

Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der
Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)
und dem Institut für Pathologie, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
Neuherberg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

Genexpressionsanalyse am Mammakarzinom:

Eine vergleichende molekulargenetische Untersuchung
metastaserelevanter Gene in Primärtumor und Lymphknoten

Andreas Georg Scherr

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. F. Fend
2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 11.01.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 27.06.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	6
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	6
<i>Bedeutung und allgemeine Epidemiologie</i>	6
<i>Globaler Vergleich von Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms</i>	7
<i>Risikofaktoren</i>	8
1.2 Pathologie	10
<i>Aktuelle pathomorphologische Klassifikation nach WHO</i>	11
<i>Duktales Mammakarzinom</i>	12
<i>Lobuläres Mammakarzinom</i>	14
<i>Inflammatorisches Mammakarzinom</i>	15
1.3 Klinische Aspekte	15
<i>Klinische Stadieneinteilung des Mammakarzinoms</i>	15
<i>Klinische Bedeutung von Prognosefaktoren</i>	16
<i>Traditionelle etablierte Prognosefaktoren</i>	17
<i>Klinische Notwendigkeit für neue Prognosefaktoren</i>	19
1.4 Molekulargenetische Aspekte	25
<i>Genexpressionsanalyse am Mammakarzinom</i>	25
<i>Metastasierung und Metastasierungsmodelle</i>	27
Klonale Selektionstheorie	27
„Poor Prognosis signature-good prognosis signature“	28
Metastasierung unter Berücksichtigung von Tumor-Stroma Wechselwirkungen	29

1.5 Genexpressionsanalyse an formalinfixiertem Gewebe	32
<u>2. Material und Methoden</u>	33
2.1 Herkunft und Sammlung des Materials	33
Studienfälle	33
<i>Einschlusskriterien</i>	
<i>Ausschlusskriterien</i>	
<i>Sammlung klinischer Daten</i>	
<i>Reevaluierung und Reklassifizierung</i>	
2.2 Auswahl der untersuchten Genen	34
2.3 Herstellung von Präparaten für Histologie, Mikrodissektion und RNA- Extraktion	34
2.4 Mikrodissektion	35
<i>Allgemeines und Stellenwert der Laser Capture Mikrodissektion (LCM)</i>	35
<i>Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion</i>	35
<i>Praktische Durchführung der Laser Capture Mikrodissektion</i>	38
<i>Manuelle Mikrodissektion</i>	40
2.5 Durchführung der RNA-Extraktion aus mikrodisektiertem Gewebe	40
2.6 Quantitative RNA- Analyse mittels RT-PCR	41
<i>Prinzip der reversen Transkription (cDNA-Synthese)</i>	41
<i>Praktische Durchführung der reversen Transkription (cDNA-Synthese)</i>	42
<i>Prinzip der RT- PCR</i>	43
<i>Prinzip der Berechnung der relativen Genexpression</i>	48
<i>Erstellung der Standardkurven mit Hilfe eines Kalibrators (MDA-MB-231)</i>	48

<i>Erstellung der Expressionsmittelwertverhältnisse zwischen den unbekanntenen Proben und der endogenen Kontrolle</i>	51
<i>Praktische Durchführung der RT- PCR</i>	51
2.7 Durchführung der statistischen Auswertung	53
<u>3. Ergebnisse</u>	54
3.1 Retrospektive Archivalsuche (Januar 1995 bis Dezember 1998)	54
3.2 Beschreibung der Studiengruppe (klinische Daten)	54
3.3 Darstellung der erfolgreichen Mikrodissektion	58
3.4 Ergebnisse der PCR- Untersuchungen	60
<i>Ct- Werte und Mittelwertverhältnisse in den Primärtumoren</i>	61
<i>Darstellung des Expressionsniveaus der einzelnen Markergene in den Primärtumoren</i>	64
<i>Darstellung der Expressionsänderung Primärtumor- Lymphknotenmetastase</i>	70
<i>Gegenläufige Veränderung der Her- 2/neu und COL1A1- Expression in den Lymphknotenmetastasen</i>	84
<i>Zusammenschau der Gene in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen</i>	85
<u>4. Diskussion</u>	
4.1 Kurzpräsentation der Ergebnisse	90
4.2 Hintergrund der Themenstellung	90
4.3 Konzept der Tumorerogenität unter Einbezug der eigenen Beobachtungen	92
<i>Morphologische Aspekte der Tumorerogenität</i>	92
<i>Zeitliche Aspekte der Tumorerogenität</i>	93
<i>Praktische Konsequenz der Tumorerogenität</i>	94
4.4 Bedeutung der verwendeten Technik	94

4.5 Praktische Vorgehensweise bei den molekularen Untersuchungen	96
4.6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Expressionsanalyse	97
4.7 Eingeschränkt verwertbare Studienfälle	98
4.8 Bewertung der molekularen Untersuchungen in den Primärtumoren	99
4.9 Beurteilung der Koexpression ADAM 17 / Her- 2/neu	104
4.10 Bewertung der vergleichenden Expressionsanalyse Primärtumor/ Lymphknotenmetastase	106
4.11 Klinische Aspekte	113
4.12 Fazit	115
4.13 Ungeklärte Fragen	116
<u>5. Zusammenfassung</u>	119
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	122
<u>7. Anhang</u>	140
7.1 St. Gallen-Consensus Kriterien	140
7.2 pTNM-Klassifikation Mammakarzinom	141
7.3 Klinische Stadiumeinteilung nach UICC	142
7.4 Evaluationskriterien neuer biologischer Tumormarker	142
7.5 Lösungen und Reagenzien	143
7.6 Abkürzungsverzeichnis	144
7.7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	146
<u>8. Danksagung</u>	151

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Bedeutung und allgemeine Epidemiologie

Bösartige Erkrankungen stellen in der Bundesrepublik und den westlichen Industrienationen nach den Erkrankungen von Herz und Kreislauf die zweithäufigste Todesursache dar (Statistisches Bundesamt, 1998).

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Krebserkrankung der Frau dar und ist für ca. 26% aller Malignomneuerkrankungen bei Frauen verantwortlich (Deutsche Krebsgesellschaft, 2003). Brustkrebs kommt zwar bei beiden Geschlechtern vor, aber die Inzidenz beim Mann ist um ein 100faches geringer als bei der Frau.

Schätzungsweise erkrankt jede zehnte, ansonsten gesunde Frau, in ihrem Leben an Brustkrebs. Aus Feldstudien und dem Tumorregister des Saarlandes wird eine Zahl von circa 45000 Neuerkrankungen an Brustkrebs im Bundesgebiet angenommen (Robert Koch Institut Berlin, 2000). Bezüglich des Erkrankungszeitpunktes läßt das Patientenkollektiv von Feldstudien einen Altersschwerpunkt von 50 bis 60 Jahren bei Erstdiagnosenstellung erkennen (siehe Abb. I.1). So liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 61,5 Jahren mit einer Standardabweichung von 13,2 Jahren (Tumorzentrum München, 2001). Die Inzidenz der Erkrankung wird bei den 30- 35jährigen auf 22, bei den 40- 45jährigen auf 138, bei den 60- 65jährigen auf 232 und bei den 75- 80jährigen auf 288/100000 altersgleicher Frauen geschätzt (Statistisches Landesamt Saarland, 1998). Die Behauptung, immer mehr jüngere Frauen würden an einem Mammakarzinom erkranken, konnte bislang in Studien nicht nachgewiesen werden.

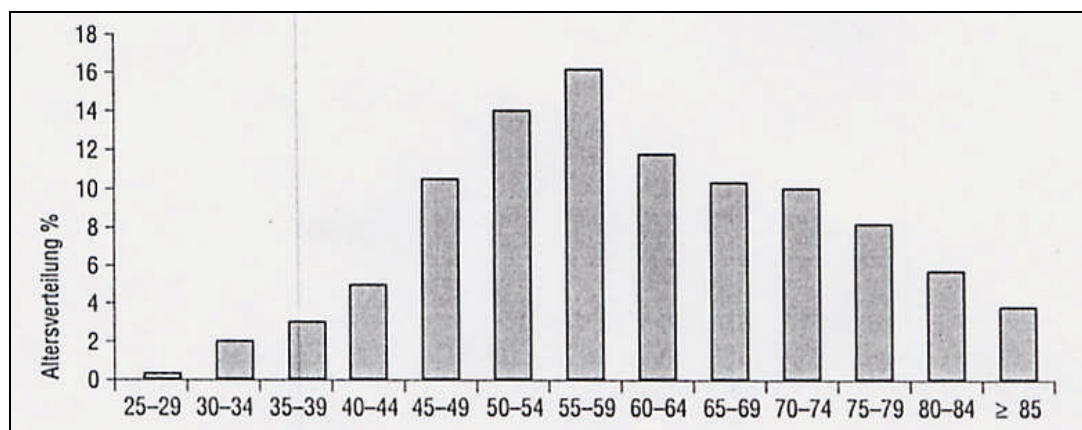


Abb.I.1: Altersspezifische Inzidenz (Stadtgebiet München) des Mammakarzinoms

(aus: Engel J et al., 2000)

Allein in Deutschland sterben jährlich etwa 20000 Frauen an dieser bösartigen Erkrankung, die in der Altersgruppe der 35 bis 55jährigen sogar die häufigste Todesursache ist und nach dem Bronchial- und kolorektalem Karzinom die höchste Sterblichkeit bezüglich aller Malignome aufweist (Statistisches Bundesamt, 1998). Die Mortalität des Mammakarzinoms ist bezüglich der Altersgruppenverteilung in der Gruppe der postmenopausalen Frauen und hier insbesondere bei den über 75jährigen am höchsten (siehe Abb. I.2). Mortalitätsstatistiken sind allerdings mit Vorsicht zu beurteilen, da es sich bei Mammakarzinomen um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit unterschiedlichen Verläufen, therapeutischen Möglichkeiten und Prognosen handelt.

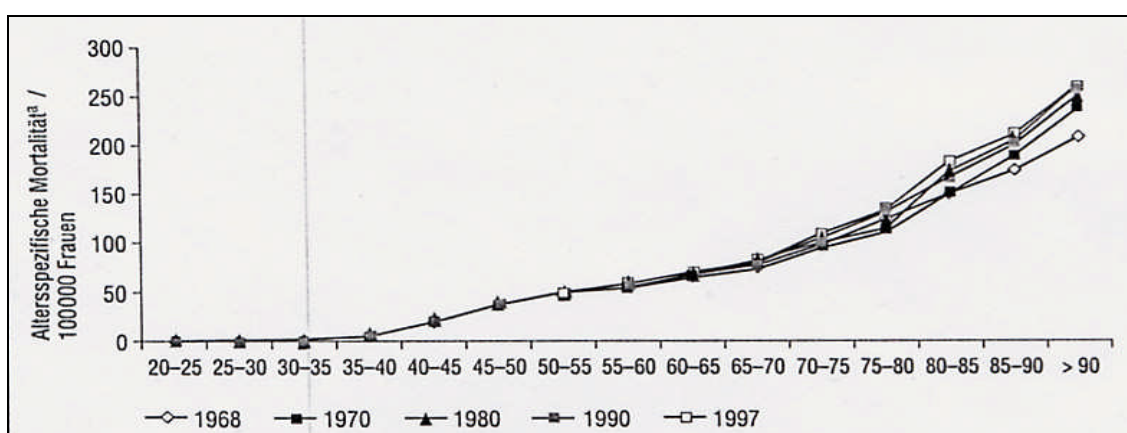


Abb. I.2: Altersspezifische Mortalitätsraten in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 1998)

Globaler Vergleich von Inzidenz und Mortalität (Wandel und Häufigkeitsunterschiede)

Die Inzidenz des Mammakarzinoms ist besonders hoch in der weißen Bevölkerung der USA, in England, Skandinavien und der Bundesrepublik Deutschland, wesentlich niedriger hingegen in Japan, den romanischen Ländern, Südamerika und bei Angehörigen schwarzer Bevölkerungsgruppen. Der Grund für diese unterschiedlichen Erkrankungsraten ist unbekannt. In der Diskussion laufender Untersuchungen darüber werden genetische Faktoren, unterschiedliche Ernährungsweisen und Fertilität hierfür verantwortlich gemacht. Auch in den Mortalitätsraten (= Sterblichkeitsraten) an Brustkrebs erkrankter Frauen lassen sich wie bei den Inzidenzwerten im weltweiten Vergleich deutliche Schwankungen erkennen. Während europäische Länder und die USA mit einer durchschnittlichen Mortalität von über 20/100000 erkrankter Frauen an der Spitze liegen, ist das Mammakarzinom im asiatischen Raum mit einer Mortalität von unter 5/100000 eine eher seltene Erkrankung. Aber auch im innereuropäischen Vergleich lassen sich statistische Unterschiede ausmachen. So zeigen

Länder wie Dänemark, die Niederlande und Großbritannien höhere, Länder wie Schweden und Norwegen niedrigere Mortalitätsraten als Deutschland (Levi F et al., 1999).

Während in Deutschland die Mortalität vor allem in der Zeit von 1967- 1986 einen Anstieg erfuhr und sich seitdem die Zahlen auf einem konstantem Plateau bewegen, findet in den USA, Kanada und England seit circa 25 Jahren ein stetiger Rückgang der Sterblichkeit von bis zu 20 % statt (Blanks RG et al., 2000). In den USA scheinen die verbesserte Früherkennung und Fortschritte in der adjuvanten Behandlung von Brustkrebs im Frühstadium den Rückgang der Mortalität in den letzten Jahren erklären zu können (Mettlin C et al., 1999).

Weshalb trotz diagnostischer und therapeutischer Fortschritte in der Bundesrepublik Deutschland eine seit Jahren konstante Mortalitätsrate zu beobachten ist, bleibt jedoch bislang unklar (Tumorzentrum München, 2001).

Risikofaktoren

Zahlreiche Risikofaktoren werden mit dem Auftreten von Mammakarzinomen in Verbindung gebracht. Genetische, hormonelle und ethnische Faktoren sowie einige Vorerkrankungen der Mamma werden als begünstigend und gesichert für die Entstehung eines Mammakarzinoms angesehen:

Genetische Risikofaktoren:

Circa 5 % aller Mammakarzinome sind auf eine erbliche Prädisposition zurückzuführen. Frauen mit Mutationen in einem der prädisponierenden Gene besitzen ein hohes Risiko, meist früh in ihrem Leben (vor dem 50. Lebensjahr) neben anderen Tumoren an einem Mammakarzinom zu erkranken. Neben einem früheren Krankheitsbeginn als bei spontan auftretenden Mammakarzinomen ist bei den hereditären Formen häufiger auch ein bilaterales und multifokales Tumorwachstum zu beobachten. Aufgrund der genetischen Heterogenität konnte aber bislang nur bei ungefähr 20 % der Familien mit einem hohen Brustkrebsrisiko die kausale Mutation gefunden werden (Deutsche Krebsgesellschaft, 2003).

Mit der Entdeckung von mit spezifischen Tumoren oder familiären Tumorsyndromen assoziierten Genen (RB1, TP53, WT1, NF1, NF2, VHL, APC, BRCA) konnten Hinweise für die genetische Ursache des hereditären Mammakarzinoms gewonnen werden. Hierbei kommt bislang dem BRCA1 Gen die größte Bedeutung zu. So konnte gezeigt werden, daß bei

ungefähr 50 % der familiär auftretenden Fälle von Mammakarzinomen eine kausale Mutation dieses Genes nachzuweisen ist (Easton DF et al., 1993).

Da jedoch bislang eine Reihe unterschiedlichster Mutationen für dieses Gen nachgewiesen werden konnte, erweist sich die klinische Anwendung eines einheitlichen Screening-Tests schwierig. Bei der Onkogenese sporadisch auftretender Mammakarzinome scheinen diese Mutationen jedoch keine Rolle zu spielen.

An der Entstehung des Mammakarzinoms beteiligte Gene	Assoziierte Tumorerkrankungen	Chromosomenlocus
BRCA 1 und 2	Mamma-und Ovarialkarzinom	17q 21
VHL- Tumorsuppressorgen	Mamma-und Nierenzellkarzinom	3p 13
p53- Tumorsuppressorgen	Li-Fraumeni-Syndrom	17p 13
RB- TSG (Retinoblastom- Tumorsuppressorgen)	Mammakarzinom, Osteosarkom und Retinoblastom	13q 14

Tab. I.1: Betroffene Gene bei familiär assoziierten Tumorsyndromen mit Mammakarzinom (Auszug)
(modifiziert nach Riede UN, 1995)

Endokrine Risikofaktoren:

Kontroverse Diskussionen fanden in den letzten Jahren über die Frage, ob eine postmenopausale Hormonersatztherapie das Risiko für Brustkrebs erhöhe, statt. Die meisten Autoren sprechen von einem erhöhten Risiko um den Faktor 1,5 bei länger als 5 Jahre dauernder Östrogenzufuhr, unabhängig von gleichzeitiger Gestagengabe.

Die Hormonersatztherapie sollte deshalb bei Frauen mit einem insgesamt erhöhtem Risikoprofil für ein Mammakarzinom kritisch überdacht werden, auch wenn für das Gesamtkollektiv hormonsubstituierter Patientinnen eine Senkung der Gesamtmortalität nachgewiesen werden konnte (Beckmann MW et al., 2000). Für Beteiligung endokriner Faktoren in der Ätiologie des Mammakarzinoms spricht auch das geringere Risiko für Erstgebärende unter 20 Jahren, Vielgebärende, lang stillende und ovariectomierte Frauen, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Bei der Einnahme oraler Kontrazeptiva konnte jedoch

bislang kein erhöhtes Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden (Tumorzentrum München, 2001).

In verschiedenen Studien wurden als Risikofaktoren unter anderem auch Zusammenhänge mit Ernährungsgewohnheiten (fette Nahrung), psychischen Faktoren und regelmäßigem Alkoholkonsum beobachtet. Hierbei konnte allerdings bislang der Nachweis eines sicheren Zusammenhanges noch nicht erbracht werden.

Eine Zusammenfassung von nachgewiesenen Risikofaktoren ist aus nachfolgender Tabelle ersichtlich:

Vorerkrankungen der Brust	Individuelle Faktoren
Mastopathie Grad III und II (bedingt)	Alter bei erster Lebendgeburt (> 30 Jahre vs. < 20 Jahre)
Duktales Carcinoma in situ (DCIS)	Alter bei Menopause (> 55 Jahre vs. < 55 Jahre)
Lobuläre Neoplasie (LIN)	Alter (> 50 Jahre vs. < 50 Jahre)
Gutartige Läsion: atypische Hyperplasie	Alter bei Menarche (< 12 Jahre vs. > 14 Jahre)
Gutartige Brusterkrankung: Biopsie (mit jedem histologischen Befund)	Positive Familienanamnese (Verwandtschaft ersten Grades)
Hormonersatztherapie	Familiäre Belastung
Östrogensubstitution mit oder ohne Gestagen- gabe	BRCA-1 Mutationsträgerinnen

Tab. I.2: Übersicht Risikofaktoren Mammakarzinom (Tumorzentrum München, 2001)

1.2 Pathologie des Mammakarzinoms

Aktuelle pathomorphologische Klassifizierung des Mammakarzinoms nach WHO

Die histologische Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach der WHO mit Unterscheidung zwischen nicht- invasiven bzw. invasiven Formen. Einen Überblick über die wichtigsten Entitäten soll nachfolgende Tabelle (Tab. I.6) geben (Tavassoli FA et al., 2003):

Nicht- invasive Neoplasien	Invasive Karzinome
Intraduktale proliferative Läsionen <i>Duktale Hyperplasie</i> <i>Atypische duktale Hyperplasie</i> <i>Duktales Karzinom in situ</i>	Duktales Karzinom <i>Mischtyp</i> <i>Pleomorpher Typ</i> <i>Karzinom mit osteoklastischen Riesenzellen</i> <i>Karzinom mit choriokarzinomatöser Differenzierung</i> <i>Karzinom mit melanotischer Differenzierung</i>
Lobuläre Neoplasie <i>Lobuläres Karzinom in situ</i>	Lobuläres Karzinom
Intraduktale papilläre Neoplasie <i>Zentrales Papillom</i> <i>Peripheres Papillom</i> <i>Atypisches Papillom</i> <i>Intraduktales papilläres Karzinom</i> <i>Intrazystisches papilläres Karzinom</i>	Muzinöses Karzinom und andere Tumore mit aberranter Schleimproduktion <i>Muzinöses Karzinom</i> <i>Zystadenokarzinom</i> <i>Siegelringzellkarzinom</i>
Mikroinvasives Karzinom	Medulläres Karzinom
	Tubuläres Karzinom
	Invasives papilläres Karzinom
	Invasiv mikropapilläres Karzinom
	Inflammatorisches Karzinom
	Karzinom mit Metaplasie <i>Rein epithelial metaplastisches Karzinom</i> <i>Squamöses Karzinom</i> <i>Adenokarzinom mit Spindelzellmetaplasie</i> <i>Adenosquamöses Karzinom</i> <i>Mukoepidermoides Karzinom</i> <i>Gemischt epithelial/mesenchymales metaplastisches Karzinom</i>

Tab. I.3: Modifizierte pathomorphologische Einteilung der Mammakarzinome gemäß WHO
(aus Tavassoli FA, 2003)

Die pathomorphologische Klassifikation von invasiven Mammakarzinomen erfolgt nach den derzeit üblichen Definitionen in drei Kategorien:

- duktaler Typ (nicht weiter spezifizierbar)
- lobulärer Typ (mit Subtypen)
- Sonstige

Nachfolgend soll eine kurze Beschreibung der häufigsten histologischen Typen erfolgen. Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung, sieht man, dass das invasiv- duktale Karzinom mit 65- 80 % Anteil an den invasiven Formen bei weitem am häufigsten ist. Mit abnehmender Häufigkeit folgen das invasiv- lobuläre (6- 15 %) und seltenere Formen wie medulläres (3 %), tubuläres (1- 15 %), muzinöses (1- 2 %) und papilläres Karzinom (1- 2 %). Hinsichtlich der Prognose sind tubuläre, papilläre und muzinöse Formen am günstigsten, da sie nur in schätzungsweise 10 % der Fälle Langzeitrezidive zeigen (Simpson JF et al., 1994; Rosen PP et al., 1989).

