebe auf DNA-Ebene mit Real-Time PCR untersuchen, denn Zelllinien repräsentieren nicht uneingeschränkt die tatsächlichen Verhältnisse in Tumoren (Review Lacroix M. und Leclercq G. 2004). Sie zeigen Unterschiede im genetischen Profil gegenüber Tumoren und im Durchschnitt eine 2,5-fach höhere Veränderung der DNA-Menge (ca. 19/Zelllinie) als das Gewebe aus Tumoren (7,8/Tumor) (Forozan et al. 2000). Die Sensitivität der Real-Time-PCR ist so hoch, dass De Preter K. et al (2002) bei ihrer Untersuchung von Neuroblastomgewebe zweier Patienten in einem Fall eine Deletion und im

zweiten eine Duplikation des Chromosoms 2p detektieren konnten, was sie auch in der Zelllinie SJNB-1 bestätigen konnten. Lehmann U. et al. 2000 konnten in hoch gereinigter DNA zwei bis vier Genkopien bestimmen, was einem oder zwei euploiden Zellen entspricht.

### **5.2.2 Expressionsbestimmung**

Im Widerspruch zu unseren Ergebnissen stehen die Untersuchungen von Mizuno T. et al. (1998), die berichteten, dass RNA einer stärkeren Degradierung bis zur vollständigen Fixierung des Gewebes unterworfen ist als DNA. So müsste sich also eher auf Seiten der Expressionsanalyse an FFPE-Gewebe ein Sensitivitätsverlust zeigen. Es zeigte sich auch auf RNA-Ebene ein Unterschied in der Menge der im Minimum benötigten Zellen um verwertbare Real-Time-PCR Ergebnisse zu erhalten. Reichten bei tiefgefrorenem Material nur 10-15 Zellen aus (Fink et al. 1998), um ein ausreichendes Fluoreszenzsignal zu detektieren, wurden bei FFPE Gewebe hingegen 50 Zellen benötigt, um ein entsprechendes Ergebnis zu erhalten (Specht et al. 2001). Diese Autoren konnten bei ihrem Vergleich von FFPE und tiefgefrorenem Xenograft von menschlichem Kolonadenokarziom aus Mäusen und der epidermoid Zelllinie A431 auf RNA-Ebene keinen Sensitivitätsverlust der Real-Time-PCR feststellen. Dieses Ergebnis konnten wir mit unseren Mammakarzinom-Zelllinie BT474 und MCF7 auf RNA-Ebene bestätigen.

### **5.2.3 Problematik der Schwellendefinition**

Die Schwellenwerte, über welchen Real-Time-PCR Werte als amplifiziert bzw. überexprimiert gelten, wurden anhand von morphologisch unauffälligen Mammageweben festgelegt (DNA: n = 4; RNA: n = 3). An diesem Gewebe wurden alle acht Gene bestimmt, der Mittelwert aus der relativen Genkopienzahl bzw. Expression berechnet, und die Standardabweichung einmal zum Mittelwert addiert. Auf diese Weise legten wir die Schwelle für DNA-Amplifikation bzw. RNA-Überexpression beim Wert 2 fest. Den Ergebnissen von De Preter et al. (2002) zufolge entspricht ein Real-Time-PCR Wert von 2 der Verdopplung des Gens. In unserer Arbeit stellt sich die Frage, ob unsere auf diese Weise ermittelte Schwelle mit dem Wert 2, die nur einmal die Standardabweichung beinhaltet, vorallem bei der Expressionsuntersuchung, zu niedrig gewählt ist, da wir eine Überexpression des Gens Her2/neu in 50% unserer Fälle fanden. In der Literatur wurde bisher eine Überexpression des Gens mit einer Häufigkeit von 25-30% der Mammatumore beschrieben (Slamon DJ. et al., Glöckner S. et al. 2000). Es stellt sich die Frage, warum in unserer Kohorte 20% mehr Fälle mit einer Überexpression des Gens gefunden wurden. Eventuell könnte dies an unserer Schwelle liegen. Betrachtet man die Literatur zur Auswertung

der Real-Time-PCR, zeigt sich, dass die Auswertungen unterschiedlich vorgenommen werden. Lehmann U. et al. (2000 u. 2001) und Glöckner S. et al. (2001), die ebenfalls DNA für die Real-Time PCR verwendeten, werteten ihre Ergebnisse mit der vergleichenden  $C_T$ -Methode, wie mit der Standardkurven-Methode aus. Desweiteren verglichen sie den  $C_T$ -Werte des Tumors mit dem  $C_T$ -Wert des morphologisch unauffälligen Gewebes aus demselben Fall. War dies nicht möglich, setzten sie den Mittelwert aus 60, morphologisch unauffälligen Mammaepithelgeweben ( $MW+STD+1$ ) ein (Glöckner S. et al. 2001). De Preter et al. (2002) berechneten ebenfalls aus 24 unterschiedlichen Leukozytenproben den DNA Mittelwert für das zu untersuchende Gen MYCN und addierten einmal die Standardabweichung. Bei der Auswertung der RNA-Untersuchungen verglichen Specht K. et al. (2001) das relative Expressionniveau des Tumorgewebes mit dem relativen Expressionniveau des umgebenden, unauffälligen Gewebes und addierten jeweils einmal den SEM (Standarderror of the mean). Rosivatz et al. 2002 verglichen bei ihrer RNA-Untersuchung ebenfalls Tumorgewebe mit Normalgewebe aus demselben Fall und betrachteten Expressionsunterschiede von größer oder kleiner 2 als Hoch- oder Runterregulation des Gens. Zhao et al. (2003) berechneten den Expressionsmittelwert über jedes untersuchte Gen und bezeichneten alle Werte unter diesem Mittelwert als gering und die Werte darüber als hoch exprimiert. In einer neueren Arbeit von Specht K. et al. (2004) wurde der Mittelwert des relativen Expressionniveaus des Gene Cyclin D1/TBP aus 8 unterschiedlichen lymphatischen Geweben und Knochenmarksgeweben errechnet und 5 mal die Standardabweichung addiert. Ihre Schwelle für erhöhte Expression kam dann bei dem Wert 2,33 zu liegen. Würden wir die Standardabweichung fünf mal addieren käme unsere Schwelle für DNA bei 3,4 zu liegen und bei RNA bei 6,0. Demnach hätten wir dann eine Überexpression des Gens Her2/neu in nur 7% der Fälle, was wiederum im Vergleich zur Literatur (s.o.) sehr niedrig wäre. Hier wäre Bedarf, die Auswertung der Real-Time PCR Ergebnisse zu vereinheitlichen, um die Ergebnisse aus unterschiedlichen Studien besser vergleichen zu können.

#### **5.2.4 Vergleichbarkeit der DNA-TaqMan™ Ergebnisse mit FISH**

Mit entsprechenden Sonden können mit der FISH-Technik einzelne Gene auf Chromosomen in histologischen Schnitten nachgewiesen werden. Um unsere DNA-Ergebnisse zu validieren, führten wir an einigen Tumorfällen FISH mit einer Her2/neu-Sonde (n = 12) und einem PTK6 PAC-Klon (n = 6) durch. Bei beiden verwendeten Sonden konnte in allen Fällen, die einen erhöhten DNA TaqMan Wert zeigten, auch vermehrt FISH-Signale detektiert werden. Dies zeigt, dass die TaqMan Ergebnisse durchaus mit anderen Methoden verifizierbar sind. De Preter K. et al. (2002) konnten bei ihrem Vergleich von 175 Fällen bei 173 (98,9%) eine Übereinstimmung

der beiden Techniken finden. Dies geht nicht konform mit unseren Ergebnissen, dass die TaqMan PCR an DNA weniger sensitiv ist. Eine geringere Sensitivität würde bei normalen TaqMan-Werten vermehrte FISH-Signale erwarten lassen. Dass dies nicht gezeigt werden kann, liegt sicherlich an der kleinen Stichprobe für die FISH-Untersuchung (Her2/neu n = 12, PTK6 n = 6). Würde man gegebenenfalls alle 53 IDC-Fälle mit diesen FISH-Sonden untersuchen, könnte sich das Ergebnis ändern.