Duktales Karzinom (siehe Abb. I.3 u. I.4; S.13):

Histogenetisch leiten sich diese Karzinome von den Milchgängen ab und werden gemäß ihrem Invasionsverhalten in invasiv beziehungsweise nicht- invasiv unterschieden. Nicht- invasive Formen (sog. DCIS) bleiben anatomisch auf die Milchgänge ohne Stromainvasion beschränkt. Die Tumorepithelien bilden je nach Ausdifferenzierung ein solides, papilläres oder Drüsen- und Drüsen- artiges Wachstumsmuster. Neoplastisch veränderte Milchgangssysteme mit einem großen Anteil intraduktaler Tumorzellen, zentralen Nekrosen und oftmals nachweisbaren Verkalkungen (Mikrokalk), werden auch als Komedokarzinom bezeichnet. Untersuchungen auf Kerngrading (niedrig, intermediär, hoch) und Beurteilung nekrotischer Areale (Komedo, punktförmig), Zellpolarität und Architektur lassen klinisch wichtige Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs oder Mikrometastasierung zu (The Consensus Conference Committee, 1997). Bei der invasiven Form des duktales Karzinoms lassen sich Tumorfiltate in dem die Milchgänge umgebenden Stroma erkennen. Je nach Tumordifferenzierung weist der Tumor histologisch Drüsencharakter oder mehr eine stromale Komponente mit einzelnen disseminierten Tumorzellen auf. Invasive Karzinome weisen häufig eine stark ausgeprägte Kernpolymorphie auf. Die Größe des intraduktalen Tumor-

anteils wird zur chirurgischen Therapieplanung herangezogen und soll laut einiger Autoren auch Aussagekraft über das Rezidivrisiko besitzen.

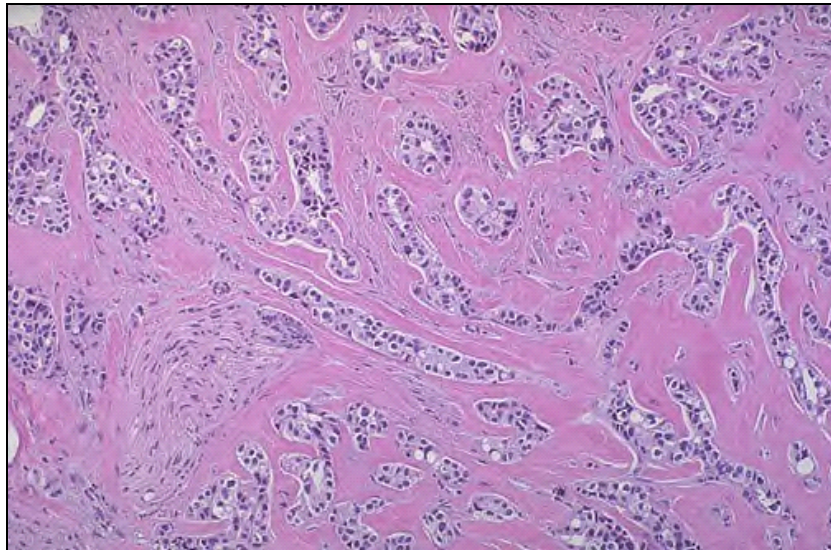


Abb. I.3: Übersichtsvergrößerung eines typischen invasiv- duktalen Mammakarzinoms: Erkennbar sind kleine Tumorzellnester umgeben von kollagenem Gewebe; das dichte fibröse Stroma bedingt den szirrösen Aspekt des Karzinoms (Färbung HE) (<http://www.medlib.med.utah.edu>)

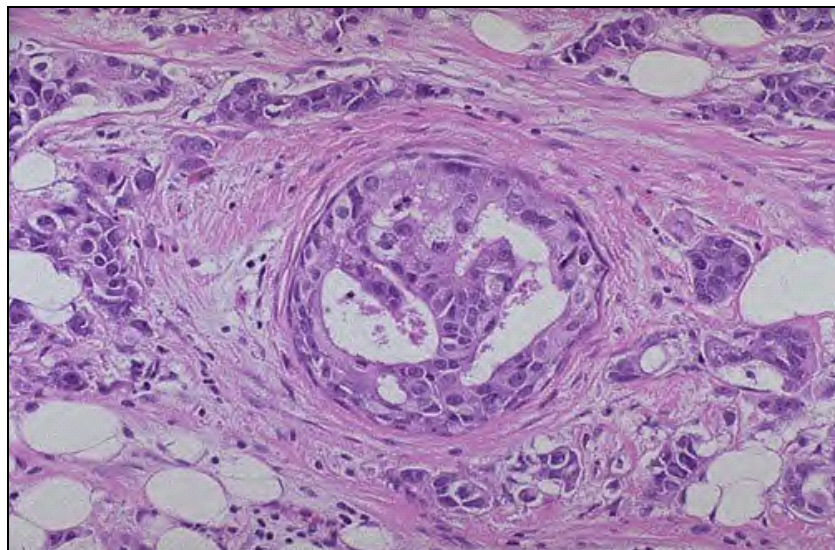


Abb. I.4: Invasiv- duktale Mammakarzinom in stärkerer Vergrößerung: Erkennbar ist die starke Pleomorphie der malignen Zellen sowie die Infiltration von Stroma und Fettgewebe (HE-Färbung) (<http://www.medlib.med.utah.edu>)

Lobuläres Karzinom (siehe Abb. I.5 u. I.6):

Die lobulären Mammakarzinome haben als Ausgangspunkt die Azini der Drüsenläppchen. Analog zu den duktalem lassen sich auch bei den lobulären Karzinomen nicht- invasive und invasive Formen unterscheiden. Nach der WHO wird die nicht- invasive lobuläre Neoplasie als Karzinom definiert, welches die intralobulären Duktuli ohne jegliche Stromabeteiligung ausfüllt (WHO, 1981). Zytologisch imponieren gleichförmige Zellen mit kleinen Kernen. Die LIN stellt eine präkanzeröse Läsion dar, allerdings mit deutlich geringerer maligner Potenz als das DCIS, so dass es hauptsächlich als Indikator für ein erhöhtes Karzinomrisiko angesehen wird (Remmele W(ed), 2001). Häufig tritt es als Zufallsbefund multizentrisch (46- 85 %) und bilateral (30- 67 %) auf (Tumorzentrum München, 2001).

Das invasiv lobuläre Karzinom weist die typisch gänsemarschartigen Tumorzellreihen, die oftmals die Milchgänge umgeben, auf. Die kleinen Tumorzellen zeigen ein diffus- infiltrierendes Wachstum mit begleitender Desmoplasie. Bei varianten Typen des lobulären Karzinoms stehen solide, alveoläre, siegelringzellige oder tubulo- lobuläre Wachstumsformen im Vordergrund.

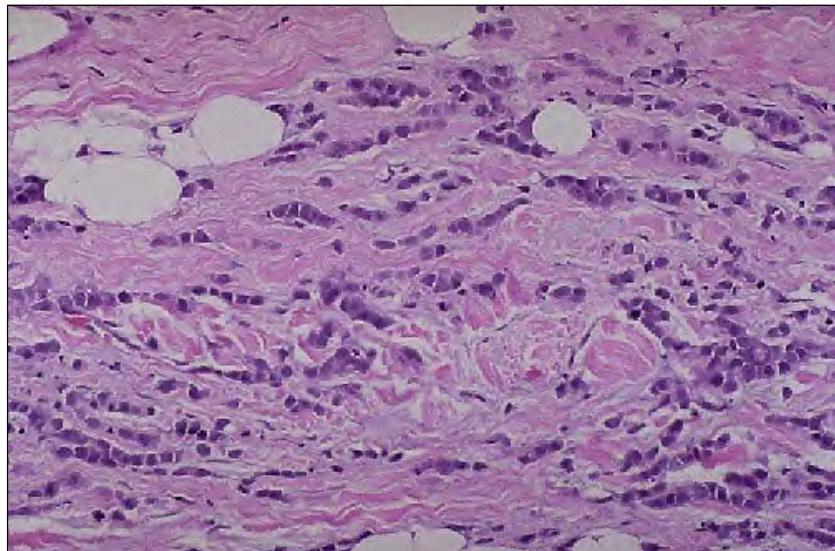


Abb. I.5: Invasiv- lobuläres Mammakarzinom: In der mittleren Vergrößerung ist die typische gänsemarschartige Anordnung der Tumorzellen erkennbar (HE-Färbung) (<http://www.medlib.med.utah.de>)

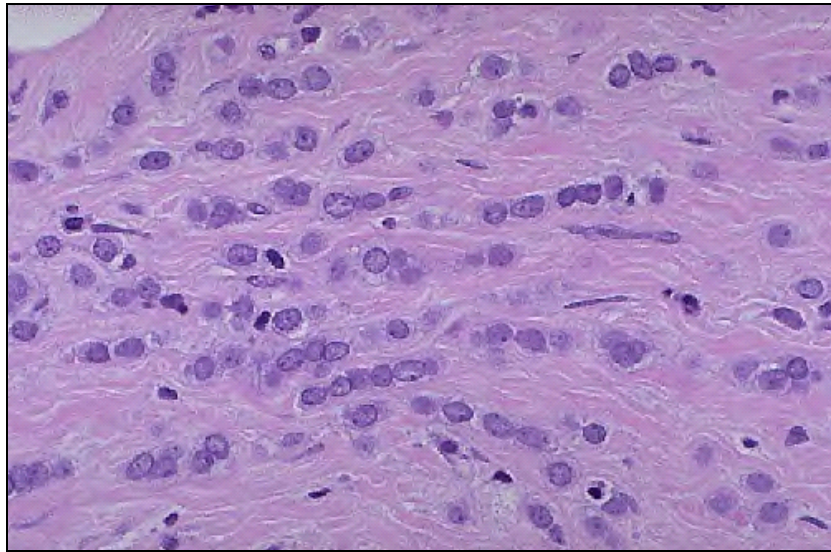


Abb. I.6: Invasiv- lobuläres Mammakarzinom: Bei stärkerer Vergrößerung stellen sich die Tumorzellen bei geringerem Pleomorphiegrad einheitlicher als beim invasiv- duktalem Mammakarzinom dar (HE-Färbung) (<http://www.medlib.med.utah.de>)

Inflammatorisches Karzinom:

Als Sonderform sei das inflammatorische Mammakarzinom erwähnt. Hierbei handelt es sich nicht um eine eigene Entität, sondern um eine Sonderform eines gering differenzierten invasiv- duktalem Karzinoms mit ausgeprägter Lymphangiosis carcinomatosa.

1.3 Klinische Aspekte

Klinische Stadieneinteilung:

Nur noch selten wird heute postoperativ eine Stadieneinteilung der Patientinnen in Stadium 0-4 nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) vorgenommen, aus der eine grobe Abschätzung der Prognose möglich ist (siehe Anhang 7.3; S. 142). Die Bestimmung der anatomischen Ausbreitung der Mammakarzinome erfolgt heute nach der TNM- Klassifikation (6. Aufl. UICC 2002). Dabei kann eine klinische Klassifikation (TNM) von einer verlässlicheren pathologischen Klassifikation (pTNM) (siehe Anhang 7.2; S. 141f.) unterschieden werden. Aufgrund der Tatsache, dass die operative Entfernung des Tumorgewebes

immer angestrebt wird, ist es üblich, dass die endgültige Stadieneinteilung erst postoperativ vorgenommen wird.

Da eine präoperative Tastuntersuchung eine Abschätzung der Tumorgöße nur mit einer Sensitivität zwischen 44 und 70 % erlaubt und die Palpation der axillären Lymphknoten mit einer hohen Fehlerquote behaftet ist, ist die postoperative Einteilung nach Entfernung des Primärtumors und axillärer Lymphknotenentfernung durch den Pathologen (pTNM) am verlässlichsten und erlaubt Aussagen hinsichtlich Prognosebeurteilung und therapeutischem Vorgehen. In die pTNM-Klassifizierung gehen die Größe des Primärtumors, eine eventuelle Ausbreitung des Tumors auf die Brustwand, vorhandene Hautulzerationen, die Ausbreitung in regionale Lymphknoten und Fernmetastasierung ein (Deutsche Krebsgesellschaft, 2003).

Hinsichtlich des Ausschlusses einer Fernmetastasierung werden heute alle Frauen mit primärem Mammakarzinom einer Staginguntersuchung zugeführt. Das Vorhandensein einer Fernmetastasierung (UICC Stadium IV bzw. M 1 nach TNM-Klassifikation) schließt einen kurativen Behandlungsansatz aus und spielt für Patientinnen prognostisch eine große Rolle. Um die häufigsten Lokalisationen einer Fernmetastasierung abzudecken, wird bei allen Patientinnen mit gesichertem Mammakarzinom eine Röntgen- Thoraxaufnahme in zwei Ebenen, eine Sonographie der Leber und ein Knochenszintigramm (bei entsprechender Klinik oder Metastasenverdacht) durchgeführt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2003).

Klinische Bedeutung von Prognosefaktoren:

Frühere Beobachtungen zeigten, dass die 10- Jahresüberlebensrate bei Frauen, die nach der Diagnosestellung Mammakarzinom lediglich mit einer radikalen Mastektomie behandelt wurden, nur 12 % betrug. Auch zeigte sich, dass bei rund 20- 30 % der nodal negativen Patientinnen früher oder später Fernmetastasen auftraten. Daraus zog man den Schluß, dass bei diesen Fällen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Mikrometastasierung des Primärtumors vorgelegen haben muß (Fisher B et al., 1978). Aus groß angelegten Studien ging hervor, dass eine geeignete adjuvante systemische Hormon- oder Polychemotherapie das Rezidivrisiko und die Todesrate von Mammakarzinompatientinnen in frühen Krankheitsstadien senken kann (Early Breast Cancer Collaborative Group, 1998). Da solche adjuvanten Therapieregime aber mit teilweise sehr starken Nebenwirkungen und Risiken behaftet sind, welche eine große Belastung für die Betroffenen darstellen, ergibt sich die Notwendigkeit einer individuellen Therapieplanung. Bei der Auswahl der richtigen Behandlungsform spielt der Nodalstatus der Patientinnen eine wichtige Rolle. Seit 1995 gelten für die Indikation und

Durchführung einer adjuvanten Chemo- und Hormontherapie die Richtlinien der St. Galler Konsensus- Konferenz 2001 (siehe Anhang 7.1; S. 140). Grundsätzlich unterscheidet man nodal positive von nodal negativen Patientinnen. Während alle Patientinnen mit Lymphknotenbefall eine adjuvante Therapie erhalten, muss bei den nodal negativen Fällen zwischen Vorteilen und Nebenwirkungen einer solchen Behandlung im Einzelfall abgewogen werden. Zur Abschätzung des individuellen Krankheitsverlaufes werden Prognosefaktoren herangezogen. Prädiktive Faktoren werden zur optimalen Therapieplanung benötigt.

Ein Prognosefaktor ist definiert als ein zum Zeitpunkt der Diagnose und Operation verfügbares Maß und steht in Beziehung mit der rezidivfreien bzw. der Gesamtüberlebenszeit (DFS u. OS) in Abwesenheit einer adjuvanten systemischen Therapie (MCGuire WL et al., 1992; Clark GM et al., 1996). Hiervon zu unterscheiden sind prädiktive Faktoren, die Aussagen über den Therapieerfolg und das Therapieansprechen machen. Für Clark et al. geht der Wert und die Notwendigkeit von prognostischen und prädiktiven Faktoren aus drei Hauptpunkten hervor (Clark GM et al., 1994):

1. Identifizierung von Patientinnen, die nach Risikoabwägung aufgrund einer relativ guten Prognose keinen Vorteil aus einer adjuvanten systemischen Therapie ziehen können;
2. Identifizierung von Patientinnen, für die eine systemische adjuvante Therapie aufgrund einer schlechten Prognose gerechtfertigt ist;
3. Identifizierung von Patientinnen, die für verschiedene Therapieformen geeignet sind;

Traditionelle etablierte Prognosefaktoren

Als etablierte und klinisch akzeptierte Prognosekriterien mit der stärksten Aussagekraft über den klinischen Erkrankungsverlauf beim Mammakarzinom werden der axilläre Lymphknotenstatus, die Größe des Primärtumors und die Fernmetastasierung angesehen (American Joint Committee on Cancer, 1997). Darüber hinaus lassen sich nützliche prognostische Informationen mithilfe des Hormonrezeptorstatus, der histopathologischen Klassifikation des Tumors, des Gradings und des Lebensalters der Patientin gewinnen:

Axillärer Lymphknotenstatus:

Der axilläre Lymphknotenstatus ist beim Mammakarzinom im Frühstadium der wichtigste

Prognosefaktor. Die Wahrscheinlichkeit eines axillären Lymphknotenbefalls steigt mit zunehmender Größe des Primärtumors. Ebenso besteht eine direkte Beziehung zwischen der Anzahl der befallenen Lymphknoten und dem Risiko für die Entwicklung von Fernmetastasen (Saez RA et al., 1989). Folgende Tabelle (Tab. I.4) belegt diesen Sachverhalt unter Einbeziehung der 5- Jahresüberlebensrate (5- JÜR) (Fisher B et al., 1983):

Anzahl der befallenen Lymphknoten	5- Jahresüberlebensrate (5- JÜR)
0	82,8 %
1-3	73 %
4-12	45,7 %
>13	28,4 %

Tab. I.4: Beziehung zwischen Anzahl der befallenen Lymphknoten und der 5- JÜR bei Mammakarzinom
(nach Fisher B et al., 1983)

Tumorgröße:

Die Primärtumorgröße korreliert einerseits mit dem Auftreten und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen, andererseits stellt sie bei nodal negativen Patientinnen den wichtigsten Prognosefaktor dar. Carter et al. beobachteten in einer prospektiven Studie eine Korrelation zwischen der Primärtumorgröße bei nodal negativen Patientinnen und der Abnahme der 5- JÜR (Carter CL et al., 1989). Einige Autoren konnten in ihren Langzeit- Follow-up- Untersuchungen diesen Zusammenhang zwischen Primärtumorgröße und dem Auftreten eines späteren Rezidivs sogar über einen Beobachtungszeitraum von 20 Jahren belegen (Rosen PP et al., 1993; Quiet CA et al., 1995).