Zusammenfassend läßt sich zur Methode der Real-Time PCR sagen, dass noch weiter geklärt werden muss in wieweit die Formalinfixierung und Paraffineinbettung die Ergebnisse beeinträchtigen kann. Desweiteren wäre dringend eine Vereinheitlichung der Auswertung wünschenswert, um Ergebnisse besser vergleichbar zu machen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Mammakarzinom ist immer noch der häufigste bösartige Tumor der Frau, der fast jede zehnte Frau in der BRD betrifft und dessen Sterblichkeitsrate die höchste aller Tumore der Frau ist. Mit aus diesem Grund wird auf diesem Gebiet intensiv geforscht. Auf molekularbiologischer Ebene wird beim Mammakarzinom vor allem nach Zusammenhängen zwischen Genveränderungen und der Entstehung und Progression der Tumore gesucht. In dieser Arbeit wurden acht Gene quantitativ mit Real-Time-PCR auf DNA- und RNA-Ebene untersucht. Sieben dieser Gene liegen auf dem langen Arm des Chromosoms 20. Die Region 20q13 wurde in Mammatumoren mittels CGH-Untersuchungen häufig amplifiziert vorgefunden, und eine schlechtere Prognose der Patientinnen mit dieser Amplifikation festgestellt. Welche Gene für diese Amplifikation verantwortlich sind, ist noch nicht gänzlich geklärt. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das schon sehr intensiv untersuchte Gen Her2/neu mitbestimmt, um eventuelle Zusammenhänge mit Genen der Region 20q abzuklären.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, herauszufinden, ob die ausgewählten Gene verantwortlich für die Amplifikation am langen Arm des Chromosoms 20 sind, ob sie überexprimiert sind und ob ein Zusammenhang zwischen einem DNA-Zugewinn oder einer Überexpression und den klinischen und histopathologischen Parametern besteht. Um die Zuverlässigkeit der TaqMan Methode an FFPE Material sicherzustellen, wurden zuerst intensive methodische Untersuchungen durchgeführt. Dabei fanden wir, dass die Genkopienzahl in tiefgefrorenen verglichen mit FFPE Zellen signifikant unterschiedlich ist, in FFPE Gewebe wurde eine mangelnde Sensitivität der Methode festgestellt. Eine vergleichbare Sensitivität zwischen tiefgefrorenen und FFPE Zellen lag dagegen auf Expressionsebene vor. Entsprechend fanden wir bei der Untersuchung der 54 IDC Fälle kaum DNA-Zugewinne der untersuchten Gene, wohingegen auf RNA-Ebene vor allem die beiden Gene PTK6 und Her2/neu überexprimiert waren. Diese beiden Gene zeigten bei der statistischen Auswertung eine Korrelation, deren Bedeutung noch weiter abgeklärt werden muß. Da beide Gene für Tyrosinkinasen codieren, die in die Signaltransduktion der Zelle involviert sind, sollte in weiteren Studien der Zusammenhang beider Kinasen geklärt werden. Es wäre durchaus denkbar, dass gemeinsame Moleküle in der Signaltransduktion ein potentiell Therapietarget darstellen, zusätzlich zur Her2/neu-Therapie.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**Albrecht B**, Hausmann M, Zitzelsberger H, Stein H, Siewert JR, Hopt U, Langer R, Hofler H, Werner M, Walch A.

*Array-based comparative genomic hybridization for the detection of DNA sequence copy number changes in Barrett's adenocarcinoma.*

J Pathol. 203 (2004) 780-8.

**Anim JT**, John B, Abdulsathar S SA, Prasad A, Saji T, Akhtar N, Ali V, Al-Saleh M.

*Relationship between the expression of various markers and prognostic factors in breast cancer.*

Acta Histochem. 107(2) (2005) 87-93

**Anzick SL**, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS.

*AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer.*

Science 277 (1997) 965-8

### **Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland**

in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut

*Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends*

4. überarbeitete aktualisierte Auflage, Saarbrücken 2004

**Aubele M**, Cummings M, Walsch A, Zitzelsberger H, Nahrig J, Hofler H, Werner M.

*Heterogeneous chromosomal aberrations in intraductal breast lesions adjacent to invasive carcinoma.*

Anal Cell Pathol 20 (2000) 17-24

**Aubele M**, Mattis A, Zitzelsberger H, Walch A, Kremer M, Hutzler P, Hofler H, Werner M.

*Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by Laser-Microdissection and comparative genomic Hybridization.*

Cancer Genet Cytogenet. 110 (1999) 94-102

**Barker KT**, Jackson LE, Crompton MR.

*BRK tyrosine kinase expression in a high proportion of human breast carcinomas.*

Oncogene 15 (1997) 799-805

**Bautista S**, Valles H, Walker RL, Anzick S, Zeillinger R, Meltzer P, Theillet C.

*In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity.*

Clin Cancer Res. 4 (1998) 2925-2929

**Beardsley DI**, Kowbel D, Lataxes TA, Mannino JM, Xin H, Kim WJ, Collins C, Brown KD.

*Characterization of the novel amplified in breast cancer-1 (NABC1) gene product.*

Exp Cell Res. 290 (2003) 402-413.

**Beckmann MW**, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG.

*Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity.*

J Mol Med. 75 (1997) 429-39.

**Bjorge JD**, Pang A, Fujita DJ.

*Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines.*

Journal Biol. Chem. 275(2000) 41439-41446

**Böcker W**, Denk H, Heitz Ph.

*Pathologie*

Urban & Fischer Verlag München Jena

2001, 2., vollst. überarb. Auflage S. 164-184; 856-867

**Bofin AM**, Ytterhus B, Martin C, O'Leary JJ, Hagmar BM.

*Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma.*

Am J Clin Pathol. 122 (2004) 110-119

**Bolla M**, Rostaing-Puissant BR, Chedin M, Souvignet C, Marron-Charriere J, Colonna M, Berland E, Chambaz EM.

*Protein tyrosine kinase activity as a prognostic parameter in breast cancer, a pilot study.*

Breast Cancer Res Treat. 26(1993) 283-287

**Bouras T**, Southey MC, Venter DJ.

*Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and Her2/neu.*

Cancer Res. 61 (2001) 903-907

**Canbolat O**, Durak I, Cetin R, Kavutcu M, Demirci S, Ozturk S.

*Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues.*

Breast Cancer Res Treat 37 (1996) 189-93

**Carlomagno C**, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S.

*c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases.*

J Clin Oncol.;14 (1996) 2702-8.

**Chomczynski P**, Sacchi N.

*Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.*

Anal Biochem. 162 (1987) 156-9

**Cingoz S**, Altungoz O, Canda T, Saydam S, Aksakoglu G, Sakizli M.

*DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization and their association with clinicopathologic parameters in breast tumors.*

Cancer Genet Cytogenet 145 (2003) 108-114

**Claus EB**, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ.

*The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer.*

Cancer; 77 (1996) 2318-24

**Collins C**, Rommens JM, Kowbel D, Godfrey T, Tanner M, Hwang SI, Polikoff D, Nonet G, Cochran J, Myambo K, Jay KE, Froula J, Cloutier T, Kuo WL, Yaswen P, Dairkee S, Giovanola J, Hutchinson GB, Isola J, Kallioniemi OP, Palazzolo M, Martin C, Ericsson C, Pinkel D, Gray JW, et al.

*Positional cloning of ZNF 217 and NABC1: Genes amplified at 20q13.2 and overexpresses in breast carcinoma.*

Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95 (1998) 8703-8708

**Collins C**, Volik S, Kowbel D, Ginzinger D, Ylstra B, Cloutier T, Hawkins T, Predki P, Martin C, Wernick M, Kuo WL, Alberts A, Gray JW.