Histopathologische Kriterien:

Einen Einfluß auf die Prognose hat auch der jeweils vorliegende histologische Typ des Mammakarzinoms. Tubuläre, muzinöse und medulläre Formen zeigen gutartigere Verläufe. Auch wird bei allen Fällen von Mammakarzinom ein histologisches Grading durchgeführt, bei dem nach einem festgelegtem Schema Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate beurteilt werden (Bloom HJ, 1957; Elston CW, 1991). Auch das Grading lässt bei guter Korrelation mit Lymphknotenstatus und Rezeptorstatus prognostische Aussagen über Rezidivwahrscheinlichkeit und Sterblichkeit zu und kann bei Unklarheit der Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe von Mammakarzinomen dienen (Contesso G et al., 1987; Le Doussal V et al., 1989). Dennoch herrscht über die prognostische Aussagekraft des Gradings derzeit

aufgrund unterschiedlicher Studienergebnisse noch Uneinigkeit. Trotz einer weitgehend standardisierten Vorgehensweise bei der Einstufung des Gradings findet dessen Aussagekraft insbesondere durch die subjektive Beobachtungsvariabilität des Untersuchers eine Einschränkung (Gilcrest K et al., 1985; Page DL et al., 1998; Dalton LW et al., 2000). Erwähnt sei an dieser Stelle noch, dass auch eine Lymphangiosis carcinomatosa oder eine mikroskopisch erkennbare Gefäßinvasion als histologischer Befund Einfluß auf die Rezidiv- und Gesamtüberlebensrate haben (Neville AM et al., 1992).

Hormonrezeptorstatus:

Der Östrogen/Progesteronrezeptorstatus (ER/PR) ist als eigenständiger Prognosefaktor nur eingeschränkt geeignet, da die Datenlage derzeit noch unsicher ist. Hinweise existieren jedoch dafür, dass rezeptorpositive Tumoren zumindest in den ersten Krankheitsjahren eine geringere Krankheitsprogression und Rezidivrate als hormonrezeptornegative Mammakarzinome zeigen (Hilsenbeck SG et al., 1998). Größere Bedeutung besitzt der Hormonrezeptorstatus als prädiktiver Faktor. Die antihormonelle Behandlung mit Tamoxifen, einem Östrogenantagonisten, senkt insbesondere bei rezeptorpositiven Karzinomen mit nodal positivem Befund die Rezidivhäufigkeit und Mortalitätsrate, was bei rezeptornegativen Mammakarzinomen nicht belegt werden konnte (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, 1998).

Patientenalter:

Viele Studien haben sich mit dem Einfluß des Erkrankungsalters auf den Krankheitsverlauf beschäftigt. Zwei größer angelegte Studien konnten unter Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren schlechtere Krankheitsverläufe bei Patientinnen mit Mammakarzinom, deren Diagnose vor dem 35. Lebensjahr gestellt wurde, ausmachen (Nixon AJ et al., 1994; Albain KS et al., 1994).

Klinische Notwendigkeit für neue Prognosefaktoren

Trotz verbesserter medikamentöser Therapie und individuellerer Therapieplanung entwickeln heute immer noch viele nodal positive Patientinnen trotz adjuvanter systemischer Chemo- und/oder hormoneller Therapie im weiteren Krankheitsverlauf Rezidive und Früh- oder Spätmetastasen. Viele nodal negative Patientinnen werden unter Berücksichtigung der traditionellen Prognosefaktoren mit nebenwirkungsreichen Therapieschemata behandelt, obwohl sie nur zu etwa einem Drittel Fernmetastasen entwickeln (Zujewski J et al., 1998). In

Anlehnung an die St. Gallen Konsensus- Kriterien und die NIH- Kriterien könnten so 70- 80 % der nodal negativen Patientinnen einer adjuvanten Therapie umsonst zugeführt werden (Van't Veer LJ et al., 2003). Diese Diskrepanz förderte in der Forschung die Suche nach neuen Prognosefaktoren, um dem individuellen Krankheitsverlauf der Patientinnen mit Mammakarzinomen gerechter zu werden. Für die Evaluierung neuer Prognosefaktoren ist hierbei entscheidend, auf welcher Evidenzstufe (LOE) der Wertigkeitsnachweis durchgeführt wurde (Hayes DF et al.; 1996). Bei der 5- stufigen Klassifikation der Evidenzstufen spielt die Art der Datenerhebung und die Wahl des Studiendesigns der Untersuchungen eine herausragende Rolle. Die Stufe I stellt hierbei den höchsten, die Stufe V den niedrigsten Evidenzgrad dar. Folgende Tabelle (Tab. I.5) gibt einen Überblick über die Evidenzstufen im Rahmen der Evaluation neuer Prognosemarker:

Evidenzstufe (LOE)	Art des Wertigkeitsnachweis
I	Beweis aus zielgerichteten prognoseorientierten prospektiven Studien oder Meta-analyse von Studien geringeren Evidenzgrades
II	Beweis aus sekundär prognoseorientierten Begleitstudien zu großen klinischen Studien; prospektive Ausrichtung
III	Beweis aus retrospektiven Studien; Patientendaten aber oft inkomplett
IV	Beweis aus retrospektiven Studien ohne prospektive Therapieberücksichtigung
V	Beweis aus kleinen Pilotstudien mit der Zielsetzung der Entdeckung und Verteilung neuer Marker in Beispielgruppen

Tab. I.5: Klassifikation der Evidenzstufen zur Evaluierung neuer Prognosefaktoren

(nach Hayes DF et al., 2001)

Durch eine Vielzahl von biochemischen, zellkinetischen und genetischen Untersuchungen konnte man Faktoren entdecken, die zur Malignität und Aggressivität von Tumorzellen beitragen. Dies sind Faktoren der Proteolyse und Adhäsion, die den Tumorzellen eine

Invasion in das umliegende Gewebe ermöglichen, Faktoren der Proliferation (Wachstum), Migration (Wanderungsfähigkeit) und der Metastasierung (Fremdabsiedelung).

Hierbei wird immer deutlicher, daß für den Patienten mit einer malignen Erkrankung nicht nur der frühe Zeitpunkt der Diagnosestellung, sondern auch die Erfassung der individuellen Tumorbiologie von großer Bedeutung ist. Durch Untersuchung dieser tumorbiologischen Eigenschaften kann man demnach im Idealfall Rückschlüsse prognostischer Art ziehen, die zu neuen therapeutischen Überlegungen führen. Unter dem biologischen Verhalten eines Tumors versteht man diejenigen Eigenschaften eines Tumors, die für Wachstum und Ausbreitung in einem Wirtsorganismus notwendig sind. Bei vielen dieser weit über 100 charakterisierten Faktoren gab es jedoch bislang weder einen Überlegenheitsnachweis gegenüber etablierten Faktoren, noch ließen sich irgendwelche relevante therapeutische Konsequenzen erkennen. So konnten die meisten neueren Prognosefaktoren nur den Evidenzgrad III oder niedriger erreichen (Hayes DF et al., 1996).

Eine zusätzliche Schwierigkeit ergibt sich zum Teil aus den nicht standardisierten Bestimmungsmethoden, was derzeit eine breite klinische Anwendung neuer Tests verhindert. Den einzigen tumorbiologischen Faktor, der zumindest bei nodal positiven Mammakarzinompatientinnen prognostische Signifikanz erlangt hat, stellt das HER-2/neu Proto-Onkogen dar. Bei nodal negativen Mammakarzinomen hingegen konnte die prognostische Bedeutung bislang nicht eindeutig erwiesen werden (Trock BJ et al., 2000). Größer angelegte Studien geben jedoch auch bei diesen Patientinnen Hinweise auf den prognostischen Wert des Her-2/neu Proto-Onkogens (Di Giovanna MP, 1999) (siehe unten).

Onkogene leiten sich von normalen Zellgenen, den Proto-Onkogenen ab, die bei physiologischem Bedarf über Transduktion von zellulären Wachstumssignalen an der Entstehung neuer Zellen beteiligt sind, ansonsten aber in inaktivem Zustand vorliegen. Karzinogen-induzierte Mutationen und endogene Faktoren (z.B. Hormone) können nach der Onkogenhypothese diese dauerhaft in einen aktiven Zustand versetzen, was zu unkontrolliertem Wachstum führt.

Aus molekularbiologischer Sicht werden diese Veränderungen entweder durch Translokation mit oder ohne Rearrangement, Punktmutation, Promotor-Insertion von onkogenen Viren, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder durch Amplifikation ausgelöst. Die Amplifikation stellt eine Vervielfachung von Kopien eines Genes dar, die zu einer vermehrten Onkogenaktivität innerhalb der entsprechenden Zelle führt (Pschyrembel, 1993; Tumorzentrum München, 2001).

HER- 2/neu Proto- Onkogen:

Das HER- 2/neu oder c-erbB- 2 Proto-Onkogen ist auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert. Dieses Proto-Onkogen kodiert ein transmembranöses Phosphoglykoprotein (P185/HER- 2: atomare Masseneinheit 185000 Dalton) mit Tyrosinkinaseaktivität (Schechter AL et al., 1984). Neben HER- 2/neu existieren noch 3 weitere Subtypen (c-erbB- 1, 3, 4), die gemeinsam die c-erbB- Onkogenfamilie bilden (vgl. Tab. I.6; S. 23). Im weiblichen Brustgewebe konnte das Her-2/ neu- Protein in gutartigen Veränderungen, malignen Vorläuferläsionen (duktalen in situ Karzinomen) und invasiven Tumoren nachgewiesen werden. In den späten 80er Jahren wurde erkannt, dass schätzungsweise 20- 30 % der invasiven Primärtumoren eine Überexpression des Her- 2/neu- Gens aufweisen (Slamon DJ et al., 1987). Diese Tumoren zeigten in klinischen Beobachtungen besonders bei nodal positiven Patientinnen ein bösartigeres Verhalten mit höherer Rezidiv- und Todesrate (Slamon DJ et al., 1989; Press MF et al., 1990; Clark GM, 1991; Singleton TP et al., 1992).

In zahlreichen Studien wurde mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen die prädiktive Aussagekraft des Her- 2/neu- Onkogens in Bezug auf das Ansprechen gegenüber antihormonalen, zytostatischen und strahlentherapeutischen Therapieregime diskutiert (Allred DC et al., 1992; Haffty BG et al., 1996; Burke HB et al., 1998; Miles DW et al., 1999; Menard S et al. 2001; Yamauchi H et al., 2001; Ross JS et al., 2003).

Als der am meisten gesicherte Zusammenhang gilt derzeit das geringere Ansprechen Her-2/neu positiver Tumore auf eine antihormonelle Therapie (Dowsett M et al., 2001; Muss HB et al., 2001; Schmid P et al., 2002). Dies ist vermutlich auf die vielfach beobachtete inverse Korrelation von Her- 2/neu und dem Hormonrezeptorstatus zurückzuführen (Revillion F et al., 1998).

Besondere Aufmerksamkeit hat die Möglichkeit des therapeutischen Einsatzes des humanisierten Antikörpers Trastuzumab (Herceptin™) bei Her- 2/neu positiven Tumoren erlangt. Für die antitumorale Wirkungsweise dieses Antikörpers werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht, die jedoch noch nicht vollständig verstanden werden (Sliwkowski MX et al., 1999). Neben immunologischen Mechanismen wird Trastuzumab in Her- 2/neu positiven Zellen unter anderem für eine Beschleunigung endozytotischer Vorgänge verantwortlich gemacht, die zur Herunterregulation und Degradation der Her- 2/neu-Rezeptoren führen (Sarup JC et al., 1991; Lane HA et al., 2000).

Zahlreiche Studien an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom konnten ein Ansprechen auf diese neue Therapieform nachweisen (Baselga J et al., 1996; Cobleigh MA et

al., 1998; Slamon DJ et al., 2001). Derzeit ist für den klinischen Einsatz Trastuzumab in der Bundesrepublik Deutschland nur bei fortgeschrittenen metastasierten Krankheitsstadien von Brustkrebs zugelassen. Weitergehende Untersuchungen beurteilen derzeit den Nutzen von einem Einsatz von Trastuzumab im Rahmen einer neoadjuvanten oder adjuvanten Therapie in früheren Krankheitsstadien. Konkurrierende Verfahren mit jeweils methodenabhängigen Vor- und Nachteilen zur Bestimmung des Her- 2/neu- Status sind immunhistochemische Nachweisverfahren, Verfahren der Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung (Press MF et al., 1997) und RT- PCR (Bieche I et al., 1999; Pawlowski V et al., 2000), sowie der direkte Proteinnachweis mithilfe diverser Blot- Techniken.

Onkogen-Subtyp	Rezeptor	Liganden (Auszug)
c-erbB- 1 (Her- 1)	EGFR (170 KD)	EGF, TGF- α , Beta-Cellulin Heparin binding growth factor, Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin, Epigen
c-erbB- 2 (Her- 2)	Neu-Protein (185 KD)	?
c-erbB- 3 (Her- 3)	c-erB-B3	Heregulin Neu differentiation factor 1+2
c-erbB- 4 (Her- 4)	c-erB-B4	Heregulin Neu differentiation factor 1+2

Tab. I.6: Die c-erbB- Onkogen Familie (Ross JF et al., 1998; Prenzel N et al., 2001)

Neben dem Her- 2/neu- Onkogen, dem am meisten untersuchten Vertreter aus der Familie der Tyrosinkinase (siehe Tab. I.7; S. 24), ist eine Reihe anderer Proto- Onkogene der Rezeptor-tyrosinkinase (RTK) Gegenstand laufender Untersuchungen, die als Regulatorproteine vermutlich für Zellwachstum und Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle bei Tumorprogression und Metastasierung spielen und möglicherweise in Zukunft zu neuen Therapieansätzen führen (Meric F et al., 2002).

Rezeptortyrosinkinasen	Nicht Rezeptortyrosinkinasen
AXL	ARG
C- met	BRK
RET	Janus kinase 1
HEK 8	RAK
Fibroblast growth factor receptor	Yes

Tab. I.7: Proto- Onkogene der Tyrosinkinasen (Auszug) (Meric F et al., 2002)

Eine Gegenüberstellung etablierter klinischer und neuerer, weniger evaluierter Prognosefaktoren findet sich in der nachfolgenden Tabelle (Tab. I.8):

Klassische Prognosefaktoren (Routinebestimmt)	Relative Aussagekraft über klinischen Erkrankungsverlauf	Neuere Prognosefaktoren (Beispiele)	Relative Aussagekraft über klinischen Erkrankungsverlauf
TNM-Status Tumorgroße Axillärer Lymphknotenbefall Fernmetastasierung	Hoch Hoch Hoch	Proliferation und zellkinetische Parameter: DNS-Ploidie S-Phase Fraktion Thymidin-Labeling Index	Mittel- stark Mittel- stark Mittel- stark
Morphologie Grading Histologischer Typ Lymphangiosis carcinomatosa	Mittel Mittel- stark Mittel	Tumorassoziierte Proteolysefaktoren: Urokinase Plasminogenaktivator Plasminogenaktivator-Inhibitor Kathepsin Matrixmetalloproteasen	Mäßig- stark Mäßig- stark Gering- mittel ?

Rezeptorstatus		Immunzytochemischer Nachweis von Mikrometastasen	
Östrogenrezeptor	Gering- mittel	Axilläre Lymphknoten	Gering
Progesteronrezeptor	Gering- mittel	Sentinel Lymphknoten	?
		Knochenmark	Mittel- stark
		Her-2/neu-Onkogen	Schwach- mittel*
		Onkogene/Wachstumsfaktoren (Beispiele): c-erB-3, c-myc, TGF- α , TGF- β , p53, c-int2, c-mam	?
<p><u>Zusatz:</u> Angenommene prognostische Aussagekraft: relatives Risiko für Rezidiv oder Tod bei positivem Marker contra negativem Marker</p> <p>Hohe Aussagekraft: Relatives Risiko > 2 Mittlere Aussagekraft: Relatives Risiko= 1,5- 2 Geringe Aussagekraft: Relatives Risiko < 1,5 (nach Hayes DF et al., 2001)</p> <p>*die prognostische Aussagekraft des Her- 2/neu-Onkogens wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt; der prädiktive Wert im Rahmen unterschiedlicher Therapieregime hingegen wird als hoch eingeschätzt</p>			

Tab. I.8: Übersicht Prognosefaktoren (Tumorzentrum München, 2001; Hayes DF et al., 2001)

1.4 Molekulargenetische Aspekte

Genexpressionsanalyse am Mammakarzinom:

Um den individuell stark variablen Krankheitsverlauf des Mammakarzinoms besser vorherzusagen und gegebenenfalls geeignete therapeutische Maßnahmen einleiten zu können, wurde in den letzten Jahren der Ruf nach einer genaueren molekularen Erforschung des Mammakarzinoms laut. Zielsetzung vieler Forschungsgruppen ist es, durch Untersuchung geeigneter Gene Aufschlüsse über deren Expressionsverhalten in Primärtumoren zu bekommen und daraus eine neue molekularbiologische Klassifikation des Mammakarzinoms, die dem biologischem Verhalten der Tumore aus prognostischer und prädiktiver Sicht gerechter als die traditionellen Prognosefaktoren wird, abzuleiten. Krebserkrankungen sind aus molekularbiologischer Sicht eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, so daß man

davon ausgehen kann, daß in der entarteten Zelle des Primärtumors das Expressionsverhalten einer Vielzahl von Genen, die an Zelladhäsion, Zellkommunikation, Zellstruktur und Proliferationsstoffwechsel beteiligt sind, verändert ist.

Untersuchungen an Einzelgenen haben in der Vergangenheit bis auf wenige Ausnahmen zu einer unsicheren und teilweise widersprüchlichen Datenlage bei der genetischen Phänotypisierung des Mammakarzinoms geführt (Bieche I et al., 1995). Mit der Neu- und Weiterentwicklung leistungsstarker analytischer Methoden entstanden neue vielversprechende Möglichkeiten für die molekulare Charakterisierung des Mammakarzinoms (Pollack JR et al., 1999; Dugan Dj et al., 1999; Golub TR et al., 1999). In den letzten Jahren basierten viele Untersuchungen auf der neuentwickelten Microarray- Technik, welche Einblicke in das Expressionsverhalten einer sehr großen Zahl von Genen ermöglicht. Einigen Autoren gelang am Mammakarzinom, basierend auf derartigen Genexpressionsprofilen, eine Subgruppenunterteilung ihrer Studienfälle (Golub TR et al., 1999; Perou CM et al., 2000; Hedenfalk I et al., 2001; Sorlie T et al., 2001; Ahr A et al., 2001). Eine interessante Zielsetzung vieler derartiger Analysen war die Identifizierung von Genexpressionsmustern, welche geeignet sind, Vorhersagen über den klinischen Erkrankungsverlauf treffen zu können. Hierbei zeigte sich jedoch, dass eine Korrelation mit klinischen Daten oftmals nur unzureichende Ergebnisse ergab. Besondere Aufmerksamkeit konnten jedoch aufgrund vielversprechender Ergebnisse zwei neuere Arbeiten erlangen (Van de Vijver MJ et al., 2002; Van't Veer LJ et al., 2003).

Van de Vijver et al. gelang es, innerhalb einer Studie über primäre Mammakarzinome mit Hilfe der cDNA- Microarraytechnik anhand des Expressionsverhaltens von 70 ausgewählten Genen nodal negative Mammakarzinompatientinnen in zwei Untergruppen mit guter bzw. schlechter klinischer Prognose zu unterteilen. Im Vergleich mit den klinischen Daten der Studiengruppe (5- Jahres- Fernmetastasierungsrate) zeigte die anhand des Genexpressionsprofils vorgenommene Prognoseabschätzung hohe Übereinstimmungen und war den etablierten Konsensus- Kriterien sogar überlegen, da im Rahmen dieser Studie die Anzahl der unnötigerweise systemisch adjuvanten Patientinnen scheinbar reduziert werden konnte (Van de Vijver MJ et al., 2002). Van't Veer et al. evaluierten im Anschluß daran dieses 70 Gene umfassende Prognoseprofil an 295 Studienfällen auch unter Einschluß nodal positiver Mammakarzinome (Van't Veer LJ et al., 2003). Der besondere Wert dieser Studie lag darin, dass durch Erstellung eines genetischen Profils auch bei regionalem Lymphknotenbefall das Risiko einer möglichen hämatogenen Fernmetastasierung und die Prognose besser vorhersagbar und statistisch absicherbar war und somit in der Zukunft bei der Behandlung und Therapieplanung derartiger Fälle von großer Bedeutung sein könnte.

Metastasierung und Metastasierungstheorien:

Solange ein maligner Tumor auf seinen Ursprungsort beschränkt ist, kann die Erkrankung durch einen operativen Eingriff geheilt werden. Viele maligne Erkrankungen weisen jedoch die Tendenz auf, lokal invasiv zu wachsen und nach Einbruch in Gefäß- oder Lymphbahnen sekundäre Tumoren (= Metastasen) zu bilden. Die Bildung dieser Tochtergeschwülste ist hauptsächlich für die Mortalität bei malignen Erkrankungen verantwortlich und stellt den Hauptgrund für onkologisches Therapieversagen dar (Liotta LA, 1993).

Metastasierung im engeren Sinn ist definiert als die Summe aller Prozesse, die an der Verschleppung maligner Zellen oder infektiöser Keime beteiligt sind und ihr An- und Weiterwachsen in entfernteren Körperregionen verwirklichen (Riede UN, 1995). Die erfolgreiche Dissemination einzelner Zellen in entfernter gelegene Körperregionen stellt einen bislang nur teilweise verstandenen, sehr komplexen Prozeß dar. Invasives Verhalten und Metastasierung beruht auf einer Kaskade von miteinander verbundenen oder nacheinander ablaufenden Schritten, die von vielen Wirt- Tumor- Wechselwirkungen abhängig ist. Für die erfolgreiche Metastasierung muß eine Zelle oder eine Gruppe von Zellen die Fähigkeit besitzen, den Primärtumor zu verlassen, in die umliegenden Gewebe einzudringen und Anschluß an die Zirkulation zu finden. Über die Blut- oder Lymphgefäße muß das tumoröse Zellmaterial zum jeweiligen Zielorgan gelangen, in das fremde Gewebe übertreten und mithilfe neugebildeter Gefäße (= Angiogenese) als sekundäre Kolonie proliferieren (Liotta LA, 1993).

Seit vielen Jahren beschäftigt sich die Forschung mit der Frage, wie sich in einem primären Tumor auf molekularer Ebene die zelluläre Fähigkeit zur Metastasierung entwickelt. Daraus wurden in zahlreichen Studien verschiedene Metastasierungsmodelle abgeleitet. Da keines dieser Modelle bislang jedoch eindeutig bewiesen werden konnte, entstanden darüber hinaus integrative Ansätze, die versuchen, die gegensätzlichen Metastasierungstheorien in Einklang zu bringen.

Klonale Selektionstheorie:

Dieses immer noch vorherrschende Modell der Metastasenentstehung beruht auf der Vorstellung einer im Primärtumor existierenden heterogenen Zusammensetzung von Zellpopulationen. Das auf Nowell (1976) zurückgehende Modell besagt, dass vereinzelte Zellen innerhalb des Primärtumors durch spezifische genetische Veränderungen einen Selektionsvorteil erlangen, der ihnen die Fähigkeit zu Invasion, Migration und Metastasierung in andere

Organe ermöglicht (Nowell PC, 1976; Fiedler IJ, 1978). Nach dieser Theorie besitzt die Mehrzahl der Tumorzellen dieses Metastasierungspotential nicht (Sleeman JP, 2000). Zahlreiche zeitlich nacheinander ablaufende genetische Alterationen, wie die Aktivierung von Onkogenen und der Verlust von Tumorsuppressorgenen, werden für einen Zellklon gefordert, bevor dieser seine Metastasierungs-fähigkeit erhält (Bieche I et al., 1995). Unterschiedliche phänotypische Zelleigenschaften von Tumorzellen aus primären und sekundären Tumoren konnten in zahlreichen Untersuchungen bestätigt werden (Fidler IJ et al., 1977; Hart IR et al., 1980; Clark EA et al., 2000). Demnach steht die Metastasierung eines Tumors am Ende eines Progressionsmodells (Foulds L et al., 1956) und findet umso schneller statt, je mehr hoch-maligne Zellklone ein Tumor besitzt (Poste G et al., 1980). Mit wachsender Primärtumorgröße würde demnach auch die Metastasierungs-wahrscheinlichkeit zunehmen.

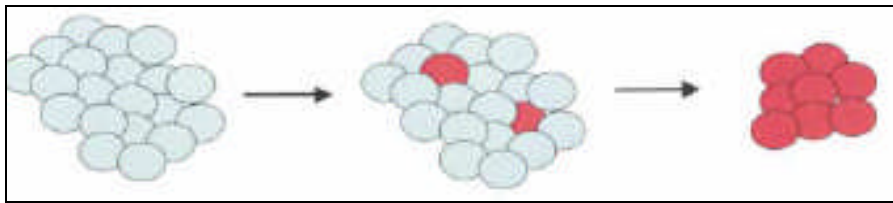


Abb. I.7: Klonale Selektionstheorie: Während der Progression eines Primärtumors entstehen durch zahlreiche genetische Alterationen (Onkogenaktivierung, Verlust von Tumorsuppressorgenen, Metastasiogene und Verlust von Antimetastasierungs-genen) Zellklone hoher Malignität (rot), welche schließlich metastasieren (nach Hynes RO, 2003)

„Poor prognosis signature- good prognosis signature“:

Van't Veer et al. und Van de Vijver et al. konnten in ihren Untersuchungen an Mamma-karzinomen in frühen Krankheitsstadien, wie bereits im letzten Abschnitt beschrieben, ein Genexpressionsprofil in den Primärtumoren nachweisen, das bei einem Teil von Mammakarzinomen signifikant mit dem klinischen Auftreten von Fernmetastasen korrelierte (Van de Vijver MJ et al., 2002; Van't Veer LJ et al., 2003). Beobachtete Ähnlichkeiten im Expressionsprofil zahlreicher Gene in manchen Primärtumoren und deren Metastasen scheinen dagegen zu sprechen, daß die Metastasierungs-fähigkeit nur wenigen Zellen des Primärtumors vorbehalten bleibt (Weigelt B et al., 2003; Perou CM et al., 2000). Demnach würden, entgegen des klassischen Tumorprogressionsmodells, die metastaserelevanten genetischen Veränderungen bereits im Frühstadium in der Mehrzahl der Tumorzellen nachweisbar sein. Der Metastasierungsprozeß würde folglich keine zusätzlichen not-wendigen genetischen Veränderungen benötigen (Bernards R, 2000).

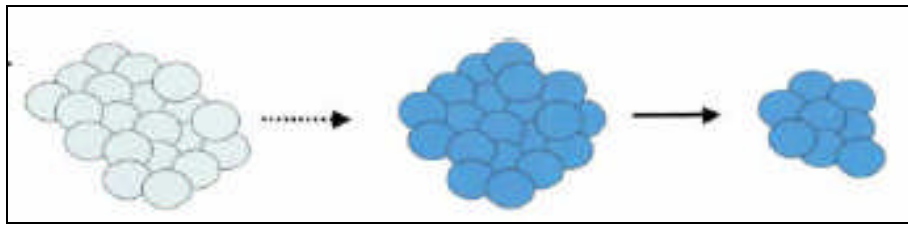


Abb. I.8: Metastasierungsmodell angelehnt an die Studien von Van't Veer et al. und Van de Vijver et al.: Alle Tumorzellen eines Primärtumors (blau), die ein bestimmtes Muster von Genen exprimieren, haben eventuell bereits in frühen Stadien die Fähigkeit, Metastasen zu bilden (nach Hynes RO, 2003)

Metastasierung unter Berücksichtigung von Tumor- Stroma Wechselwirkungen:

In gesundem Gewebe wird die Aufrechterhaltung normaler Gewebegrenzen durch die Basalmembran und interzelluläre Adhäsionskräfte der Zellverbände gewährleistet, so daß es nicht zu einer Durchmischung von Epithelgewebe auf der einen Seite und Bestandteilen der extrazellulären Matrix auf der anderen Seite der Basalmembran kommen kann (Liotta LA, 2001). Beim invasiven Tumor jedoch überwinden die Tumorzellen die Basalmembran und dringen in das darunterliegende Stroma ein, so dass es unter Durchmischung verschiedener Zellpopulationen zu einer Zerstörung der normalen Gewebsarchitektur kommt. So wird Malignität auch als ein Zustand beschrieben, der hervorgeht aus gegenseitigen Wechselbeziehungen zwischen Tumor und dem ihn umgebenden „Microenvironment“ (Milieu), welches invasives Verhalten, Selektion und expansive Eigenschaften des Tumors beeinflusst (Wernert N, 1997; Liotta LA, 2003). Die Vielfalt möglicher Wechselbeziehungen wird aus der Vielzahl verschiedener Zelltypen, darunter Immunzellen, inflammatorische Zellen, Muskelzellen, Fibroblasten und Zellen des vaskulären Systems (z.B. lymphatische Endothelzellen, Gefäßendothelzellen, Perizyten), die das Stroma kolonisieren, ersichtlich. (Park, C et al., 2000; Gregoire M et al., 1995). Aus der Vielzahl diskutierter Stroma- Tumor Interaktionen scheint ein wichtiger Aspekt im Rahmen der Tumorprogression die Fähigkeit von Tumorzellen zu sein, sich an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) anzuheften (Adhäsion) und diese lokal abzubauen. Als gesichert gilt, dass dabei proteolytische Enzyme, ihre Rezeptoren und Inhibitoren aktiv am Invasions- und Metastasierungsvorgang beteiligt sind (Liotta LA, 1991; Brinckerhoff CE et al., 2002). Viele dieser Enzyme und deren Inhibitoren werden von Zellen des „Microenvironments“ und nicht von Tumorzellen gesteuert (Sternlicht MD, 1999). Zu den wichtigsten abbauenden Enzymen der extrazellulären Matrix zählt die Gruppe der Matrixmetalloproteinasen (MMPs).

Dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten **Gen ADAM 17 (TNF- α converting enzyme)**, wird neben proteolytischen, die extrazelluläre Matrix degradierenden Eigenschaften, eine Reihe weiterer wichtiger Aufgaben zugeschrieben, die für Tumorprogression und Metastasierung von Bedeutung sein könnten.

Hinweise auf die Bedeutung stromaler Komponenten für den Metastasierungsprozess gab auch eine neuere Studie (Ramaswamy S et al., 2003). Hierbei fand zuerst über eine Mikroarray-Untersuchung eine Auswahl von Genen statt, die in primären und metastatischen Adenokarzinomen unterschiedlicher Herkunft (Lunge, Mamma, Prostata, Darm, Uterus, Ovar) unterschiedlich exprimiert waren (siehe Tab. I.9; S. 31). Da die mit Metastasierung einhergehende Gensignatur auch bei einem Teil der Primärtumoren beobachtet werden konnte, wurde eine ähnliche Schlussfolgerung wie bei der Vorarbeit von Van't Veer et al. getroffen: In einem Teil der Primärtumoren könnte bereits in frühen Krankheitsstadien ein molekulares Metastasierungsprogramm erkennbar sein (Ramaswamy S et al., 2003). Da dieses nur 17 Gene umfassende Metastasierungsprogramm auch Gene, die nur von stromalen Zellen exprimiert werden, beinhaltet, scheint der Einfluß des „Microenvironment“ auf den Metastasierungsprozess zumindest bei einem Teil der Primärtumoren vorhanden zu sein. Hieraus läßt sich ein Tumorprogressionsmodell ableiten, das einen integrativen Versuch der oben bereits beschriebenen Metastasierungsmodelle ermöglicht. Demnach könnten im Primärtumor bereits variante Tumorzellen vorhanden sein, die sich von den anderen nur im Expressionsverhalten eines oder weniger Gene unterscheiden und eine stromale Reaktion auslösen, welche diesen Zellen auch die Absiedlung und Bildung eines sekundären Tumors am Zielort der Metastasierung erlauben würde. Umgekehrt wäre aber auch denkbar, daß von Seiten des „Microenvironment“ in einigen Tumorzellen genetische Alterationen ausgelöst werden, welche dann die Fähigkeit zur Metastasierung erhalten würden. Demnach würden sich diese varianten Zellen innerhalb des Primärtumors unter Umständen von den restlichen Tumorzellen aus molekular-genetischer Sicht nur wenig unterscheiden (Hynes RO et al., 2003). So konnte eine neuere Untersuchung am Mammakarzinom eine geringe Zahl von Genen entdecken, die scheinbar eine molekular-genetische Unterscheidung von primären Tumoren und metastatischen Absiedlungen ermöglicht (Kang Y et al., 2003). Nach dem Konzept der Tumorerheterogenität würde sich demnach die Mehrzahl der Zellen eines primären Tumors im genetischen Phänotyp von den metastatischen Zellen unterscheiden. Folglich erschien es im Rahmen der vorliegenden Arbeit sinnvoll, das Expressionsverhalten einer in den letzten Jahren mit Metastasierung in Verbindung gebrachten Gruppe von Genen in primären Mammakarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen miteinander zu vergleichen.

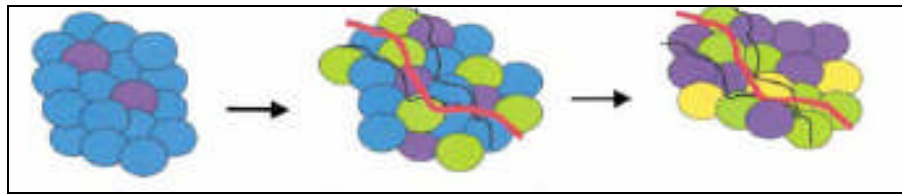


Abb. I.9: Tumorprogressionsmodell unter Berücksichtigung der Tumor- Stroma Interaktionen; Variante Zellen (lila) entstehen durch stromale Antwort (hell) oder führen zu stromaler Reaktion (grün); Variante Zellen unterscheiden sich von den restlichen Tumorzellen (blau) nur in der Expression eines oder mehrerer Gene (nach Hynes RO et al., 2003)

Genetische Unterscheidung von primären und metastatischen Adenokarzinomen (aus Ramaswamy et al., 2003)

<i>In Metastasen hochregulierte Gene</i>	<i>In Metastasen herunterregulierte Gene</i>
<u>COL1A1</u>	ACTG2
<u>COL1A2</u>	MYLK
<u>LMNB1</u>	MYH11
PTTG1	CNN1
DHPS	HLA-DPB1
HNRPAB	RUNX1
EIF4EL3	MT3
SNRPF	NR4A1
	RBM5

Tab. I.9: Gensignatur zur Unterscheidung primärer und metastatischer Adenokarzinome (nach Ramaswamy S et al., 2003)

1.5 Genexpressionsanalyse an formalinfixiertem Gewebe:

Die Untersuchung von Genexpressionsprofilen erbrachte in den letzten Jahren neue Erkenntnisse über die Entstehung und Krankheitsmechanismen des Mammakarzinoms. Daraus ergaben sich einerseits zahlreiche Überlegungen zu neuartigen Therapieplanungen und Therapiestrategien, andererseits auch viele widersprüchliche Aussagen und Erkenntnisse, die überprüft und neu überdacht werden müssen. Damit verbunden ist der Bedarf, in Besitz einfach handzuhabender, reproduzierbarer und kostengünstiger Untersuchungsmethoden und einem dafür geeignetem Untersuchungsmaterial zu sein. Routinemäßig formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe ist zusammen mit klinischen Daten für retrospektive Untersuchungen an größeren Fallzahlen ausreichend vorhanden. Mit Weiterentwicklung der PCR- Methoden steht in Form der RT- PCR eine sensitive, genaue und reproduzierbare Methode zur Untersuchung der Expression einzelner Gene zur Verfügung (Heid CA et al., 1996; Gibson UE et al., 1996). Einige Arbeiten konnten anhand der Bestimmung des Her-2/neu Status entgegen früherer Ansichten in ihren Untersuchungen zeigen, dass eine Genexpressionsanalyse an formalinfixiertem Paraffinmaterial mithilfe einer RT- PCR in Kombination mit Laser capture microdissektion (LCM) im Vergleich zu etablierteren Methoden (IHC, FISH- Analyse) reproduzierbare und ausreichend genaue Ergebnisse liefert (Specht K et al., 2001; Gjerdrum LM et al., 2004). Mit einer weiteren Evaluation könnte diese Methode in der Zukunft aufgrund ihrer Vorteile als klinisch anwendbare Labortechnik durchaus an Bedeutung in der Praxis gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft und Sammlung des Materials

Studienfälle

Für die Studie wurde über das computerisierte Archivregister des Institutes für Pathologie und pathologische Anatomie des Klinikum Rechts der Isar der TU München nach den Eingangsnummern von geeigneten Mammakarzinompatientinnen der Jahre 1995 bis 1998 gesucht.

Hierzu wurden primär alle Fälle von Mammakarzinomen gesucht, die postoperativ mit pT1-N1M0 nach pTNM-Klassifikation (siehe Anhang 7.2; S. 141f.) befundet wurden, also ipsilateral tumorbefallene Lymphknoten vorwiesen. Der histologische Typ spielte bei dieser Vorauswahl keine Rolle, so dass sich im Kollektiv zwar überwiegend Karzinomfälle vom invasiv- duktalem, aber auch vom lobulären Typ befanden.

Als Ausschlusskriterium für die Studienaufnahme bei dieser ersten Patientensichtung wurden in Bezug auf das Lebensalter ein Geburtsjahrgang vor 1935, ein Carcinoma- in- situ Befund ohne invasive Karzinomanteile der Mamma, sowie das Auftreten koinzidenter Malignome anderer Identität festgelegt.

Von November 2001 bis Januar 2002 wurden dann die in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke von Primärtumor und Lymphknoten und die dazugehörigen histologischen Schnitte von circa 120 Patientinnen aus dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie herausgesucht. Alle klinischen Unterlagen der immunhistochemisch untersuchten Fälle wurden eingesehen und die relevanten Daten zu Diagnose und Behandlung katalogisiert.

Alle Schnitte mit den dazugehörigen Blöcken wurden zusammen mit einem erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. Falko Fend) nach der TNM- Klassifikation evaluiert und hinsichtlich der durchzuführenden Mikrodissektion nach ausreichendem Vorhandensein von Tumorarealen in den Schnitten von Primärtumor und Lymphknoten beurteilt. Letztlich wurden aus der Gesamtfallzahl 32 geeignete Studienfälle für den praktischen Teil der Arbeit ausgewählt.

2.2 Auswahl der untersuchten Gene

Da bislang nicht bekannt ist, wie viele mit Metastasierung in Verbindung gebrachte Gene existieren bzw. welcher genaue Stellenwert jedem einzelnen dieser Gene im Rahmen des Metastasierungsprozeß zukommt, gestaltete sich die Auswahl der zu untersuchenden Gene für eine gezielte molekulargenetische Untersuchung schwierig.

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 6 Gene stammen die Gene LMNB1, COL1A1 und COL1A2 aus der bei Adenokarzinomen unterschiedlicher Herkunft mit Metastasierung in Verbindung gebrachten Gensignatur (Ramaswamy S et al., 2003). Den Genen ADAM 17, AXL und Her- 2/neu wird in der Literatur im Rahmen der Progression und Metastasierung maligner Tumore eine potentiell wichtige Rolle zugeschrieben (Lendeckel U et al., 2004; Craven RJ et al., 1995; Slamon DJ et al., 1989; Slamon DJ et al., 2001).