*Comprehensive genome sequence analysis of a breast cancer amplicon.*

Genome Res. 11 (2001) 1034-1042

- Courjal F**, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, Zeillinger R, Rodriguez C, Theillet C  
*Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups.*  
Cancer Res., 57 (1997) 4360-7
- De Preter K**, Speleman F, Combaret V, Lunec J, Laureys G, Eussen BH, Francotte N, Board J, Pearson AD, De Paepe A, Van Roy N, Vandesompele J.  
*Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a Real-Time quantitative PCR assay.*  
Mod Pathol. 15 (2002) 159-66.
- Dumitrescu RG**, Cotarla I.  
*Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?*  
J Cell Mol Med 9 (2005) 208-21
- Erlich HA**, Gelfand D, Sninsky JJ.  
*Recent advances in the polymerase chain reaction.*  
Science 252 (1991) 1643-51
- Elston CW**, Ellis IO  
*Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.*  
Histopathology 19 (1991) 403-410
- Fink L**, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM.  
*Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking.*  
Nat Med 4 (1998) 1329-1333
- Forozan F**, Mahlamaki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, Gooden GC, Ethier SP, Kallioniemi A, Kallioniemi OP  
*Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data.*  
Cancer Res 60 (2000) 4519-4525
- Frohman MA**, Dush MK, Martin GR.  
*Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 85 (1988) 8998-9002.
- Glöckner S**, Lehmann U, Wilke N, Kleeberger W, Langer F, Kreipe H.  
*Detection of gene amplification in intraductal and infiltrating breast cancer by laser-assisted microdissection and quantitative Real-Time PCR.*  
Pathobiology 68 (2000) 173-179
- Glockner S**, Lehmann U, Wilke N, Kleeberger W, Langer F, Kreipe H.  
*Amplification of growth regulatory genes in intraductal breast cancer is associated with higher nuclear grade but not with the progression to invasiveness.*  
Lab Invest. 81(2001) 565-71.
- Gnanapragasam VJ**, Leung HY, Pulimood AS, Neal DE, Robson CN.  
*Expression of RAC3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer.*  
Br J Cancer. 85 (2001) 1928-36.

- Guan XY**, Xu J, Anzick SL, Zhang H, Trent JM, Meltzer PS.  
*Hybrid selection of transcribed sequences from microdissected DNA: isolation of genes within amplified region at 20q11-q13.2 in breast cancer.*  
Cancer Res. 56 (1996) 3446-50.
- Hayes DF**, Bast RC, Desch CE, Fritsche H Jr, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ.  
*Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers.*  
J Natl Cancer Inst. 88 (1996) 1456-66.
- Harvey AJ**, Crompton MR.  
*Use of RNA interference to validate Brk as a novel therapeutic target in breast cancer: Brk promotes breast carcinoma cell proliferation.*  
Oncogene 22 (2003) 5006-5010
- Hashimoto N**, Goldstein BJ.  
*Differential regulation of mRNAs encoding three protein-tyrosine phosphatases by insulin and activation of protein kinase C.*  
Biochem Biophys Res Commun. 188 (1992) 1305-11
- Hennipman A**, van Oirschot BA, Smits J, Rijksen G, Staal GE.  
*Tyrosine kinase activity in breast cancer, benign breast disease, and normal breast tissue.*  
Cancer Res. 49 (1989) 516-21
- Hodgson JG**, Chin K, Collins C, Gray JW.  
*Genome amplification of chromosome 20 in breast cancer.*  
Breast Cancer Res Treat.;78 (2003) 337-45
- Holbro T**, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF 3rd, Hynes NE.  
*The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation.*  
Proc Natl Acad Sci USA; 100 (2003) 8933-8
- Holland P.M.**, Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H.  
*Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase.*  
Biochemistry Vol. 88, (1991) pp.7276-7280
- Hopman AH**, Moesker O, Smeets AW, Pauwels RP, Vooijs GP, Ramaekers FC.  
*Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization.*  
Cancer Res.; 51 (1991) 644-51.
- Hulka BS**, Moorman PG.  
*Breast cancer: hormones and other risk factors*  
Maturitas 38 (2001) 103-113
- Isola JJ**, Kallioniemi OP, Chu LW, Fuqua SA, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Waldman FM.  
*Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer.*  
Am J Pathol. 147 (1995) 905-11
- Iwase H**, Omoto Y, Toyama T, Yamashita H, Hara Y, Sugiura H, Zhang Z.  
*Clinical significance of AIB1 expression in human breast cancer.*  
Breast Cancer Res Treat. 80 (2003) 339-45

- Janicke F**, Prechtl A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M; German N0 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.*  
J Natl Cancer Inst. 93 (2001) 913-20.
- Janni W**, Gerber B, Sommer H, Untch M, Krause A, Dian D, Runnebaum I, Rack B, Friese K  
*Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms*  
Deutsches Ärzteblatt, Jg. 102, Heft 41, 14.10.05, S. C2226
- Jhanwar SC**, Berkvens TM, Breukel C, van Ormondt H, van der Eb AJ, Meera Khan P  
*Localization of human adenosine deaminase (ADA) gene sequences to the q12---q13.11 region of chromosome 20 by in situ hybridization.*  
Cytogenet Cell Genet.; 50 (1989) 168-71
- Jong de MM**, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M, de Vries EG.  
*Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility*  
J Med Genet. 39 (2002) 225-242
- Kallioniemi A**, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM.  
*Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization.*  
Proc Natl Acad Sci USA.; 91 (1994) 2156-60.
- Kamalati T**, Jolin HE, Fry MJ, Crompton MR.  
*Expression of the BRK tyrosine kinase in mammary epithelial cells enhances the coupling of EGF signalling to PI 3-kinase and Akt, via erbB3 phosphorylation.*  
Oncogene; 19 (2000) 5471-6
- Kamalati T**, Jolin HE, Mitchell PJ, Barker KT, Jackson LE, Dean CJ, Page MJ, Gusterson BA, Crompton MR  
*Brk, a breast tumor-derived non-receptor protein-tyrosine kinase, sensitizes mammary epithelial cells to epidermal growth factor.*  
J Biol Chem.; 271 (1996) 30956-63.
- Kandel ES**, Hay N.  
*The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB.*  
Exp Cell Res.; 253 (1999) 210-29
- Kiechle M**, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Gerber WD, Albacht B, Fischer B, Schlegelberger B, Arnold N.  
*Ten novel BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and/or ovarian cancer families from northern Germany.*  
Hum Mutat 16 (2000) 529-30
- Knudson AG Jr.**  
*Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*  
Proc Natl Acad Sci USA 68 (1971) 820-823
- Kolibaba KS**, Druker BJ  
*Protein tyrosine kinases and cancer.*  
Biochim Biophys Acta. 1333 (1997) F217-48

- Konecny G**, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ.  
*Quantitative association between HER2/neu and steroid hormone receptors in hormon receptor-positive primary breast cancer.*  
J Natl Cancer Inst.; 95 (2003) 142-53
- Knuutila S**, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y.  
*DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies.*  
Am J Pathol.; 152 (1998) 1107-23.
- Lacroix M**, Leclercq G  
*Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.*  
Breast Cancer Res Treat.; 83 (2004) 249-89
- Lee LG**, Connell CR, Bloch W  
*Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.*  
Nucleic Acids Res.; 21 (1993) 3761-6
- Lee ST**, Strunk KM, Spritz RA  
*A survey of protein tyrosine kinase mRNAs expressed in normal human melanocytes.*  
Oncogene.; 8 (1993) 3403-10
- Lehmann U**, Glockner S, Kleeberger W, von Wasielewski HF, Kreipe H  
*Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction.*  
Am J Pathol.; 156 (2000) 1855-64
- Lehmann U**, Kreipe H  
*Real-Time PCR analysis of DNA and RNA Extracted from formalin-fixed and paraffin embedded biopsies.*  
Methods.; 25 (2001) 409-18
- Look MP**, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Ferno M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brunner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Janicke F, Schmitt M, Foekens JA.  
*Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients.*  
J Natl Cancer Inst.; 94 (2002) 116-28
- Louie MC**, Zou JX, Rabinovich A, Chen HW  
*ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance.*  
Mol Cell Biol.; 24 (2004) 5157-71
- Masuda N**, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K  
*Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology application for such samples.*  
Nucleic Acids Res.; 27 (1999) 4436-43
- McKenna NJ**, Lanz RB, O'Malley BW  
*Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology.*  
Endocr Rev.; 20 (1999) 321-44