2.3 Herstellung von Präparaten für Histologie, Mikrodissektion und RNA-Extraktion

Das Gewebe der Mammabiopsien war unmittelbar nach dem operativen Eingriff entsprechend histologischen Standardprotokollen des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie in 4 % gepuffertem Formalin für 24 Stunden fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet worden. Die Gewebelöcke wurden im Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie Rechts der Isar nach Standardprotokollen für Mikrodissektion (Dicke 5- 7 µm) mit dem Mikrotom geschnitten und auf dünne Glasobjektträger (Länge: 76 mm, Breite: 34 mm, Dicke: 0,17 mm; Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim) aufgebracht. Der Arbeitsplatz und das Mikrotom wurden mit RNase- free Spray (RNase Erase, ICN Bio-medicals) sorgfältig gereinigt, um das frisch geschnittene Gewebe vor Verdauung durch RNasen- und DNasen zu schützen. Für das Wasserbad wurde außerdem DEPC- behandeltes Wasser verwendet und regelmäßig nach circa 30 Schnitten wieder gewechselt.

Dabei wurden von Primärtumor und Lymphknoten je 5 Schnitte in Serie angefertigt, von denen nach Entparaffinierung und manuell durchgeführter Hämalaunfärbung ein Schnitt zur Reevaluation und als Orientierungshilfe zum schnelleren Auffinden der zu mikrodissertierenden Areale, zwei zur RNA- Extraktion nach durchgeführter Mikrodissektion und zwei als Reserveschnitte dienen sollten.

2.4 Mikrodissektion

Allgemeines und Stellenwert der Laser Capture Mikrodissektion (LCM)

Molekulare Untersuchungen auf RNA/ DNA Ebene werden in Zukunft eine wichtige Rolle bezüglich Aufdeckung von Krankheitsmechanismen, neuen Therapieansätzen und prognostischen Aussagen in Forschung und klinischer Diagnostik einnehmen. Für aussagekräftige molekularanalytische Untersuchungen, wie zum Beispiel eine nach DNA/RNA- Extraktion durchgeführte PCR zur Genexpressionsanalyse, erlaubt die Laser Capture Mikrodissektion (LCM) sowohl aus im Paraffin eingebetteten Gewebematerial als auch aus immunhistochemischen vorbehandeltem Material die schnelle und präzise Isolierung bestimmter Gewebsbestandteile aus heterogen zusammengesetzten histopathologischen Schnitten und zytologischen Präparaten. Aufgrund ihrer einfach erlernbaren Handhabung und dem schnellen Gewinn isolierter Zellpopulationen lässt sich das relative neue Verfahren der LCM im Gegensatz zu anderen Mikrodissektionstechniken, wie zum Beispiel der Laser microbeam microdissection (LMM), gut in den zeitlichen und organisatorischen Ablauf molekular-genetischer Studien integrieren. Aufgrund aussagekräftiger Ergebnisse aus mit LCM gewonnenem Material über Genalterationen und Genexpressionsverhältnisse bei Ovarialkarzinomen, Non- Hodgkin Lymphomen, Ösophaguskarzinomen und anderen Entitäten stellt diese Technik heute ein etabliertes Verfahren dar (Simone NL et al., 1998).

Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion

Die Funktionseinheit des LCM- Mikroskopes besteht aus einem umgekehrten Mikroskop, einer Infrarot Laser Diode, einer Laserkontrolleinheit, einer Kamera mit Bildschirmübertragung und einem Anschluss an einen Personal Computer, über den die Lasereinstellungen vorgenommen werden können. Die Methode der LCM basiert darauf, dass ein sogenanntes Cap, das an seiner Spitze mit einem durchsichtigen, thermoplastischen Film (Ethylenvinylacetat) beschichtet ist, über einen beweglichen Greifarm über den Objektträger eingeschwenkt und somit der Film in direkte Berührung mit der Oberfläche des entparaffinierten und entwässerten Schnittes gebracht wird. Über mikroskopische Sicht oder über Bildschirmübertragung kann nun mit Hilfe eines Joysticks der gewünschte Präparatebereich eingestellt werden.

Eine Vakuum- Ansaugvorrichtung ermöglicht eine feste Fixierung am Objektträgertisch. Ist der gewünschte Bereich gewählt und mit Hilfe eines Positionierungsstrahles kontrolliert, wird durch Setzen von Infrarotlaser- Impulsen mit definierter Energie (abhängig von der Schichtdicke) auf einem 7,5, 15 oder 30 μm grossen Areal (je nach Voreinstellung durch den Anwender) der thermoplastische Film zum Schmelzen gebracht, der sich dadurch in die Hohlräume des gewünschten Präparatebereichs ausdehnen kann. Mit Hilfe der dabei auftretenden Adhäsionskräfte zwischen Polymermatrix und Gewebe wird erreicht, dass beim Abheben des Caps von der Objektträgeroberfläche selektiv die zu untersuchenden Zellen aus dem Gewebsverband gewonnen werden können. Aufgrund der niedrigen Laserenergie und der Energie absorbierenden Eigenschaften der Membran werden sowohl das Gewebe zerstörende photochemische Effekte als auch eine hitzebedingte Denaturierung biologischer Makromoleküle wie RNA vermieden (Emmert-Buck MR et al., 1996; Bonner RF et al., 1997; Fend F et al., 2000).

Die Funktionsweise der LCM wird in den Abbildungen **II.1 (a)** und **II.1 (b)** im Groben skizziert:

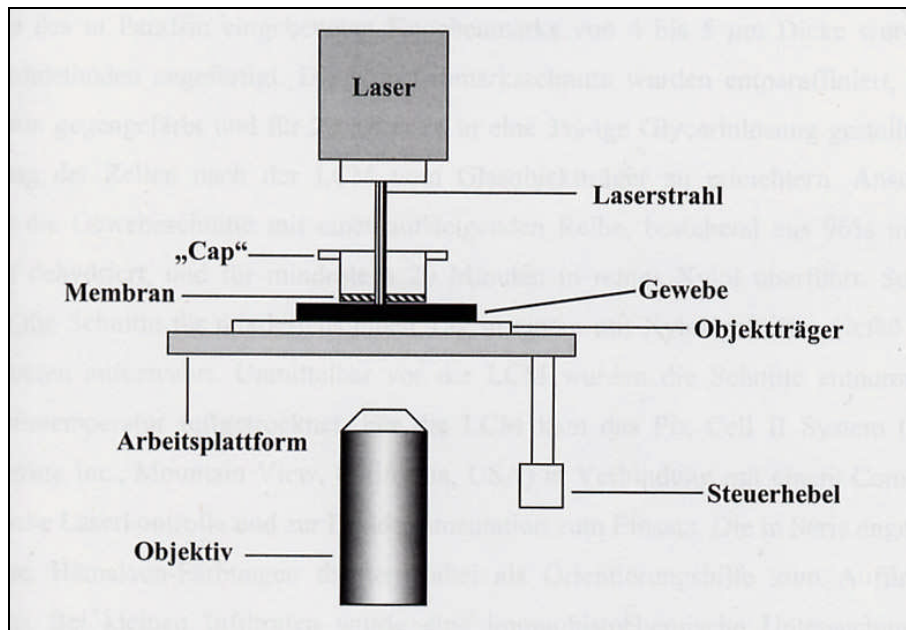


Abb. II.1 (a): Setzen des Infrarot-Laserimpuls führt zur Verschmelzung der Membran mit dem Gewebeschnitt in einem unter mikroskopischer Kontrolle definiertem Areal (Abbildung nach Fend F et al., 2000(a))

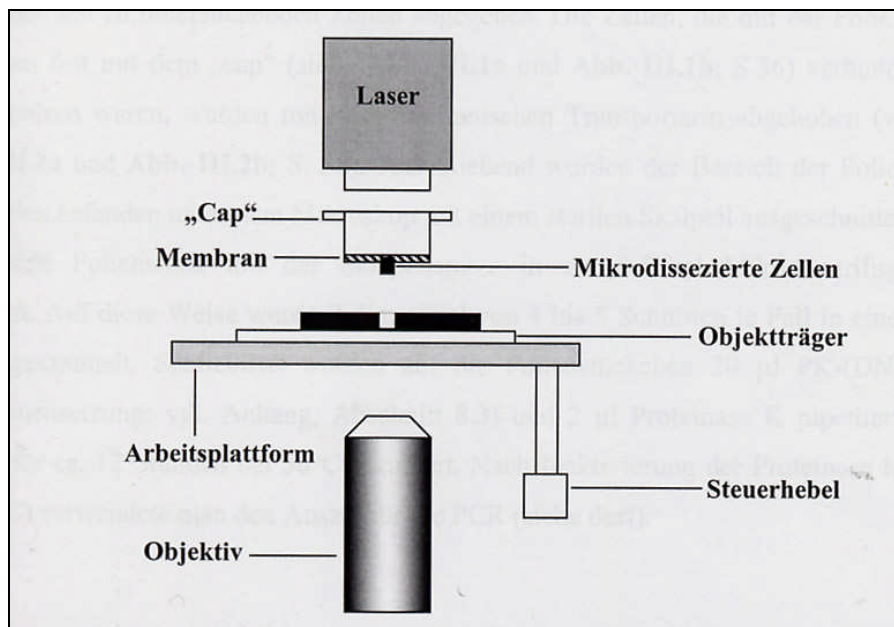


Abb. II.1 (b): Durch Abheben des Caps vom Objekttträger werden die der Membran anhaftenden Zellen aus dem aus dem Gewebsschnitt isoliert (Abbildung nach Fend F et al., 2000(a))

Praktische Durchführung der Laser Capture Mikrodissektion

Die für die LCM hergestellten Schnitte wurden folgendermaßen vorbereitet: Die 5 µm Schnitte wurden direkt vor Durchführung der LCM für 2 mal 20 Minuten in RNase- freien Gefäßen mit Xylol entparaffiniert, woran sich eine absteigende Alkoholreihe zur Rehydrierung anschloß. Die Entparaffinierung endete in reinem Wasser, um eine kurze Hämalaun-Gegenfärbung zu ermöglichen. Da die Schnitte zur Mikrodissektion völlig wasserfrei sein müssen, folgte zur Dehydrierung wieder eine aufsteigende Alkoholreihe bis hin zu reinem Xylol und schließlich noch eine Trocknung über circa 15 Minuten an der Luft in einer gereinigten Glasküvette. Xylol und Ethanol wurden in p.A- Qualität verwendet, das zur Verdünnung benötigte Wasser war DEPC behandelt.

Einen Überblick über die Entparaffinierung des Gewebes gibt nachstehende Abbildung (Abb. II.2):

Entparaffinierung der 5 µm Schnitte:	
Aufsteigende Alkoholreihe:	Absteigende Alkoholreihe:
Xylol 20 min	DEPC -Wasser 5 min
Xylol 20 min	70 % Ethanol 5 min
100 % Ethanol 5 min	80 % Ethanol 5 min
90 % Ethanol 5 min	90 % Ethanol 5 min
80 % Ethanol 5 min	100 % Ethanol 5 min
70 % Ethanol 5 min	100 % Ethanol 5 min
DEPC- Wasser 5 min	Xylol 20 min
Hämalaunfärbung	Lufttrocknung

Abb. II.2: Vorgehensweise bei der Entparaffinierung

Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen durchgeführt, um eine Degradation und somit Zerstörung der RNA der Tumorzellen zu vermeiden. Ziel der Mikrodissektion war es, sowohl aus dem Primärtumor als auch aus den Lymphknotenmetastasen der einzelnen Fälle Tumor-

areale mit mindestens circa 2000 Tumorzellen zu gewinnen. Dadurch sollte eine ausreichende RNA Menge von guter Qualität in den mikrodisszierten Gewebsabschnitten gewährleistet werden. Um dieses Ziel auch bei kleinen Infiltraten zu erreichen, wurden bei allen Fällen je 2 Schnitte von Primärtumor und Lymphknoten der LCM zugeführt.

Für die LCM kam das Pix Cell II System (Arcturus Engineering Inc., Mountain View, California, USA) in Verbindung mit einem Computer zur Laserkontrolle und zur Bildokumentation zum Einsatz. Zur Orientierung am Präparat und zum Auffinden der gewünschten Schnittareale dienten die in Serie angefertigten und routinegefärbten HE-Schnitte.

Je nach Infiltratgröße wurden gezielte Laserstrahlimpulse mit einem Durchmesser von 30 µm mit 60- 70 mW (großes Infiltrat) bzw. 15 oder 7,5 µm mit 40- 50 mW (kleinere Infiltrate) und einer Impulsdauer von 13- 25 ms abgegeben. Ziel war es, mit ungefähr 1500- 2000 Impulsen eine Menge von circa 2000 Tumorzellen zu isolieren. Die interessierenden Areale, welche nun mit der Polymer- Matrix des LCM- Caps verschmolzen waren (vgl. Abb. **II.1(b)**; S.37), wurden über den mechanischen Greifarm vom vakuumfixierten Objektträger abgehoben. Nach Entnahme wurde der Film des Caps auf eine Post- it- Note aufgesetzt, um nicht fest verschmolzenes Zellmaterial zu entfernen. Unter lichtmikroskopischer Sicht wurden dann die dem Cap anhaftenden Zellareale beurteilt und quantifiziert. Bei ausreichend vorhandenen Tumorealen wurden die Caps auf offene 0,5 ml fassende Eppendorf- Cups gesetzt, in welche bereits 200 µl RNA Lyse Puffer (siehe Anhang **7.5**; S. 143) pipettiert worden war.

Nach Durchführung der Mikrodissektion an allen für diesen Versuchstag entparaffinierten Schnitte (pro Versuchstag jeweils 5 Fälle mit Primärtumor und Lymphknoten) wurden nach abschließender Zugabe von 10 µl Proteinase K (PK) die Caps fest auf die Eppendorf-Cups gesetzt und für 12 Stunden bei 58 °C inkubiert. Dabei wurden die Caps im Brutschrank so positioniert, daß der Film des Caps vom Ansatz umspült wurde (Abb. **II.3**; S.40)

Am darauffolgenden Tag wurde der Ansatz für die RNA Extraktion weiter verarbeitet.

Manuelle Mikrodissektion

Bei Gewebeschnitten, bei denen die Tumordinfiltrate bereits makroskopisch erkennbar waren (Fall 15 und 22), war die Durchführung einer manuellen Gewebdissektion möglich. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte nach demselben Schema (siehe oben) wie bei der Laser Capture Mikrodissektion:

Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen mittels einer sterilen Injektionskanüle vom mit destilliertem (und DNA- freiem Wasser) angefeuchteten Objektträger abgekratzt. Das so gewonnene Gewebe wurde ebenfalls sofort mit Lyse- Puffer und Proteinkinase (PK) inkubiert. Durch diese enzymatische Andauung der am Film anhaftenden Zellen wurde eine Lösung von Zellbestandteilen in dem Ansatz erreicht.

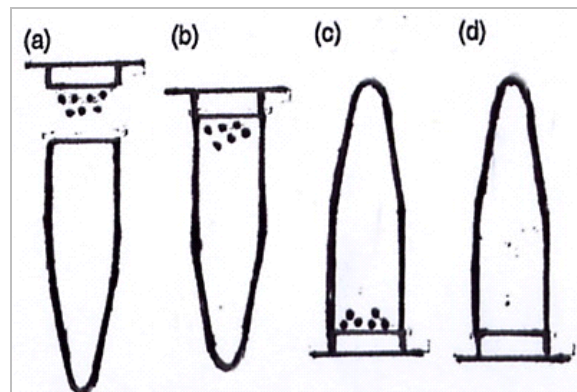


Abb. II.3:

- (a) das 0,5 ml Eppendorf-Cup enthält 200 μ l RNA Lyse Puffer und 10 μ l Proteinase K
 - (b) Aufsetzen des Caps mit den mikrodissektierten Zellen
 - (c) Nach Umdrehen des Eppendorf-Cups kommt der Film des Caps mit dem Ansatz in Kontakt
 - (d) Nach Inkubation sind die Zellen für die RNA Extraktion im Ansatz gelöst
- (aus Simone NF et al., 1998)

2.5 Durchführung der RNA- Extraktion aus mikrodissektiertem Gewebe:

Der nächste Arbeitsschritt bestand in der Extraktion der RNA aus den mikrodissektierten Zellen. Eine detaillierte Beschreibung der hierbei eingesetzten Chemikalien findet sich im Anhang (siehe Anhang 7.5; S. 143f)

Bei allen untersuchten Fällen wurde die RNA- Extraktion auf dieselbe Art und Weise durchgeführt.

Die Proteinase K (50 mg/ml) der Ansätze vom Vortag wurde nach Umfüllen der Proben in 1,5 ml Eppendorff- Gefäße und gleichzeitigem Zusammenführen identischer Ansätze 5 min bei 95 °C hitzeinaktiviert.

Im Anschluss daran wurde in die Ansätze 40 µl Natriumacetat (2M) (RNase-free), 400 µl saures Phenol (pH= 4,0) und 80 µl Chloroform (für Analysezwecke) pipettiert. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten wurde durch die Benützung eines Vortex-Gerätes eine gleichmäßige Durchmischung der Reagenzien erzielt. Nach Kühlstellung der Proben auf Eis für circa 15 min fand eine Zentrifugation der Ansätze bei 13000 rpm und 4 °C über 20 min statt. Nach dieser Zentrifugation war in den Proben deutlich eine Zwei- Phasentrennung erkennbar: eine obere wässrige Phase, die die RNA enthält, und eine untere organische Phase, in der sich Proteine und Zellreste sammeln.

Die obere Phase wurde mit einer Pipette abgenommen und in neue 1,5 ml Eppendorf- Gefäße gegeben. Nach Zugabe von 2 µl Glycogen (10 mg/ml) und 400 µl Isopropanol zum Fällern der RNA wurden die Ansätze bei - 20 °C gelagert und am folgenden Tag oder innerhalb einiger Wochen verarbeitet.

Zur weiteren Verarbeitung der Proben wurden diese aus dem Kühlschrank entnommen und 30 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Am Boden der Eppendorf- Gefäße war nun ein Präzipitat, ein sogenanntes Pellet, bestehend aus Glykogen und RNA erkennbar. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zur Reinigung der Pellets wurden 500 µl 70 %iges Ethanol verwendet. Die sich nun im Ethanol befindlichen Pellets wurden bei Raumtemperatur 20 min zentrifugiert. Zur Trocknung der Pellets wurden das Ethanol mit der Pipette entfernt und die Eppendorf- Gefäße im Anschluß daran für einige Minuten offen an der Luft getrocknet. Waren keine Flüssigkeitsreste mehr zu erkennen, wurden die Pellets in 20 µl DEPC- Wasser gelöst und schließlich bei - 70 °C gelagert.

2.6 Quantitative RNA-Analyse mittels RT- PCR

Prinzip der reversen Transkription (cDNA- Synthese)

Da bei der Vermehrung von Protein- kodierenden DNA- Genabschnitten die in diesen enthaltenen Introns stören, stellt die Reverse Transkription (RT) eine etablierte Methode dar, um kodierende Genabschnitte zu synthetisieren. Aus der im Rahmen der oben beschriebenen

Extraktion gewonnenen RNA entsteht hierbei mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase ein RNA/ DNA – Hybridstrang, wobei durch die Teilaktivität Ribonuklease des Enzyms der RNA- Teil des Stranges hydrolysiert wird und somit einsträngige intronfreie cDNA übrigbleibt, die einer PCR zugeführt werden kann.

Eine detaillierte Aufstellung der hierbei eingesetzten Chemikalien findet sich im Anhang dieser Arbeit (Anhang 7.5; S.143f.)

Praktische Durchführung der reversen Transkription:

Zusammensetzung der Ansätze für die Reverse Transkription:

Je 10 µl aus RNA- Patientenproben (gelagert bei -70 °C):

+ 1 µl Random Primer (Random Hexamere)

+ 4 µl First- Strand Puffer + 2 µl DTT

+ 1 µl dNTP

+1 µl RNasin

+ 1µl Reverse Transcriptase

⇒ Gesamtvolumen eines Ansatzes 20 µl

Volumen der Reaktionsgefäße: 1,5 ml Eppendorf- Gefäße

Das Erstellen der Ansätze geschah bei allen vorhandenen Patientenproben (Primärtumor; Lymphknotenmetastasen) nach obigem Protokoll.

Die bei -70 °C lagernden Patientenproben mit der in 20 µl Ampuwa- Wasser resuspendierten RNA wurden der Kühlung entnommen. 10 µl suspendierte RNA wurde abpipettiert und als Reserve zur eventuellen späteren Ergebniskontrolle oder der Durchführung weiterer Experimente bei -70 °C gelagert. Die restlichen 10 µl wurden für die Synthese der cDNA durch reverse Transkription verwendet.

Als Gesamtreaktionsvolumen waren nach etabliertem Protokoll 20 µl vorgesehen (Specht K et al., 2001). Dieses Ansatzvolumen eignet sich zur Einzelstrangsynthese der cDNA aus bis zu 500 ng vorliegender mRNA je Probe.

In ein RNase- freies Microtube- Röhrchen wurden im ersten Schritt zu den 10 µl der einzelnen Patientenproben 1 µl der als Hexamere vorliegenden Random Primer (500 µl/ml) hinzugegeben. Um die Anlagerung der Random Primer an die RNA zu ermöglichen, wurden die Proben im Anschluss bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Weiter wurde in den Ansatz 1 µl dNTP Mix (10mM; dATP, dGTP, dCTP, dTTP) pipettiert. Danach wurden 4 µl First- Strand Puffer, 2 µl DTT (0,1 M) sowie 1 µl RNasin (RNaseOUT™; Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ µl)) je Probe zu dem Ansatz gegeben. RNasin sollte die Degradierung der RNA durch eventuelle RNase Aktivität in den Reaktionsgefäßen verhindern. Die Proben wurden für circa 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 1 µl des Enzyms Reverse Transcriptase (200 U/ µl) (Superscript™ II RT) lief die Synthese der cDNA bei 42 °C 1 Stunde ab. Nach Beendigung der Synthese schlossen sich 5 weitere Minuten an, in denen bei 95 °C die Inaktivierung des Enzyms durchgeführt wurde.

Die nun vorhandene cDNA wurde im nächsten Schritt der RT- PCR zugeführt. Dazu wurden die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl mit RNase- freiem hochgereinigtem Wasser auf ein Volumen von 96 µl pro Fall aufgefüllt. Je Reaktionsgefäß waren also 4 µl vorgesehen. Jeder Fall wurde pro Gen mindestens im doppelten Ansatz (8 µl) untersucht (meist unverdünnte und 1:10 verdünnte Proben- DNA). Für die 7 zu untersuchenden Gene ergab sich daraus ein notwendiges Volumen von 88 µl. Die 8 µl Überschuß der PCR- Ansätze wurden für etwaige Pipettierungenauigkeiten und somit zur Kontrolle des Standardmeßfehlers eingeplant.

Prinzip der RT- PCR (Abb. II.4- Abb. II.6(a),(b),(c);S .44-46)

Ziel der PCR (Polymerase-Chain-Reaction)- Verfahren ist, einen durch zwei flankierende Oligonukleotide (Primer) definierten Sequenzbereich mit Hilfe einer DNA- Polymerase aus einer im Gewebe vorliegenden DNA zu vermehren (Amplifikation) (Mullis KB, 1990).

Bei der quantitativen Real-Time PCR macht man sich zusätzlich die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase zunutze. Die PCR Reaktion beinhaltet ein Oligonukleotid, bestehend aus 20- 30 Nukleotiden, welches TaqMan® Probe genannt wird. Das Design dieser Probe wird so gewählt, daß sie sich zwischen Forward und Reverse Primer anlagert. Die Probe stellt eine fluorogene Sonde dar, deren 5'- Ende mit einem energiereichem fluoreszenten Reportermolekül (Fluoreszein- Derivat: FAM: 6-Carboxy-Fluorescein)

markiert ist, während das 3'- Ende einen energieärmeren Quencher- Farbstoff (Rhodamin-Derivat: TAMRA: 6 Carboxy-tetramethyl-rhodamin) trägt. Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) wird aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz- Energietransfer vom energiereichen zum energiearmen Ende unterdrückt. Erreicht nun während der Anlagerung der Oligonukleotide das Enzym AmpliTaq DNA-Polymerase den Sondenbereich, versucht es, diese zu verdrängen, welche dabei eine Y-förmige Sekundärstruktur annimmt. Diese Verformung der Sonde aktiviert die 5'- Exonuclease Aktivität, was eine Hydrolyse der Sonde mit Ablösung zur Folge hat. Dabei wird die Sonde zerschnitten und die räumliche Nähe von Reporter und Quencher Molekül durchbrochen. Nun wird der Reporter in seiner fluoreszierenden Eigenschaft nicht mehr gehemmt. Entsprechend kommt es bei jedem Zyklus mit 100 % Spezifität zu einem Anstieg der Fluoreszenz, welche mit Hilfe des ABI Prism 7700 Sequence Detectors zu jedem Zeitpunkt der Reaktion erfasst wird und quantitative Aussagen über den Amplifikationsvorgang ermöglicht.

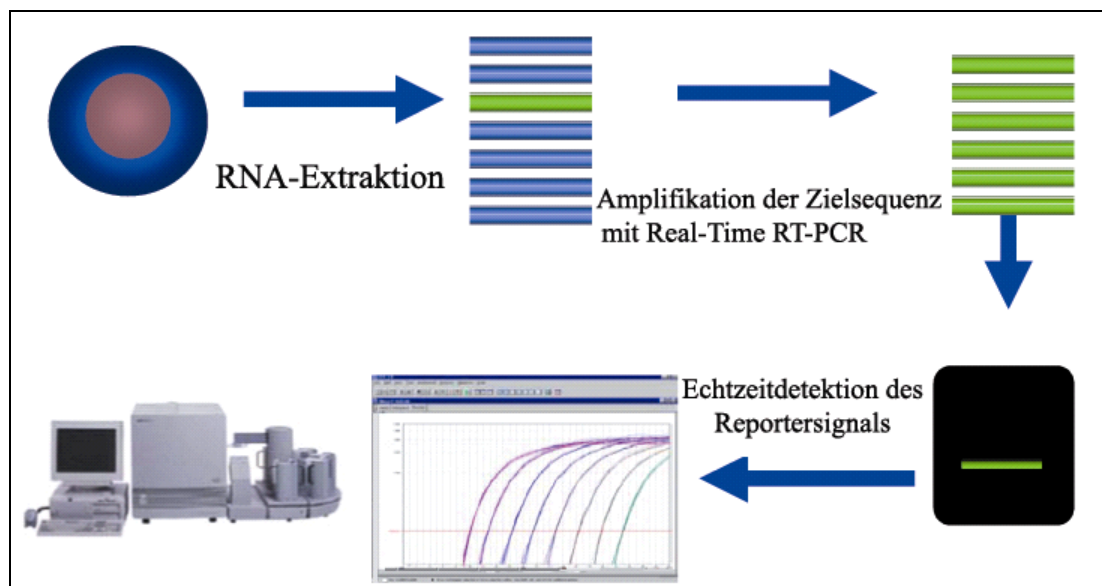


Abb. II.4: Ablauf der RT-PCR

Eine PCR- Reaktion lässt sich prinzipiell in 3 Abschnitte unterteilen:

1. Anfangsphase der Reaktion:

Zu Beginn der Reaktion zeigen die Amplifikationskurven eine Basislinie ohne größere Veränderungen des Reportersignals. Die Vermehrung der zu amplifizierenden Genabschnitte

zeigt einen linearen Beginn. Mit jedem Vermehrungszyklus findet eine Verdopplung der Amplifikationsprodukte statt.

2. Exponentielle Reaktionsphase:

Mit dem Erreichen der exponentiellen Phase kommt es zu einem sprunghaften Anstieg des Reportersignals. Bei jedem weiterem Zyklus der PCR- Reaktion findet nun eine Verdopplung der Amplifikationsprodukte statt. Die Reaktion läuft idealerweise mit 100 % Effektivität und sehr hoher Präzision bei allen Proben ab. Während dieser Reaktionsphase sind die einzelnen Ergebnisse der Reaktion untereinander vergleichbar, da in diesem Reaktionsbereich sich auch die Schwelle befindet, bei deren Erreichen man auch vom Ct- Wert spricht.

3. Plateau Phase:

Mit zunehmender Reaktionsdauer kommt es durch das Aufbrauchen der Reaktionsprodukte zum Reaktionsende. Schließlich beginnt die Degeneration der empfindlichen Nukleinsäuren. Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsmenge der Proben weist der Zeitpunkt und das Niveau der Plateaukurve bei verschiedenen Proben eine große Variabilität auf.

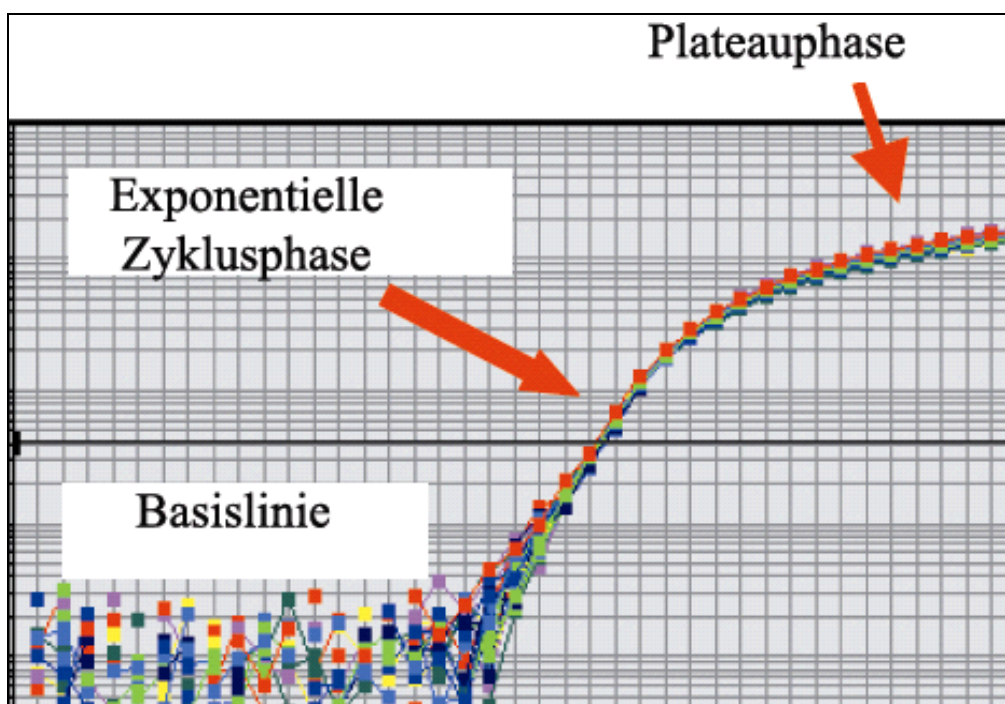


Abb. II.5: Darstellung des Ablaufs einer PCR Reaktion in 3 Phasen

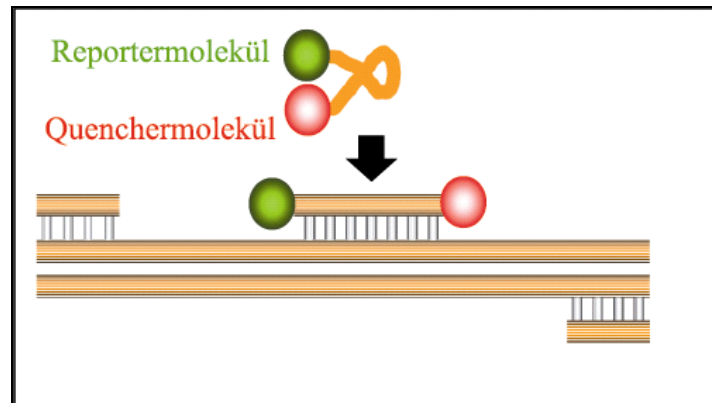


Abb. II.6 (a): 5'- Nuklease Assay: Hybridisierung einer fluorogenen Sonde an den cDNA- Strang

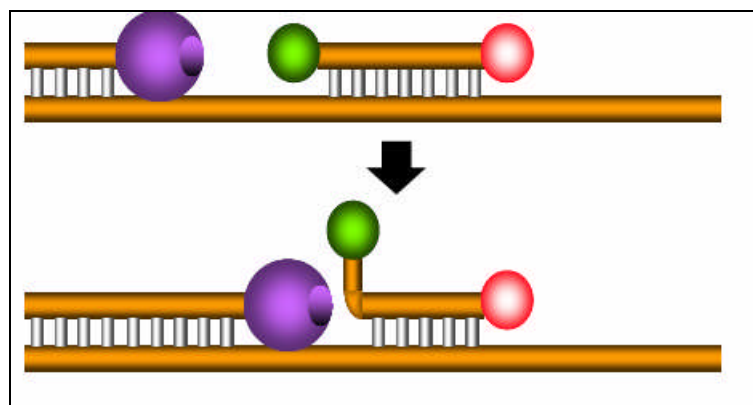


Abb. II.6 (b): Die TaqMan Polymerase trifft auf die Probe; Aktivierung der 5'- Exonuklease Aktivität

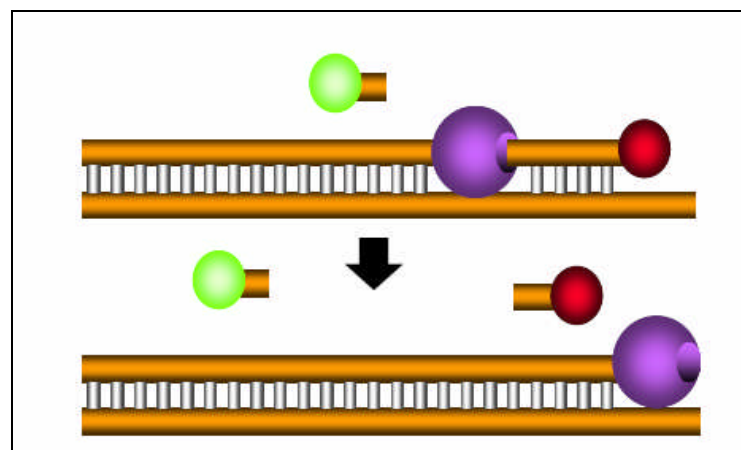


Abb. II.6 (c): Abspaltung des Reporter- Moleküls von der Sonde und Sondenhydrolyse

Mit Zunahme der Kopienzahl steigt in direkter Proportionalität das zu messende Fluoreszenzsignal, welches in Echtzeit über Bildschirmübertragung des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors von Zyklus zu Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß graphisch sichtbar gemacht wird. Die sogenannte Threshold- Linie, die vertikal die Amplifikationskurve durchzieht, zeigt die erstmals über die Grundlinie angestiegene Reporter- Fluoreszenz an. Den PCR- Zyklus, bei dem dieses auftritt, bezeichnet man als Threshold- Zyklus (Ct- Wert). Der Wert des Zyklus ist abhängig von der Anzahl der Startkopien und nimmt bei einer angenommenen Reaktionseffektivität von 100 % mit jeder Verdoppelung der Startkopienzahl um einen Zyklus ab. Folgende Abbildung zeigt ein Beispiel für eine Amplifikationskurve:

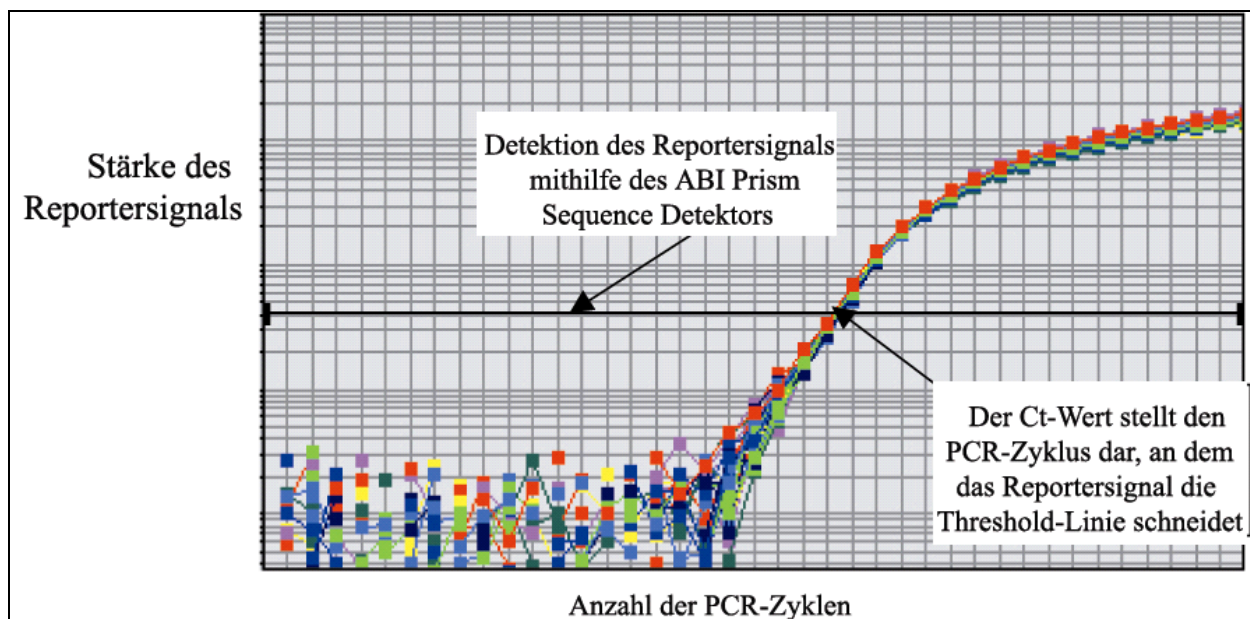


Abb. II.7: Darstellung einer Amplifikationskurve

Während bisherige PCR- Verfahren nur relativ unsensitive Aussagen über quantitative Unterschiede der abgelaufenen Amplifizierung in der Plateauphase machen konnten, erlaubt die quantitative RT- PCR eine schnelle automatisierte In- vitro- Beobachtung des Reaktionsablaufs in der exponentiellen Phase, so dass selbst kleinste Änderungen der Gesamtzahl an DNA- Kopien erfasst werden können.

Bei Auswahl der Sonden und dem Sondendesign sind bestimmte Punkte zu beachten, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, da die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten sequenzspezifischen Sonden von PE Applied Biosystems als standardisierte Primer-Probe Sets (Assay-on-demand) für die hier untersuchten Gene angeboten werden.

Prinzip der Berechnung der relativen Genexpression (nach Perkin- Elmer Corporation, 1997)

Zur Erfassung der Genexpressionsverhältnisse unbekannter Proben im Rahmen einer quantitativen TaqMan® PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit eine relative Quantifizierung durchgeführt. Das Prinzip der relativen Quantifizierung beruht darauf, daß man den Expressionswert der Zielsequenz semiquantitativ mithilfe eines Vergleichs zu einer zweiten, nicht verwandten Zielsequenz, ein in allen Zellen vorhandenes und gleichmäßig exprimiertes sogenanntes Haushalts-Gen abschätzt. Der Nachweis eines konstanten Expressionsniveaus dieses Haushalts- Genes dient somit als endogene Kontrolle, zu der Expressionswerte anderer Gene ins Verhältnis gesetzt werden können.

Zur quantitativen Auswertung setzt man die Zahlenwerte der unbekannt Proben in Verhältnis zu den Werten vorquantifizierter Standards. Bei den Standardproben (= Kalibrator) ist das Vorhandensein der zu untersuchenden Zielsequenzen, eine bekannte Konzentration von RNA sowie das Fehlen einer Fremdkontamination durch RNA oder DNA gewährleistet. Mithilfe des Kalibrators werden nach Herstellung einer exakt durchgeführten Verdünnungsreihe die Werte der Zielsequenzen für jede Verdünnungsstufe bestimmt. Durch Extrapolation zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen werden für jede Zielsequenz Standardkurven mit bekannter Geradengleichung erstellt (Perkin- Elmer Cooperation, 1997) (genaue Berechnung siehe unten). Über diese Standardkurven kann man nun auf die Ausgangsmenge der zu untersuchenden Sequenzen in den unbekannt Proben rückschließen und als relativen Unterschied im Vergleich zum Kalibrator zum Ausdruck bringen. Somit bietet das Prinzip der relativen Quantifizierung eine einfache Strategie, um die Expressionsverhältnisse verschiedener Gene miteinander zu vergleichen.