- Menard S**, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E  
*Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer.*  
Oncogene.; 22 (2003) 6570-8
- Mitchell PJ**, Barker KT, Martindale JE, Kamalati T, Lowe PN, Page MJ, Gusterson BA, Crompton MR  
*Cloning and characterisation of cDNAs encoding a novel non-receptor tyrosine kinase, brk expressed in human breast tumours.*  
Oncogene; 9 (1994) 2383-90
- Mizuno T**, Nagamura H, Iwamoto KS, Ito T, Fukuhara T, Tokunaga M, Tokuoka S, Mabuchi K, Seyama T.  
*RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies.*  
Diagn Mol Pathol; 7 (1998) 202-8
- Mohapatra G**, Kim DH, Feuerstein BG  
*Detection of multiple gains and losses of genetic material in ten glioma cell lines by comparative genomic hybridization.*  
Genes Chromosomes Cancer; 13 (1995) 86-93
- Moynahan ME**, Chiu JW, Koller BH, Jasin M.  
*BRCA1 controls homology-directed DNA repair.*  
Mol Cell 4 (1999) 511-518
- Muleris M.**, Almeida A., Gerbault-Seureau M., Malfoy B., Dutrillaux B.  
*Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified comparative genomic hybridization technique.*  
Genes Chromosomes Cancer. 10 (1994) 160-70
- Nonet GH**, Stampfer MR, Chin K, Gray JW, Collins CC, Yaswen P  
*The ZNF217 gene amplified in breast cancer promotes immortalization of human mammary epithelial cells.*  
Cancer Res.; 61 (2001) 1250-4
- Osborne C**, Wilson P, Tripathy D.  
*Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications.*  
Oncologist. 9 (2004) 361-77.
- Osborne CK**, Schiff R  
*Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer.*  
Breast; 12 (2003b) 362-7
- Osborne CK**, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R  
*Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in Tamoxifen resistance in breast cancer.*  
J Natl Cancer Inst.; 95 (2003a) 353-61
- Park SH**, Lee KH, Kim H, Lee ST  
*Assignment of the human PTK6 gene encoding a non-receptor protein tyrosine kinase to 20q13.3 by fluorescence in situ hybridization.*  
Cytogenet Cell Genet.; 77 (1997) 271-2
- Parkin DM**, Pisani P, Ferlay J.  
*Global cancer statistics*  
CA Cancer J Clin. 49 (1999) 33-64

**Pieler T**, Bellefroid E.

*Perspectives on zinc finger protein function and evolution--an update.*  
Mol Biol Rep. 20 (1994) 1-8.

**Pike MC**, Spicer DV, Dahmouh L, Press MF.

*Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation and breast cancer risk*  
Epidemiol Rev 15 (1993) 17-35

**Press MF**, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ.

*HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas.*  
J Clin Oncol.; 15 (1997) 2894-904

**Rooney PH**, Boonsong A, McFadyen MC, McLeod HL, Cassidy J, Curran S, Murray GI.

*The candidate oncogene ZNF217 is frequently amplified in colon cancer.*  
Pathol. 204 (2004) 282-8

**Rosivatz E**, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubber B, Busch R, Hofler H, Becker KF.

*Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer.*  
Am J Pathol. 161 (2002) 1881-91

**Roskoski R Jr.**

*The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer.*  
Biochem Biophys Res Commun.; 319 (2004) 1-11

**Roylance R**, Gorman P, Hanby A, Tomlinson I.

*Allelic imbalance analysis of chromosome 16q shows that grade I and grade III invasive ductal breast cancers follow different genetic pathways.*  
J Pathol.; 196 (2002) 32-6.

**Russello SV**, Shore SK

*SRC in human carcinogenesis.*  
Front Biosci. 9 (2004) 139-44

**Sakakura C**, Hagiwara A, Yasuoka R, Fujita Y, Nakanishi M, Masuda K, Kimura A, Nakamura Y, Inazawa J, Abe T, Yamagishi H

*Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers.*  
Int J Cancer; 89 (2000) 217-23

**Salomon DS**, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N

*Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.*  
Crit Rev Oncol Hematol.; 19 (1995) 183-232

**Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR

*DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.*  
Proc Natl Acad Sci USA; 74 (1977) 5463-7

**Sarvilinna N**, Eronen H, Miettinen S, Vienonen A, Ylikomi T.

*Steroid hormone receptors and coregulators in endocrine-resistant and estrogen-independent breast cancer cells.*  
Int J Cancer 8. Sept. 2005 Epub ahead of print

**Sauer H.**

*Mammakarzinom-Manual*  
*Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*  
Herausgeber: Tumorzentrum München  
W. Zuckschwerdt Verlag GmbH  
10. überarbeitete Auflage 2005

**Schwab M.**

*Oncogene amplification in solid tumors*  
*Semin Cancer Biol.*; 9 (1999) 319-25

**Slamon DJ**, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL  
*Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.*  
*Science*; 235 (1987) 177-82

**Slamon DJ**, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al  
*Studies of the Her2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.*  
*Science*; 244 (1989) 707-12

**Specht K**, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H.  
*Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin embedded tumor tissue*  
*Am J Pathol.* 158 (2001) 419-29

**Specht K**, Haralambieva E, Bink K, Kremer M, Mandl-Weber S, Koch I, Tomer R, Hofler H, Schuurig E, Kluin PM, Fend F, Quintanilla-Martinez L.  
*Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels.*  
*Blood* 104 (2004) 1120-6

**Sterky F**, Lundeberg J  
*Sequence analysis of genes and chromosomes.*  
*J Biotechnol.*; 76 (2000) 1-31

**Summy JM**, Gallick GE  
*Src family kinases in tumor progression and metastasis.*  
*Cancer Metastasis Rev.*; 22 (2003) 337-58

**Szollosi J**, Balazs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM  
*ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer.*  
*Cancer Res.*; 55 (1995) 5400-7

**Tanner MM**, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D, Shadravan F, Hintz M, Kuo WL, et al.  
*Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes.*  
*Cancer Res.*; 54 (1994) 4257-60

**Tanner MM**, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Holli K, Collins C, Kowbel D, Gray JW, Kallioniemi OP, Isola J.  
*Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: Prognostic implications.*  
*Clin Cancer Res.*; 1 (1995) 1455-61

**Tanner MM**, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Isola J, Kuukasjarvi T, Collins C, Kowbel D, Guan XY, Trent J, Gray JW, Meltzer P, Kallioniemi OP  
*Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer.*  
Cancer Res.; 56 (1996) 3441-5

**Tanner MM**, Grenman S, Koul A, Johannsson O, Meltzer P, Pejovic T, Borg A, Isola JJ  
*Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer.*  
Clin Cancer Res.; 6 (2000) 1833-9

**Toncheva D**, Zaharieva B.  
*Coexistence of copy number changes of different genes (INK4A, erbB-1, erbB-2, CMYC, CCND1 and ZNF217) in urothelial tumors.*  
Tumour Biol. 25 (2005) 88-93

**Tzahar E**, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y  
*A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor.*  
Mol Cell Biol.; 16 (1996) 5276-87

**Volpi A**, Bacci F, Paradiso A, Saragoni L, Scarpi E, Ricci M, Aldi M, Bianchi S, Muretto P, Nuzzo F, Simone G, Mangia A, Schittulli F, Amadori D.  
*Prognostic relevance of histological grade and its components in node-negative breast cancer patients.*  
Mod Pathol.; 17 (2004) 1038-44

**Walia M**, Mahajan M, Singh K  
*Serum adenosine deaminase, 5'-nucleotidase & alkaline phosphatase in breast cancer patients*  
Indian J Med Res.; 101 (1995) 247-9

**Walker RA**, Jones JL, Chappell S, Walsh T, Shaw JA.  
*Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management.*  
Cancer Metastasis Rev.; 16 (1997) 5-27.

**Werner M**, Mattis A, Aubele M, Cummings M, Zitzelsberger H, Hutzler P, Höfler H  
*20q13.2 amplification in intraductal hyperplasia adjacent to in situ and invasive ductal carcinoma of the breast.*  
Virchows Arch.; 435 (1999) 469-72

**Wiener JR**, Hurteau JA, Kerns BJ, Whitaker RS, Conaway MR, Berchuck A, Bast RC Jr  
*Overexpression of the tyrosine phosphatase PTP1B is associated with human ovarian carcinomas.*  
Am J Obstet Gynecol.; 170 (1994b) 1177-83

**Wiener JR**, Kerns BJ, Harvey EL, Conaway MR, Iglehart JD, Berchuck A, Bast RC Jr  
*Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression.*  
J Natl Cancer Inst.; 86 (1994a) 372-8

**Wolman SR.**  
*Fluorescence in situ hybridization: a new tool for the pathologist.*  
Hum Pathol.; 25 (1994) 586-90.

**Xie D**, Sham JS, Zeng WF, Lin HL, Bi J, Che LH, Hu L, Zeng YX, Guan XY.  
*Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma.*  
Hum Pathol 36 (2005) 777-83

**Xie W**, Duan R, Safe S

*Estrogen induces adenosine deaminase gene expression in MCF human breast cancer cells: Role of estrogen receptor-Sp1 interactions.*

Endocrinology;91409(1999) 219-27

**Xie W**, Duan R, Safe S

*Activation of adenosine deaminase in MCF-7 cells through IGF-estrogen receptor alpha crosstalk.*

J Mol Endocrinol.; 26 (2001) 217-28

**Xu J**, Liao L, Ning G, Yoshida-Komiya H, Deng C, O'Malley BW

*The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development.*

Proc Natl Acad Sci USA; 97 (2000) 6379-84

**Yamauchi H**, Stearns V, Hayes DF.

*The Role of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer.*

Breast Cancer; 8 (2001) 171-83.

**Yang SH**, Seo MY, Jeong HJ, Jeung HC, Shin J, Kim SC, Noh SH, Chung HC, Rha SY.

*Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients.*

Clin Cancer Res 11 (2005) 612-20

**Yarden Y.**

*The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities.*

Eur J Cancer.; 37 (2001) 3-8

**Zhao C**, Yasui K, Lee CJ, Kurioka H, Hosokawa Y, Oka T, Inazawa J

*Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis.*

Cancer; 98 (2003) 18-23

**Zitzelsberger H**, Lehmann L, Werner M, Bauchinger M

*Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies.*

Histochem Cell Biol.; 108 (1997) 403-17

**Zhou BP**, Hung MC

*Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer.*

Semin Oncol.; 30 (2003) 38-48

## 8 ANHANG

### 8.1 pTNM Klassifikation des Mammakarzinoms

(nach pTNM-Klassifikation der UICC, 6. Auflage, 2002)

#### pT - Primärtumor:

- pTx Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- pT0 Kein Anhalt für Primärtumor
- Tis Carcinoma in situ:  
Tis (DCIS) duktales Carcinoma in situ  
Tis (LCIS) lobuläres Carcinoma in situ  
Tis (Paget) Paget-Erkrankung der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
- pT1 Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- pT1mic Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- pT1a Tumor 0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- pT1b Tumor 0,5 cm bis 1 cm in größter Ausdehnung
- pT1c Tumor 1 cm bis 2 cm in größter Ausdehnung
- pT2 Tumor 2 cm bis 5 cm in größter Ausdehnung
- pT3 Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
- pT4 Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder die Haut
- pT4a Mit Ausdehnung auf die Brustwand
- pT4b Mit Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
- pT4c Kriterien 4a und 4b gemeinsam
- pT4d Entzündliches (inflammatorisches) Mammakarzinom

#### pN - Regionale Lymphknoten:

- pNx Regionale Lymphknoten (LK) können nicht beurteilt werden
- pN0 Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
- pN1mi Mikrometastasen (größer als 0,2mm, aber nicht größer als 2mm in max. Ausdehnung.
- pN1 Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären LK u./o. in ipsil. LK entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren.
- pN1a Metastasen in 1-3 ipsil. axill. LK, zumindest eine größer als 2mm in max. Ausdehnung
- pN1b Metastasen in ipsil. LK entlang der A. mam. int. mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren.
- pN1c Metastasen in 1-3 ipsil. axill. LK u. in ipsil. LK entlang der A. mam. int. mit mikroskop. Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Diss. entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren.

- pN2 Metastasen in 4-5 ipsilateralen axillären LK oder in klinisch auffälligen ipsil. LK entlang der A. mam. int. bei Fehlen axill. Lymphknotenmetastasen.
  - pN2a Metastasen in 4-9 ipsil. axill. LK, zumindest eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung
  - pN2b Metastasen in klinisch auffälligen ipsil. LK entlang der A. mam. int. bei Fehlen axill. LK-Metastasen
- pN3 Metastasen in mind. 10 ipsilateralen axillären LK oder in ipsil. infraklavikulären LK; oder in klinisch auffälligen LK entlang der A. mam. int. bei Vorliegen von mind. einem positiven axill. LK; oder in mehr als 3 axill. LK mit klinisch negativen, mikroskop. Metastasen in LK entlang der A. mam. int.; oder in ipsil. supraklavikulären LK.
  - pN3a Metastasen in mind. 10 ipsil. axill. LK (zumindest eine größer als 2mm in max. Ausdehnung) oder in ipsil. infraklavikulären LK.
  - pN3b Metastasen in klinisch auffälligen LK entlang der A. mam. int. bei Vorliegen von mind. einem positiven axill. LK; oder Metastasen in mehr als 3 axill. LK und in LK entlang der A. mama. int. mit mikroskopischen Metastasen, die durch Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren.
  - pN3c Metastasen in ipsil. supraklavikulären LK.

**pM - Fernmetastasen:**

- pMx Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
- pM0 Keine Fernmetastasen
- pM1 Fernmetastasen

## 8.2 Klinische Daten

Fälle insgesamt	54
Alter der Patientinnen	
Mittelwert	59.6 (STD $\pm$ 10.9)
Altersbereich	30 - 80
Menopausenstatus	
prämenopausal	16
postmenopausal	38
Tumorgröße (cm)	
$\leq 2$	38
$>2-5$	10
$> 5$	5
Lymphknotenstatus	
negativ	29
positiv	25
Estrogenrezeptorstatus	
score $<9$	6
score 9	18
score 12	28
Progesteronrezeptorstatus	
score $\leq 6$	25
score 9	16
score 12	11

### 8.3 Färbungen

#### a) Hämatoxilin Färbung nach Mayer:

Xylol I	15 Min
Xylol II	15 Min
Isopropanol	10 Min
Ethanol 100% / 90% / 50 %	je 5 Min
A. dest.	5 Min
Hämatoxilin n. Mayer	1 Min
Leitungswasser	3 Min
Ethanol 100%	kurz schwenken
Lufttrocknen	

#### b) Hämatoxilin-Eosin Färbung:

Xylol I	5 Min
Xylol II	5 Min
Ethanol 100%	2 Min
Ethanol 70%	2 Min
Aqua dest	2 Min
Hämatoxylin (Papanicolaou)	5 Min
H <sub>2</sub> O fließend wässern	10 Min
Eosin	2 Min
Alkohol 70%	2 Min
Alkohol 96%	2 Min
Alkohol 100%	2 Min
Xylol	2 Min
Eindecken mit Pertex von Meditec	

#### c) Schnell-Hämalaun-Färbung:

Instant Hämalaun (Fa. Shandon jetzt Hypersil Ltd. Aschaffenburg Deutschland) mit Pipette auftropfen, wenige Sekunden einwirken lassen, mit Ampuwa® abspülen.