Erstellung der Standardkurven mit Hilfe eines Kalibrators (MDA- MB- 231)

Bei der Herstellung der Standardkurven ist auf die exakt durchgeführte Verdünnung der Stammlösung zu achten. Als Kalibrator wurden bei dieser Arbeit die menschliche Mammakarzinomzelllinie MDA- MB- 231 (Fa. ATCC; Nr. HTB 26) verwendet. 3,5 µl cDNA (≈ ca. 50 ng cDNA) dieser Stammlösung wurden 1: 5, 1: 25, 1: 50 usw. mit Aqua dest. verdünnt. Da die Ergebnisse der unbekannt Proben in Verhältnis zum Kalibrator interpretiert werden, stellt das Endergebnis eine einheitsfreie Zahl dar, so dass jede beliebige Lösung von cDNA verwendet werden kann. Da bei einer relativen Quantifizierung die Werte der Zielsequenzen in Beziehung zu einer endogenen Kontrolle, in diesem Fall das Haushalts- Gen TBP (Tata-

Box Binding Protein), interpretiert werden, wurden die Standardkurven sowohl für die 6 Zielgene als auch für die endogene Kontrolle hergestellt. Die Durchführung der PCR-Reaktion des Kalibrators (= Stammlösung) wurde analog wie bei den unbekannt Proben mit den entsprechenden Primer- Probe- Sets nach Protokoll durchgeführt. Alle zu untersuchenden Zielsequenzen wurden auf der PCR- Platte im doppelten Ansatz bestimmt, um den Standardmessfehler in Form etwaiger Pipettierungenauigkeiten kontrollieren zu können. Das jeweilige Mitführen von sogenannten NTCs (No template control), Negativansätze ohne cDNA- Gehalt, diente der Erkennung von Fremdkontaminationen durch RNA oder DNA. Als weitere Negativkontrolle wurde normale, humane, genomische DNA verwendet, deren quantitativer Wert nach PCR 0 ergeben musste, da intronhaltige DNA nicht amplifizierbar ist. Folgende Abbildung zeigt die Anordnung der Reaktionsansätze auf der 96- well-Reaktionsplatte am Beispiel von ADAM 17:

(Dieses Pipettierschema wurde analog ADAM 17 auch bei den anderen zu untersuchenden Gensequenzen verwendet.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AD A1	AD A2	AD A3	AD A4	AD A5	AD A6	AD A7	AD A8	AD A9	AD A10	NTC	NTC
B	AD B1	AD B2	AD B3	AD B4	AD B5	AD B6	AD B7	AD B8	AD B9	AD B10	Gen. DNA	Gen. DNA
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tab. II.1: Pipettierschema auf der 96- well-Reaktionsplatte (Abk.: NTC: No template control; Gen DNA: Genomische DNA)

In der Abb. II.1 zeigen die Zahlen A1- A10 die insgesamt 10 Verdünnungsstufen an; die einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils im Doppelansatz bestimmt;

Für die erste Stufe wurde nahezu unverdünnte Lösung der reversen Transkription verwendet, wovon 4 µl pro Well eingesetzt wurden. Für die nächste Verdünnungsstufe wurden 22 µl aus der unverdünnten Lösung mit 88 µl H₂O versetzt, was einer Verdünnung von 1:5 entspricht.

Auch davon wurden wiederum 4 µl pro Well eingesetzt. Nach demselben Schema wurde auch bei allen weiteren 1:5- Verdünnungen verfahren. Dies wurde insgesamt 10 mal durchgeführt, woraus sich insgesamt 10 Verdünnungsstufen ergaben.

Die 1.6 Version der SDS- Software ermöglicht nur die Erstellung einer Standardkurve der Mikrotiterplatte. Zur Berechnung der Kurven für alle Markergene wurden die Daten in ein EXCEL- Datenblatt eingegeben. Für die relative Quantifizierung ist der Ct- Wert und der Logarithmus der DNA- Menge, die in der Ausgangskonzentration der Stammlösung bekannt war und entsprechend dem jeweiligen Verdünnungsverhältnis abnahm, von Bedeutung. Mithilfe der Excel Diagrammfunktion (Scatter-Graph) wurden nun die einzelnen Standardkurven der Gene erstellt. Dabei wurden horizontal auf der X- Achse die Daten der Ct- Werte eingetragen, die y- Achse war für den logarithmierten Wert der cDNA- Menge vorgesehen. Die folgende Tabelle (Tab. II.2) zeigt einen Ausschnitt aus dem Exel- Datenblatt. Die daraus resultierende Standardkurve am Beispiel von ADAM 17 gibt nebenstehende Abbildung (Abb. II.8) wieder, aus der die Funktion des Graphen abzulesen ist:

Adam 17	ng	Log ng	Ct
	100	2	17,71
	100	2	17,46
	20	1,30103	19,8
	20	1,30103	19,71
	4	0,60205999	22,45
	4	0,60205999	22,45
	0,8	-0,09691001	24,38
	0,8	-0,09691001	24,72
	0,16	-0,79588002	27,84
	0,16	-0,79588002	27,54
	0,032	-1,49485002	29,75
	0,032	-1,49485002	29,5
	0,0064	-2,19382003	31,89
	0,0064	-2,19382003	32,5
	0,00128	-2,89279003	34,26
	0,00128	-2,89279003	35,2
	0,000256	-3,59176003	37,57
	0,000256	-3,59176003	37,52

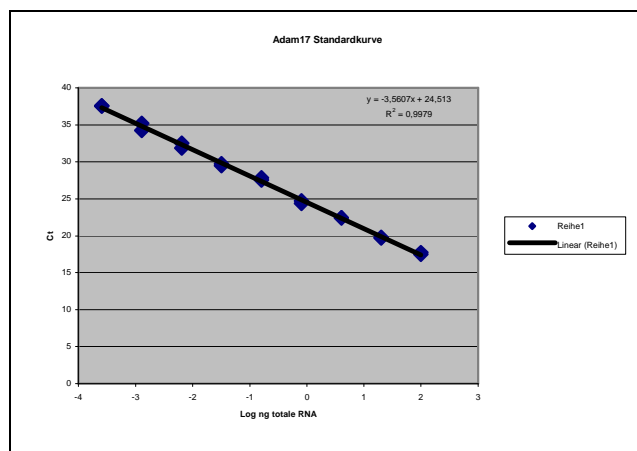


Abb. II.8: Beispielhafte Darstellung einer Standardkurve (ADAM 17)

Tab.II.2: Beispiel für Wertetabelle zur Berechnung der Standardkurven

Analog zu ADAM 17 wurden die Standardkurven für die Gene AXL, Her-2/neu, LMNB1, COL1A1, COL1A2 und das Haushaltsgen TBP erstellt.

Erstellung der Expressionsmittelwertverhältnisse zwischen den unbekanntem Proben und der endogenen Kontrolle

Mithilfe der durch die Standardkurvenmethode erhaltenen Geradenfunktion kann nach durchgeführter RT- PCR die in den unbekanntem Proben enthaltene Ausgangskonzentration von RNA der jeweiligen Zielsequenzen aus den C_t- Werten der Proben berechnet werden. Dies veranschaulichen folgende Formeln, die sich aus der Geradenfunktion der Standardkurven ableiten lassen:

$$y = mx + b \text{ (Geradenfunktion)}$$

$$\log \text{Ausgangskonzentration}_{\text{Probe}} = [(CT\text{-Wert}_{\text{Probe}}) - b/m]$$

$$\text{Ausgangskonzentration}_{\text{Probe}} = 10^{[\text{Zelle mit log Ausgangskonzentration}]}$$

Aus den beiden Werten des Doppelansatzes der logarithmierten Ausgangskonzentrationen werden die Zehnerpotenzen gebildet. Anschließend wird aus den Doppelansätzen der arithmetische Mittelwert gebildet, welcher in Verhältnis zum jeweiligen Mittelwert der endogenen Kontrolle gesetzt wird. Dieser Wert ermöglicht bei den zu untersuchenden Fällen, die verschiedenen Ausgangskonzentrationen der Zielsequenzen miteinander zu vergleichen. Die Standardabweichung der Quotienten beider Mittelwerte von der zu untersuchenden Zielsequenz und dem Haushalts- Gen wird nach folgender Formel berechnet:

$$cv^2 = \text{Wurzel}(cv_1^2 + cv_2^2)$$

Praktische Durchführung der RT- PCR

Die praktische Durchführung der RT- PCR für die Fallzahlen 1- 32 der unbekanntem Patientenproben (Primärtumor, Lymphknoten) wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Dabei wurden von PE Applied Biosystems fertig angebotenen Primer- Probe Sets (Assay-on-demand) für folgende Gene verwendet:

Adam17: Metalloprotease (Bestell- Nr. HS00234224)

AXL: Proteintyrosinkinase-Rezeptor (Bestell- Nr. Hs00242357)

LMNB1: Intermediärfilament (Bestell- Nr. Hs00194369):

COL1A1: Strukturprotein (Bestell- Nr. Hs00164004)

COL1A2: Strukturprotein (Bestell- Nr. Hs00164099)

Diese Assay-on-demand (siehe Bestell-Nummern) beinhalten Forward-, Reverse- Primer und Probe.

Primer und Sequenzen für Her- 2/neu und TBP (Haushalts- Gen):

Für die Amplifikation der cDNA von Her- 2/neu und TBP (TATA- Box Binding Protein) wurde schon vor längerer Zeit ein Set mit dem Primer-Express-Programm von Applied Biosystems (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) erstellt und im Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München etabliert. Für die Durchführung der vorliegenden Versuche konnte auf diese erprobten Sets zurückgegriffen werden:

Sequenzen von Primer und Probe (Herstellerangabe):

Her- 2/neu:

Forward-Primer: 5'-CCA-GGA-CCT-GCT-GAA-CTG-GT-3': 9 µmol/µl

Reverse-Primer: 5'-TGT- ACG-AGC-CGC-ACA-TCC-3': 1,5µmol/µl

Probe: 5'-FAM-CAG-ATT-GCC-AAG-GGG-ATG-AGC-TAC-CTG-TAMRA-3': 6nmol

TBP:

Forward- Primer 5'-GCC-CGA-AAC-GCC-GAA-TAT-3': 11 µmol/ µl

Reverse- Primer 5'-CCG-TGG-TTC-GTG-GCT-CTC-3': 13 µmol/ µl

Probe 5'-FAM-ATC-CCA-AGC-GGT-TTG-CTG-CGG-TAMRA-3: 6 nmol

Verdünnung der Probe: jeweils 6 nmol als lyophilisiertes Pellet

⇒ in 1µl DEPC- Wasser lösen

⇒ Endkonzentration im Well der PCR: 300 nM

Die einzelnen Gesamtansätze bestanden aus jeweils 20 µl. Diese umfassten 10 µl TaqMan Universal Master MIX (Applied Biosystems Bestell-Nr. 4304437), bestehend aus PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), MgCl₂ 5 mM, dNTPs mit einer Endkonzentration von 10 mM und der TaqPolymerase (5 U/µl). Zu diesen 10 µl wurden je 2 µl der Forward- und Reverseprimer (je 3 µM) und 2 µl der Probe (2 µM) hinzugefügt. Abschließend wurden jeweils 4 µl der unbekanntes cDNA- Proben in die Ansätze gegeben. Um Kontaminationen mit Fremd- DNA auszuschließen, wurden bei jedem Reaktionsansatz Negativkontrollen, Ansätze ohne Proben- cDNA, mitgeführt. Bei allen PCR- Untersuchungen kam derselbe Thermo- Cycler (TaqMan-Prozessor 7700 von Applied Biosystems) zum Einsatz. Die Zykluszahl betrug in allen Fällen 40 Amplifikationszyklen, welche nötig waren, um ein ausreichendes Signal zu erhalten. Initial wurden die Ansätze für 2 Minuten bei 50 °C der Wirkung der AmpErase UNG ausgesetzt. Nach weiteren 10 Minuten bei 95 °C zur Aktivierung der Taq-Polymerase folgten 40 Zyklen, bestehend aus weiteren 15 sec bei 95 °C zur Denaturierung und weiteren 60 Sekunden bei 60 °C für Anlagerung der Primer (Annealing) und Synthese (Extension). Nach Beendigung der Zyklen folgten 7 min bei 72 °C. Am Ende des Programms wurden die PCR- Produkte auf 4 °C abgekühlt und mit der Auswertung der Amplifikationskurven begonnen.

2.7 Durchführung der statistischen Auswertung

Die Umrechnung der Ct-Werte der untersuchten Gene in Mittelwertverhältnisse zu TBP wurde mit der Microsoft® Excel Software (Version 2002) entsprechend dem Protokoll von Applied Biosystems (PE Applied Biosystems, Foster City; USA) durchgeführt.

Für die Signifikanzbeurteilung der Expressionsänderung in den Lymphknotenmetastasen wurde eine Wilcoxon- Paaranalyse unter Zuhilfenahme des SPSS Software Pakets (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Dieses statistische Testverfahren wurde auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt. Als tendenziell signifikant beurteilt wurden Werte $p = 0,05 - 0,1$. Die statistische Auswertung fand am Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) der Technischen Universität München (Direktor: Univ-Prof. Dr. A. Neiss) statt.

3. Ergebnisse

3.1 Retrospektive Archivsuche

Die Vorauswahl geeigneter Patientenfälle erfolgte nach exakt vorher festgesetzten Kriterien. So wurden nur histologisch eindeutig befundete Fälle von Mammakarzinomen vom invasiv-duktalem und invasiv-lobulären Typ als geeignet eingestuft. Hinsichtlich des Tumorstadiums war der Nodalstatus nach TNM- Klassifikation entscheidend, wobei das Interesse den Fällen mit Befall der axillären Lymphknoten (N1) galt. Bei der klinischen Vorgeschichte wurde außerdem auf das Fehlen präexistenter oder koinzidenter Malignome sowie einer Fernmetastasierung geachtet. Weiterhin wurden ausschließlich Patientinnen mit einem Alter zwischen 32 und 63 Jahren berücksichtigt. In einer Vorauswahl wurden circa 130 Patientinnen, bei denen ein Mammakarzinom in den Jahren 1995 bis 1998 diagnostiziert und operiert wurde, ausgewählt. Nach erneuter histologischer Beurteilung der archivierten Schnittpräparate mit den dazugehörigen Paraffinblöcken blieben 32 Fälle übrig, von denen ausreichend Material vorhanden war und bei denen man von einer guten Nukleinsäurequalität im paraffinierten Gewebe ausgehen konnte.

3.2 Beschreibung der Studiengruppe (klinische Daten)

59 % der ausgewählten Patientinnen waren bei histologischer Diagnosestellung zwischen 50 und 60 Jahre alt. 22 % befanden sich zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr, 3 % waren unter 40 Jahre alt. 16 % hatten das 60. Lebensjahr überschritten. Das Durchschnittsalter der Studiengruppe liegt bei 47,5 Jahren. Der histologische Befund lautete in ca. 84 % der Fälle Mammakarzinom vom invasiv-duktalem Typ. 9 % entfielen auf den invasiv-dukto-lobulären Typ und je 3 % auf den invasiv-lobulären bzw. muzinösen Typ. 34 % der Mammakarzinome wurden als mittelgradig differenziert (G2) und 66 % als schlecht differenziert (G3) eingestuft.

Die Größe des Primärtumors lag bei der makroskopischen und histologischen Untersuchung bei 34 % der Patientinnen unter 2 cm (T1). Bei circa 47 % der Patientinnen lag ein Tumor zwischen 2- 5 cm Größe vor (T2). 9 % der Studiengruppe hatten einen Tumor größer 5 cm in Ausdehnung (T3) und 13 % wiesen einen Übergang des Tumorgewebes auf Brustwand oder Haut auf. Bei sämtlichen Patientinnen lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein metastatischer axillärer Lymphknotenbefall vor, wobei 41 % der Studienfälle eine Ausdehnung über die Lymphknotenkapsel hinaus aufwiesen. Weitere 41 % hatten einen Tumorbefall von

mindestens 4 Lymphknoten mit einer Metastasengröße unter 2 cm. 6 % wiesen einen Lymphknotenbefall größer 2 cm auf. Bei 12 % war lediglich der Nodalstatus N1 ohne genauere Klassifizierung in Erfahrung zu bringen. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die 32 Patientinnen mit Mammakarzinom. Neben zeitlichen Daten sind der Tabelle die genaue TNM- Klassifikation sowie Angaben zum Hormonrezeptorstatus der jeweiligen Fälle zu entnehmen. Die Zuteilung der Studiennummern erfolgte zufällig und wurde den gesamten Versuch über eingehalten:

Patientin Studiennummer	Jahrgang	OP- Jahr	T	N	M	Grading	Histologie	ER	PR	Her- 2/neu
1	1935	98	2 (m)	N1b (bi) 3/12	0	G 2	Invasiv- duktal	9	4	50%
2	1965	97	1c	N1bii 11/22	X	G3	Invasiv- duktal	6	4	--
3	1949	98	4b	N1biii 19/20	X	G3	Invasiv- duktal	3	3	--
4	1941	98	1c	N1bi 1/18	X	G3	Invasiv- duktal	9	2	--
5	1953	98	1c (m)	N1bii 6/12	X	G2	Invasiv- duktal	1	Neg.	
6	1935	97	2	N1bi 2/12	X	G3	Invasiv- duktal	2-4	Neg.	--
7	1942	97	2 (m)	N1bii 14/20	X	G3	Invasiv- duktal	Neg.	Neg.	100%
8	1939	97	3	N1bii 6/6	X	G3	Invasiv- duktal	9	9	--
9	1944	97	1c (m)	N1biii 11/18	X	G2	Invasiv- lobulär	6	6	--
10	1943	97	1c (m)	N1bi 2/7	X	G2	Invasiv- duktal	9	6	--
11	1949	97	2	N1bi 1/9	X	G2	Duktal- lobulär	6	12	--
12	1940	97	2 (m)	N1biii 8/21	X	G3	Invasiv- duktal	12	3	--
13	1946	98	2 (m)	N1biii 1/18	X	G2	Invasiv- duktal	12	12	Neg.
14	1941	97	1c	N(1bi) 1/10	X	G3	Invasiv- duktal	12	4	--

15	1941	96	1c	N1iii 2/15	X	G2	Invasiv- duktal	9	9	Neg.
16	1944	95	1c	N1bi 2/12	X	G3	Invasiv- duktal	1	9	--
17	1941	96	3	N1bi 3/16	X	G2	Invasiv- duktal	6	6	--
18	1944	95	2	N1bi 1/15	X	G2	Invasiv- duktal	2	9	--
19	1943	96	1c	N1bii 4/16	X	G2	Invasiv- duktal	1	Neg.	--
20	1943	97	2 (m)	N1bi 1/13	X	G3	Invasiv- duktal	6	3	--
21	1949	96	1c	N1bi 1/5	X	G3	Invasiv- duktal	Neg.	Neg.	--
22	1951	95	2	N1bii 5/22	X	G3	Invasiv- duktal	1	12	--
23	1940	95	2	N1a 2/8	X	G3	Invasiv- Duktal	4	Neg.	--
24	1957	97	3	N1biii 35/35		G3	Invasiv- duktal (inflamm.)	12	4	--
25	1937	95	2	N1biii 3/15	X	G3	Invasiv- muzinös	6	6	--
26	1949	97	2	N1 1/12	X	G3	Invasiv- duktal	12	5	--
27	1935	95	2(m)	N1bi 3/28	X	G3	Duktal- lobulär	6	9	--
28	1938	95	4(d)	N1biii 16/20	X	G3	Invasiv- Duktal	6	1	--
29	1951	95	4	N1biii (?)	X	G3	Duktal- Lobulär	2	6	--
30	1943	95	2	N1bi 1/25	X	G2	Invasiv- duktal	Neg.	Neg.	Neg.
31	1936	95	1c	N1bi 2/18	X	G3	Invasiv- duktal	4	0	--
32	1942	95	4	N1bii 5/11	X	G3	Invasiv- duktal	Neg.	Neg.	--

Tab. III.1: Klinisch- pathologische Informationen über die Studienfälle (n= 32)

	Alle Fälle	
	n	%
Geschlecht, weiblich	32	100
Alter in Jahren		
Median	53	
Maximum	62	
Minimum	32	
Range	30	
Histologie		
Invasiv-duktral	27	84,4 %
Invasiv- lobulär	1	3,1 %
Invasiv- duktulo-lobulär	3	9,4 %
Invasiv-muzinös	1	3,1 %
pTNM		
pT1	11	34,4 %
pT2	14	43,7 %
pT3/4	7	21,9 %
pN1	32	100 %
Kerngrading G		
1	0	0
2	10	34 %
3	21	66 %
ER/PR-positiv	28/24	87,5 %/ 75 %
ER/PR-negativ	4/8	12,5 %/ 25 %

Tabelle III.2: Prozentuale Verteilung der histomorphologischen, klinischen und tumorbiologischen Faktoren der untersuchten Studienfälle;

Abkürzungen: n, Anzahl der Studienfälle; pTNM, pathologisches Staging Tumorgroße, Lymphknoten, Fernmetastasierung; ER, Östrogenrezeptor; PR, Progesteronrezeptor

*** Her- 2/neu: 2 Fälle positiv; 3 negativ; sonst nicht bestimmt

3.3 Darstellung der erfolgreichen Mikrodissektion:

Alle 32 Fälle wurden unter gleichen, RNase- freien Arbeitsbedingungen mikrodisssektiert. Das Prinzip und die Durchführung der Mikrodisssektion wurden bereits ausführlich im Arbeitsteil Material und Methoden erläutert. Das Verfahren der LCM ermöglicht die präzise Isolierung von Gewebsarealen mit einem großen Anteil an Tumorzellen. Beispielhaft für die 32 Fälle veranschaulicht die folgende Abbildung die experimentelle Vorgehensweise und den Effekt der Mikrodisssektion. Die Abbildung **III.1 (a)** zeigt exemplarisch ausgewählte Zielareale mit soliden Tumorzellverbänden eines invasiv- duktales Mammakarzinoms. Abbildung **III.1(b)** (S.59) läßt am selben Schnittpräperat die präzise Herauslösung der Tumorzellverbände mithilfe der LCM erkennen.