#### Entparaffinierung für FISH:

Xylol I	10 Min
Xylol II	10 Min
Isopropanol	5 Min
absteigende Ethanolreihe (100%, 90% ,70%)	je 5 Min

#### 8.4 Sequenzen der ausgesuchten Primer und Sonden sowie Nachweis der bezogenen 'Arrays on Demand' (ABI)

Gene	Genloci	Sequenzen von 5' - 3'	Größe (bp)
<b>DNA:</b>			
ADA adenosine deaminase	20q13.1	F: CAAACCCTGGGAACGAACG R: TCTGGACCTTCTCTGCCCC P: CCGTGGCTTGCTTGCGGGC	107
AIB1 amplified in breast cancer (NCOA3)	20q13.12	F: CTGCCTTAACAAAAGTAGCCATGG R: CTCTCGGTAACTTTTCCACCCT P: CGTTGGGAGACTTAGTTGCTTCTTAGGCAGT	92
PTPN1 protein tyrosine phosphatase 1	20q13.13	F: AGTTTCCCTGGTGCTTGCCT R: TGGACCCTGGCACATAAACA P: CACGTTAACACAGTGTCATCGTTTGGCA	70
ZNF217 zink finger protein 217	20q13.2	F: GCACCGACAACGACGATTC R: CTTCGCCGTGGGAGTGTTT P: CAGTTGTGCAGGCCTCTCGCAAGA	85
BCAS1 breast cancer amplified sequence (NABC1)	20q13.2	F: GCTCCTGTGTTCCCTGGAGTTCT R: CTAGGTGGCCATCAGGATCTG P: TCTTCCTCATTTCAGAGGGCGTCCATC	131
PFDN4 prefoldin4	20q13.2	F: GTGTGGGAAGCCGAAGGTC R: CTAATGCGATCATGCCGGT P: TTGGCCTTGACTCGGGCGTTG	73
PTK6 protein tyrosine kinase 6 (brk)	20q13.33	F: TCTCATCAGTGATTGGGCACC R: ACGGCCTCTTTACAGCCTCC P: CAGGCTGTGTAGGGTTAGCTCCCGG	99
HER2/neu (erbB2)	17q21	F: CAGAAGGTCTACATGGGTGCTTC R: TTCCGAGCGGCAAGTC P: TGGAGGATGTGCGGCTCGTACACA	88
$\beta$ -globin human beta-globin region	11p15	F: ACCCTTAGGCTGCTGGTGG R: GGAGTGGACAGATCCCCAAA P: CTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTC	71

Gene	Genloci	Sequenzen von 5' - 3'	Größe (bp)
<b><u>RNA:</u></b>			
PFDN4	prefoldin4	20q13.2	F: TAGAAGAAGCAAAAAAAAAATTTGCAAG R: TCAATTCAGCGAGTGTTAGCAGA P: ACGCCTTAGAATCCAGAGTG
TBP	TATA-box binding protein		F: GCCCGAAACGCCGAATAT R: CCGTGGTTCGTGGCTCTCT P: ATCCCAAGCGGTTTGCTGCGG

*'Arrays on Demand' (ABI)*

Gene:	Bestellnummer:
ADA:	HS 001 635 53
AIB1:	HS 001 807 22
PTPN1:	HS 001 822 60
ZNF217:	HS 002 324 17
BCAS1:	HS 001 802 27
PTK6:	HS 001 787 42
Her2/neu:	HS 001 704 33

### 8.5 Tabelle der DNA-TaqMan™ Werte mit klinischen/histopathologischen Parametern

	ADA	AIB1	BCAS1	PTK6	PTPN1	ZNF 217	PFDN4	Her2	Alter	pT	pN	LN	M	Grad	Tu-Größe	Morph.	ER	PrR
1	0,13	0,47	0,11	0,41	0,19	0,12	0,17	0,78	58	pT1c	N1	+	Mx, R0	2	1,2	IDC	9	9
2	0,43	0,86	0,27	1,97	0,31	0,28	0,42	1,44	30	pT1c	N1bi	+	Mx, R0	2	1	IDC	12	6
3	0,38	0,61	0,27	1,89	0,25	0,19	0,36	1,32	63	pT1b	pN0	0	Mx, R0	2	0,9	IDC	9	9
4	0,32	0,68	0,62	1,02	0,19	0,21	0,28	1,17	77	pT4b	pN1biii	+	Mx, R0	2	2	IDC	12	9
5	0,21	0,01	0,20	0,65	0,26	0,11	0,23	1,02	75	pT1c	N1biv	+	Mx, R0	2	1,2	IDC	12	12
6	0,21	0,57	0,64	0,66	0,16	0,20	0,74	0,83	38	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	0,4	IDC	6	6
7	0,53	0,78	0,24	2,44	0,31	0,21	0,46	1,36	58	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,9	IDC	12	12
8	0,33	0,45	0,16	0,23	0,13	0,11	0,25	0,50	62	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,5	IDC	12	9
9	0,63	1,15	0,42	2,27	0,31	0,32	0,51	1,59	69	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,5	IDC	12	9
10	0,32	1,00	0,28	0,84	0,21	0,32	0,34	0,80	45	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,5	IDC	12	12
11	1,25	1,04	0,41	2,10	0,27	0,22	0,56	2,65	60	pT4b	pN0	0	Mx, R0	2	1,6	IDC	9	2
12	0,32	0,53	0,29	1,68	0,24	0,23	0,30	1,25	47	pT1c	N1biii	+	Mx, R0	2	1,6	IDC	12	9
13	0,39	0,72	0,31	1,87	0,19	0,21	0,30	1,04	78	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,2	IDC	12	12
14	0,23	0,68	0,50	0,61	0,21	0,20	0,23	0,59	60	pT4b	pN1biii	+	Mx, R0	2	3,8	IDC	9	12
15	0,23	0,58	0,22	0,62	0,24	0,22	0,29	1,03	63	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,1	IDC	12	9
16	0,32	0,61	0,20	1,04	0,18	0,21	0,39	1,04	52	pT1b	N0	0	Mx, R0	2	0,8	IDC	9	6
17	0,17	0,62	0,30	2,41	0,39	0,27	0,40	0,70	52	pT2	N1biii	+	Mx, R0	2	5,0	IDC	12	4
18	0,20	0,45	0,22	0,21	0,11	0,12	0,18	0,55	50	pT1a	N0	0	Mx, R0	2	0,3	IDC	9	4
19	0,41	1,19	0,49	0,99	0,29	0,32	0,42	1,04	69	pT1b	N0	0	Mx, R0	2	0,7	IDC	12	12
20	0,47	0,69	0,49	2,09	0,20	0,20	0,32	0,90	53	pT2	N0	0	Mx, R0	2	3,3	IDC	12	4
21	0,38	0,16	0,12	0,27	0,18	0,18	0,45	0,85	73	pT2	N1bi	+	R1	2	3,8	IDC	12	0
22	0,26	0,52	0,37	0,75	0,22	0,27	0,16	0,47	40	pT2	pN1bi	+	Mx, R0	2	2,5	IDC	12	6
23	0,46	0,62	0,16	0,21	0,16	0,19	0,34	0,68	80	pT1c	pN1biii	+	Mx, R0	2	1,7	IDC	8	3
24	0,15	0,23	0,13	0,63	0,18	0,09	0,28	1,01	62	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,2	IDC	9	2
25	0,78	1,00	0,67	0,38	0,28	0,30	0,56	1,13	51	pT3	pN1bi	+	Mx, R1	2	6,5	IDC	9	9
26	0,32	0,74	0,25	0,19	0,24	0,15	0,28	0,60	67	pT4	pNbiii	+	Mx, R0	2	3,5	IDC	9	0
27	0,55	0,85	0,44	0,45	0,19	0,23	0,39	1,04	54	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	2	IDC	6	9
28	-	-	-	-	-	-	-	-	58	pT2	pN1biii	+	Mx	2	-	IDC	9	9
29	0,26	0,03	0,19	0,17	0,23	0,11	0,51	0,69	54	pT1b	pN0	0	R0	2	0,6	IDC	2	0

	ADA	AIB1	BCAS1	PTK6	PTPN1	ZNF 217	PFDN4	Her2	Alter	pT	pN	LN	M	Grad	Tu-Größe	Morph.	ER	PrR
30	0,33	0,54	0,27	0,15	0,20	0,11	0,28	0,66	57	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,8	IDC	12	6
31	0,30	0,60	0,13	0,68	0,20	0,18	0,30	1,11	61	pT2	N1bi	+	Mx, R0	2	3	IDC	-	-
32	2,23	3,06	4,81	2,85	0,45	4,29	7,10	2,34	57	pT3	N1biii	+	Mx, R0	2	6,5	IDC	-	-
33	0,76	0,26	0,16	0,07	0,31	0,39	1,06	1,63	68	pT1c	N1bi	+	Mx, R0	2	1,5	IDC	12	9
34	0,62	0,46	0,15	0,66	0,17	0,20	0,38	0,96	52	pT2	pN1bi	+	Mx, R0	2	1,2	IDC	12	12
35	0,26	0,30	0,66	2,61	0,03	0,06	0,09	0,25	35	pT1c	N1bi	+	Mx, R0	2	1,7	IDC	9	12
36	1,70	2,13	0,80	5,43	0,38	0,88	1,33	1,25	50	pT2	pN0	0	Mx, R0	2	2,1	IDC	9	9
37	0,83	1,14	0,30	1,21	0,25	0,36	0,73	0,99	64	pT1c	pN1bi	+	Mx, R0	2	1,5	IDC	9	6
38	0,73	0,63	0,24	1,68	0,21	0,21	0,53	1,04	59	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,3	IDC	12	12
39	0,18	0,01	0,12	0,16	0,17	0,09	0,51	0,50	53	pT1c	N1biii	+	Mx, R0	2	1,1	IDC	12	6
40	0,95	1,37	0,74	1,52	0,28	0,36	0,70	1,40	58	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,1	IDC	9	4
41	0,65	0,79	0,31	1,17	0,18	0,21	0,35	0,69	78	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,4	IDC	8	6
42	0,63	0,69	0,33	1,15	0,18	0,25	0,42	1,13	59	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,1	IDC	12	6
43	0,97	0,86	0,34	2,49	0,19	0,35	0,59	1,55	63	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,2	IDC	0	0
44	0,51	0,02	0,25	0,53	0,26	0,13	1,00	0,82	62	pT1	N1a	+	Mx, R0	2	1,8	IDC	9	12
45	0,84	1,17	0,53	2,55	0,27	0,31	0,55	0,61	74	pT4	pN2	+	M1	2	6	IDC	12	6
46	0,36	0,53	0,20	0,64	0,22	0,23	0,43	1,37	61	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,3	IDC	12	6
47	0,28	0,23	0,06	0,06	0,15	0,13	0,30	0,67	67	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,2	IDC	9	9
48	0,42	0,68	0,11	0,56	0,21	0,20	0,42	0,87	56	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,8	IDC	12	0
49	0,16	0,36	0,08	0,55	0,09	0,12	0,18	0,45	67	pT1b	N0	0	Mx, R0	2	0,7	IDC	12	12
50	0,88	0,52	0,21	0,69	0,23	0,34	0,75	1,15	67	pT2	pNbi	+	Mx, R0	2	2,1	IDC	9	9
51	0,19	0,82	0,39	0,20	0,23	0,17	0,20	1,44	55	pT2	pNbiii	+	Mx, R0	2	2,1	IDC	12	9
52	0,09	0,01	0,06	0,14	0,12	0,05	0,38	0,36	56	pT2	pN0	0	Mx, R0	2	2	IDC	12	6
53	1,05	1,01	0,35	2,65	0,28	0,50	0,79	1,20	67	pT3	N1bii	+	Mx, R1	2	7,0	IDC	9	9
54	0,76	0,06	0,15	0,42	0,23	0,25	1,53	2,40	76	pT3	N0	0	Mx, R0	2	5,3	IDC	12	0

### 8.6 Tabelle der RNA-TaqMan™ Werte mit klinischen/histopathologischen Parametern

	ADA	AIB1	PTPN1	ZNF 217	BCAS1	PFDN4	PTK6	Her2/ neu	Alter	pT	pN	LN	M	Grad	Tu- Größe	Morph.	ER	PrR
1	0,6	0	0,2	0	0,5	0	3,8	1,1	58	pT1c	N1	+	Mx, R0	2	1,2	IDC	9	9
2	1,1	0	0,6	0,1	0,5	0	1,3	0,8	30	pT1c	N1bi	+	Mx, R0	2	1	IDC	12	6
3	1,1	0	0,3	0,2	0,2	0,1	2,7	3	63	pT1b	pN0	0	Mx, R0	2	0,9	IDC	9	9
4	5,1	0,2	1,2	0,3	1,5	0,1	8	5,2	77	pT4b	pN1biii	+	Mx, R0	2	2	IDC	12	9
5	2,1	0,1	1,7	0,3	0,3	0,1	3,7	3,4	75	pT1c	N1biv	+	Mx, R0	2	1,2	IDC	12	12
6	1,2	0	0,4	0,2	0,3	0,1	2,4	2,9	38	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	0,4	IDC	6	6
7	1,1	0	0,4	0,1	0,2	0	1,6	1,2	58	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,9	IDC	12	12
8	1,6	0,1	0,4	0,1	0,5	0,1	2,3	2,4	62	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,5	IDC	12	9
9	2,1	0,1	1,8	0,1	5,9	0,1	6,6	1,2	69	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,5	IDC	12	9
10	3,3	0,1	1,8	0,3	0,7	0,1	3,5	4	45	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,5	IDC	12	12
11	1,3	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	2,2	3,1	60	pT4b	pN0	0	Mx, R0	2	1,6	IDC	9	2
12	1,5	0,1	0,6	0,2	1,6	0,1	3,9	0,7	47	pT1c	N1biii	+	Mx, R0	2	1,6	IDC	12	9
13	1,5	0,1	0,3	0,2	0,6	0	2,9	1,2	78	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,2	IDC	12	12
14	2	0,1	0,8	0,2	0,6	0	1,4	0,6	60	pT4b	pN1biii	+	Mx, R0	2	3,8	IDC	9	12
15	0,8	0,1	0,5	0,1	0,7	0,1	1,6	1,2	63	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,1	IDC	12	9
16	3,2	0,2	1,5	0,3	0,2	0,1	7,1	5,8	52	pT1b	N0	0	Mx, R0	2	0,8	IDC	9	6
17	1,3	0,2	0,6	0,2	1,8	0	6,2	0,8	52	pT2	N1biii	+	Mx, R0	2	5,0	IDC	12	4
18	3,2	0	1	0,1	0	0	0,5	1,1	50	pT1a	N0	0	Mx, R0	2	0,3	IDC	9	4
19	2,1	0,1	0,9	0,1	0,7	0	3,5	2,4	69	pT1b	N0	0	Mx, R0	2	0,7	IDC	12	12
20	1,2	0,1	0,5	0,3	1,6	0	9,4	3,5	53	mpT2	N0	0	Mx, R0	2	3,3	IDC	12	4
21	3	0,2	1,4	0,3	0,3	0,1	7,4	2,4	73	pT2	N1bi	+	R1	2	3,8	IDC	12	0
22	0,7	0,1	1,2	0,1	0,3	0,1	8,7	0,4	40	pT2	pN1bi	+	Mx, R0	2	2,5	IDC	12	6
23	3,9	0,1	0,7	0,4	0,8	0,1	2,6	1,1	80	pT1c	pN1biii	+	Mx, R0	2	1,7	IDC	8	3
24	2,7	0,1	1,9	0,2	2,4	0	16	8,7	62	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,2	IDC	9	2
25	0,8	0	1	0,2	0,4	0,1	4,4	2,5	51	pT3	pN1bi	+	Mx, R1	2	6,5	IDC	9	9
26	1,3	0,1	0,2	0,1	1,5	0	1,5	0,7	67	pT4	pNbiii	+	Mx, R0	2	3,5	IDC	9	0

	ADA	AIB1	PTPN1	ZNF 217	BCAS1	PFDN4	PTK6	Her2/ neu	Alter	pT	pN	LN	M	Grad	Tu- Größe	Morph.	ER	PrR
27	0,9	0	0,3	0,1	0,1	0,1	1,3	1,1	54	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	2	IDC	6	9
28	0,4	0,1	0,5	0,1	0,6	0	2,5	4,8	58	pT2	pN1biii	+	Mx	2	-	IDC	9	9
29	1	0,1	0,3	0,2	0,4	0,1	0,9	21	54	pT1b	pN0	0	R0	2	0,6	IDC	2	0
30	2,2	0,1	0,9	0,1	0,3	0	6,7	1,9	57	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,8	IDC	12	6
31	1,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	2,6	1,4	61	pT2	N1bi	+	Mx, R0	2	3	IDC	-	-
32	2,2	0,1	0,5	0,4	4,4	0,2	5,7	7,7	57	pT3	N1biii	+	Mx, R0	2	6,5	IDC	-	-
33	1,3	0,1	0,8	0,1	1,8	0	4,4	2,6	68	pT1c	N1bi	+	Mx, R0	2	1,5	IDC	12	9
34	1,5	0,3	1,3	0,4	1	0,1	22	4,6	52	pT2	pN1bi	+	Mx, R0	2	1,2	IDC	12	12
35	0,4	0	0,3	0,5	3,3	0,2	11	2,1	35	pT1c	N1bi	+	Mx, R0	2	1,7	IDC	9	12
36	3,7	0,3	5,9	1,3	2,8	0,2	6,9	3,3	50	pT2	pN0	0	Mx, R0	2	2,1	IDC	9	9
37	1,3	0,4	0	3,6	0,3	0	0,1	2,1	64	pT1c	pN1bi	+	Mx, R0	2	1,5	IDC	9	6
38	1,4	0,1	1,1	0,1	0,6	0	6,3	2,5	59	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,3	IDC	12	12
39	2,5	0,1	0,5	0,3	0,4	0,1	4,7	2,6	53	pT1c	N1biii	+	Mx, R0	2	1,1	IDC	12	6
40	1,6	0,1	0,8	0,1	1,5	0	3,8	3,4	58	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,1	IDC	9	4
41	1,6	0,1	0,5	0,4	1,7	0	4,5	1,7	78	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,4	IDC	8	6
42	3,5	0,1	0,7	0,4	0,6	0,1	5,1	4,7	59	pT1c	pN0	0	Mx, R0	2	1,1	IDC	12	6
43	6,8	0,2	0,7	0,3	0,1	0,1	7,6	9,8	63	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,2	IDC	0	0
44	1	0,2	0,7	0,2	0,7	0,2	6,7	1,1	62	pT1	N1a	+	Mx, R0	2	1,8	IDC	9	12
45	2,9	0,1	0,7	1,2	0,3	0,1	4,7	0,9	74	pT4	pN2	+	M1	2	6	IDC	12	6
46	0,8	0,1	0,7	0,1	1,1	0	11	1,9	61	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,3	IDC	12	6
47	0,6	0,1	2,8	0,1	0,4	0,1	11	1,9	67	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,2	IDC	9	9
48	2	0,2	1,4	0,3	1,2	0,1	10	3,5	56	pT1c	N0	0	Mx, R0	2	1,8	IDC	12	0
49	0,7	0,1	0,7	0,2	2,4	0	11	1,1	67	pT1b	N0	0	Mx, R0	2	0,7	IDC	12	12
50	1,2	0,1	0,4	0,2	0,2	0	4,3	1,1	67	pT2	pNbi	+	Mx, R0	2	2,1	IDC	9	9
51	0,5	0	0,4	0	0,2	0	1,1	0,3	55	pT2	pNbiii	+	Mx, R0	2	2,1	IDC	12	9
52	0,7	0,1	1	0,1	0,4	0	0,2	0,7	56	pT2	pN0	0	Mx, R0	2	2	IDC	12	6
53	4,2	0,2	6	0,2	0,5	0	22	1,9	67	pT3	N1bii	+	Mx, R1	2	7,0	IDC	9	9
54	1,5	0,2	2	0,1	0,4		7,8		76	pT3	N0	0	Mx, R0	2	5,3	IDC	12	0

## 9 DANKSAGUNG

- ☺ Mein Dank geht in erster Linie an **Herrn Prof. Dr. med. Höfler**, der die Arbeit überhaupt ermöglichte und mir die nötigen histologischen Präparate und Daten überließ sowie den nötigen Arbeitsrahmen sicherstellte.
- ☺ Ein großes Danke gilt **Frau PD Dr. rer. nat. Michaela Aubele**, die mir das Thema zur Verfügung stellte und mich zweieinhalb Jahre mit viel Geduld und Motivation bei der Arbeit unterstützte und betreute, mir vor allem auch bei der Niederschrift dieser Arbeit zur Seite stand und viele Stunden ihrer Zeit zur Verfügung stellte.
- ☺ **Ulrike Reich** möchte ich ganz herzlich danken für die Durchführung der Real-Time-PCR an der RNA der Mammakarzinome und vor allem auch einen Riesendank für die große labortechnische Unterstützung in jeder Hinsicht, ohne die vieles nicht so reibungslos abgelaufen wäre.
- ☺ **Frau PD Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez Fend** danke ich herzlich für die Durchsicht der vielen histologischen Schnitte ob ihrer Eignung für die Arbeit sowie für ihre konstruktiven Tipps in den Laborbesprechungen.
- ☺ **Frau Di Grazia** danke ich für die Anfertigung aller benötigten histologischen Schnitte und deren Färbung sowie die große Unterstützung und Durchführung der Präparation der histologischen Schnitte für die FISH.
- ☺ **Udo Schnitzbauer** gilt der Dank für die durchgeführten Sequenzierungen.
- ☺ **Dr. Markus Kremer** danke ich für die Hilfe beim Zurechtfinden im Archiv der Pathologie und beim Heraussuchen der dazugehörenden klinischen Daten.
- ☺ **Herrn Herbert Braselmann** gilt der Dank für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Berechnungen.
- ☺ **Dr. med. Manfred Richter** danke ich für die Unterstützung bei der Mikrodissektion der histologischen Schnitte für die RNA-Untersuchung.
- ☺ Ein Dankeschön auch an **Daniela Angermeier**, die mich in die Laborarbeit einführte und mir die Real-Time-PCR-Methode näherbrachte.
- ☺ **Herrn Hutzler** ein Dankeschön für die Einführung in die Handhabung und Betreuung der benötigten Mikroskope.
- ☺ Allen Korrekturlesern sei auch noch ausdrücklich gedankt.
- ☺ Und nicht zuletzt ein riesengroßes, ganz herzliches Danke an meinen Mann **Olaf**, ohne ihn und seine Unterstützung hätte ich es nie soweit geschafft.

## 10 LEBENSLAUF

<b>Geburtsdatum:</b>	17. Februar 1971
<b>Geburtsort:</b>	Weingarten (Baden-Württemberg)
<b>Schulbildung:</b>	
1977-1981	Grundschule Unterankenreute
1981-1987	Realschule Weingarten
1987-1990	Gewerbl. Berufsschule für Arzthelferinnen Aulendorf
1992-1995	Kolping Kolleg Ravensburg (zweiter Bildungsweg zur Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife)
<b>Berufsausbildung:</b>	
1987-1990	zur Arzthelferin bei Herrn Dr. med. Jentzmik (Urologe) in Ravensburg
<b>Berufstätigkeit:</b>	
1990-1992	Allgemeinarztpraxis Dr. med Weinkauff in Ravensburg
1995-1996	Urologische Praxis Dr. med. Jentzmik in Ravensburg
1997-1999	Allgemeinarztpraxis Thomas Foerschler in Ravensburg
<b>Medizinstudium:</b>	
SS 1999 – WS 2001	Vorklinik an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
März 2001	Physikum
SS 2001	Beginn des klinischen Studienabschnitts an der TU-München, Klinikum Rechts der Isar München
März 2002	1. Staatsexamen
April 2002	Beginn der vorliegenden Dissertation
März 2004	2. Staatsexamen
April bis September 2004	Fertigstellung der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
Oktober 2004 bis September 2005	Praktisches Jahr am Klinikum Augsburg Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilian Universität München
Oktober 2005	3. Staatsexamen