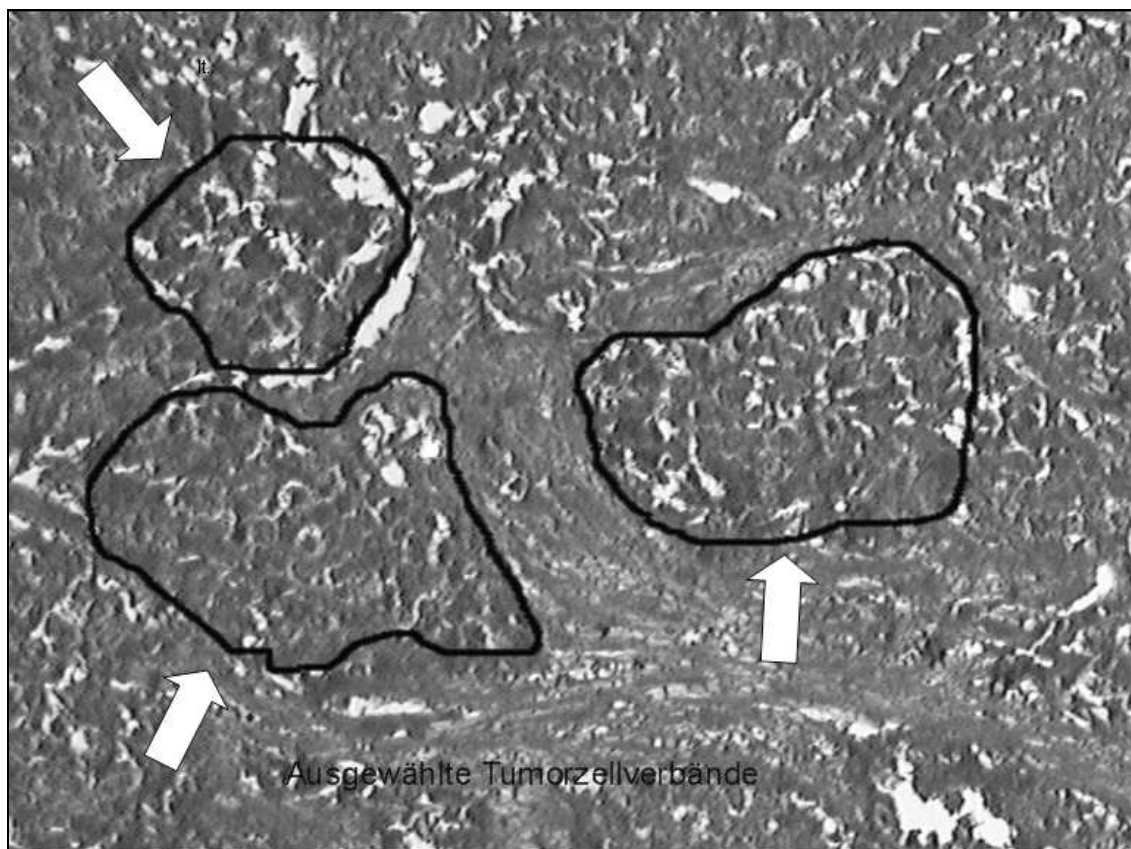


Abb.III.1 (a): Präperat vor Durchführung der LCM (60- fache Vergrößerung)

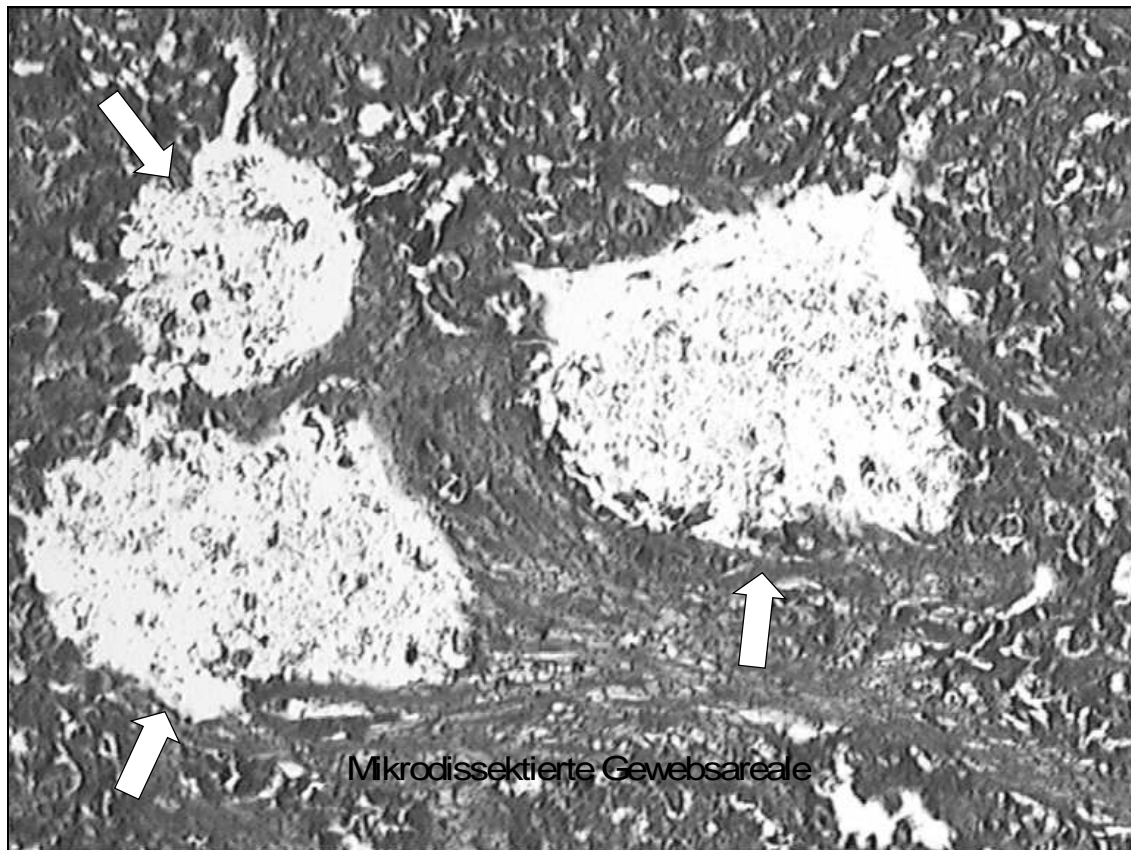


Abb. III.1 (b): Präparat nach LCM (60- fache Vergrößerung)

Um ausreichend Zellmaterial für die anschließende quantitative RT- PCR zur Verfügung zu haben, wurden je 2 separate, konsekutive Schnitte von Primärtumor und Lymphknoten der Mikrodissektion zugeführt, da folgende Faktoren Einfluß auf die Amplifikation von RNA aus histologischen Schnitten haben können:

- Alter des Materials (je älter das Material, um so schlechter ist es zu amplifizieren)
- Asservierung des Gewebes (Fixiermaterial, Fixierdauer, Paraffineinbettung, Färbungen)
- Dicke des Schnittes (Teile der Zellen sind in der Regel abgeschnitten, was zum Verlust von RNA führt)
- die RNA- Extraktion (Proteinase K Behandlung kann z.B. unvollständig sein)
(Roehrl MH et al., 1997)

Viele Arbeitsgruppen haben sich im Rahmen von Studien mit der Extraktion von RNA aus mikrodissektierten Geweben auseinandergesetzt (Emmert-Buck MR et al., 1996; Fend F et al., 2000). Um optimale Ergebnisse bei der LCM zu erzielen, ist auf die Art der Fixierung der Gewebe, die Vorbehandlung der Gewebeschnitte im richtigen flüssigen Medium, die RNase-

freien Arbeitsbedingungen und die Art des untersuchten Gewebes zu achten. Obwohl RNA aufgrund ubiquitär vorkommender RNasen schneller als DNA zu Degradation neigt, gelang es Specht et al. im Rahmen von Expressionsanalysen gute Ergebnisse mit mRNA aus mikrodissektiertem Gewebe zu erzielen (Specht K et al., 2001).

Nach Specht et al. stellt das Verfahren der Laser Capture Mikrodissektion (LCM) zusammen mit der quantitativen RT-PCR im Rahmen retrospektiver Studien eine rasch durchführbare, leicht handzuhabende und qualitativ hochwertige Methode dar, die es ermöglicht, Genexpressionsanalysen an formalinfixiertem Tumorgewebe aus Paraffinblöcken durchzuführen. Für die erfolgreiche Durchführung des Verfahrens werden folgende Punkte für wichtig erachtet:

1. Verwendung eines optimierten RNA-Extraktionsprotokolls, welches die Vernetzung von Nukleinsäuren und Proteinen aufbrechen soll
2. Die ausgewählten Zielsequenzen sollten nicht mehr als 65- 100 bp umfassen, da die aus Paraffinmaterial isolierte RNA unter Umständen fragmentiert und teilweise degradiert ist

Sowohl das Alter des Materials als auch die Lagerung der Tumorgewebe in Paraffin scheinen im Gegensatz dazu einen geringeren Einfluß auf die Qualität der Gewebe auszuüben (Specht K et al., 2001).

3.4 Ergebnisse der PCR- Untersuchungen

Im Anschluß an die Mikrodissektion wurde die mRNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und, wie in Material und Methoden beschrieben, einer RT-PCR mit dem ABI PRISM™ 7200 Sequence Detection System unterzogen. Die während der quantitativen TaqMan RT-PCR und der Fluoreszenzmessung generierten Ct- Werte wurden im Anschluß an die PCR in ein Excel- Datenblatt übertragen und mit der Excel- Software ausgewertet. Insgesamt wurden die 32 Fälle auf die Expression sechs verschiedener Gene in Primärtumorgewebe und Lymphknoten untersucht. Das Ziel der Untersuchungen war, die jeweiligen Genexpressionsprofile dieser Markergene individuell in Primärtumorgewebe und Lymphknoten jeweils einer Patientin, sowie in einer Zusammenschau aller Gene deren Expressionsveränderungen

zwischen den Patientinnen zu vergleichen. Die Auswahl der zu untersuchenden, mit Metastasierung in Verbindung gebrachten Gene wurde auf der Basis der neuesten Literatur getroffen, wobei insbesondere eine molekulargenetische Studie Berücksichtigung fand, die Genexpressionsprofile an nicht metastasierten und metastasierten Adenokarzinomen verschiedener Herkunft untersuchte (Ramaswamy S et al., 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte relative Quantifizierung der Genexpression erfordert die jeweilige Berechnung der Transkriptmengen der ausgewählten Gene im Verhältnis zu einem Standardgen. Als Standardgen diente bei dieser Untersuchung das Haushaltsgen TBP. Somit ist ersichtlich, dass es sich bei den im folgenden dargestellten Ergebnissen nicht um absolute Zahlen, sondern um Mittelwertverhältnisse im Bezug auf ein Standardprobenmaterial handelt. Um Aussagen über möglicherweise zu erwartende Veränderungen des Genexpressionsmusters im Primärtumor und einer Lymphknotenmetastase treffen zu können, ist es nützlich, im ersten Teil der Ergebnisdarstellung einen Überblick über das jeweilige Ausgangsniveau der Genexpression für die einzelnen Gene im Primärtumor zu geben. Hierzu wurden die Expressionswerte jedes einzelnen Gens der Fallnummern 1- 32 miteinander verglichen. Da es sich bei den Expressionswerten um ungleich verteilte relative Zahlenwerte mit Ausreißerwerten handelt, wurden die Daten mit einer empirischen Verteilungsfunktion geordnet. Mit der daraus abgeleiteten Perzentilendarstellung gelingt eine übersichtliche Darstellung der Expressionswerte in ein Gesamtbild. Expressionswerte oberhalb der 75. Perzentile wurden als höheres, Werte unter der 25. Perzentile als niedrigeres Expressionsniveau eingestuft. Der Quartilsabstand mit 50 % der Werte wurde als mittlerer Expressionsbereich festgelegt. Zur Charakterisierung der Durchschnittswerte wurde der Medianwert herangezogen, der bezüglich Ausreißerwerte unverfälschter als der arithmetische Mittelwert ist. Als Dispersionsmaß wurde die Range verwendet. Bei der graphischen Darstellung des Expressionsniveaus der einzelnen Gene in den Primärtumoren wurden auch die Mittelwerte und Standardabweichungen berücksichtigt, da im Diskussionsteil eine stärkere Gewichtung der Extremwerte vorgenommen wurde (siehe Diskussion, Abschnitt **IV.8**; S. 99)

Ct- Werte und Mittelwertverhältnisse der Genexpression in den Primärtumoren

Nach Durchführung der RT- PCR wurden aus den Ct- Werten der jeweiligen Zielsequenzen die Expressionsmittelwerte für die Fälle 1- 32 errechnet und ins Verhältnis zu dem in allen menschlichen Zellen auf annähernd gleichem Niveau exprimierten Transkription-

regulationsgen TBP (TATA-Box Binding Protein) gesetzt. Der daraus entstandene Zahlenwert steht dabei für die relative Kopienzahl im Vergleich zur mRNA von TBP:

Die folgenden beiden Tabellen zeigen die Ct- Werte und die daraus errechneten Mittelwertverhältnisse der 6 Markergene zu TBP in den Primärtumoren:

Fall	CT ADAM	CT AXL	CT LMNB1	CT Her-2/neu	CT COL1A1	CT COL1A2	CT TBP
1A	30,59	29,43	28,08	30,81	22,99	25,08	30,65
2A	28,95	27,31	25,65	29,99	20,76	23,14	29,50
3A	27,31	26,19	24,58	31,07	20,52	22,97	27,78
4A	26,69	27,80	24,41	30,06	22,80	25,22	27,95
5A	28,09	27,58	26,13	29,33	21,46	23,88	28,59
6A	28,42	28,70	25,91	30,98	22,19	24,74	28,50
7A	27,33	27,43	25,85	26,42	20,78	23,50	28,70
8A	27,62	27,50	26,79	26,02	22,46	25,39	28,93
9A	30,51	28,21	30,92	30,18	22,27	24,26	31,36
10A	27,78	28,17	26,09	28,79	22,54	25,75	28,54
11A	29,23	27,86	27,32	30,44	19,80	22,07	28,82
12A	29,02	26,59	27,81	29,30	23,37	25,49	28,97
13A	28,36	26,74	24,98	28,69	21,77	23,95	28,29
14A	26,73	24,78	24,63	29,17	19,31	22,03	27,82
15A	27,56	25,42	26,28	29,67	18,53	21,86	27,91
16A	28,12	26,64	27,69	27,83	20,36	23,29	28,35
17A	30,25	28,00	28,49	29,54	23,60	27,37	31,28
18A	31,87	27,89	30,55	32,58	21,47	25,29	30,75
19A	30,36	28,45	30,09	31,85	22,24	25,30	29,93
20A	32,12	31,84	30,74	31,86	26,85	30,01	31,45
21A*	40,00	33,93	30,80	40,00	27,19	28,78	33,68
22A	32,94	30,03	28,09	33,49	23,15	25,86	31,20
23A	28,14	27,05	28,63	28,92	19,84	22,52	28,85
24A	28,43	27,47	25,93	30,11	23,11	25,35	28,14
25A	31,67	29,86	28,11	32,82	29,91	32,10	31,07
26A	29,22	27,81	27,89	29,98	21,03	23,27	29,78
27A	32,97	30,01	29,12	31,04	26,55	28,63	30,94
28A	28,62	28,37	26,32	29,58	21,82	25,01	28,38
29A	29,66	29,43	26,70	31,91	24,55	26,65	29,49
30A*	39,06	37,70	35,27	40,00	31,40	35,51	36,44
31A	26,27	26,03	24,02	28,26	19,83	22,79	25,76
32A	27,77	26,87	26,57	28,44	19,86	22,04	29,11

Tab. III.3: Übersicht über die Ct- Werte der 7 gemessenen Gene in den 32 Primärtumoren: die aufgeführten Ct- Werte stellen Mittelwerte aus den im doppelten Ansatz bestimmten Patientenproben dar

Aus den Doppelansätzen zur Minimierung des Standardmeßfehlers wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ein Wert zur Darstellung verwendet. Die rot unterlegten Studienfälle besitzen Ct- Werte, die auf eine geringere RNA- Qualität oder eine kleinere in die RT- PCR eingesetzte Ausgangsmenge in den Proben schließen lassen (siehe Diskussion, Abschnitt IV.7; S. 98).

Die genaue Vorgehensweise bei der Auswertung der Primärdaten ist dem Arbeitsteil Material und Methoden zu entnehmen.

Aus den oben dargestellten Ct- Werten wurden die Expressionswerte errechnet, welche mit den Expressionswerten aus den Ct- Werten von TBP ins Verhältnis gesetzt wurden.

Die statistischen Maßzahlen wie Mittelwert, Median und Range sowie die Ratiowerte der Genexpression zu TBP in den Primärtumoren sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Patienten-Nummern	Mittelwert ADAM17/TBP	Mittelwert AXL/TBP)	Mittelwert (LMNB1/TBP)	Mittelwert (Her-2 /TBP)	Mittelwert COL1A1/TBP	Mittelwert (COL1A2/TBP)
1A PT	0,44	0,18	0,71	1,77	6,83	1,71
2A PT	0,63	0,34	1,72	1,42	13,10	2,73
3A PT	0,59	0,23	1,11	0,24	4,95	0,99
4A PT	1,01	0,09	1,42	0,51	1,43	0,29
5A PT	0,61	0,16	0,70	1,15	4,87	0,98
6A PT	0,47	0,07	0,77	0,43	2,93	0,56
7A PT	1,10	0,19	0,89	6,66	7,82	1,33
8A PT	1,05	0,22	0,57	9,87	3,31	0,49
9A PT	0,75	0,63	0,18	4,09	17,14	4,51
10A PT	0,73	0,11	0,69	1,53	2,43	0,31
11A PT	0,34	0,16	0,37	0,70	15,08	3,36
12A PT	0,42	0,66	0,30	1,48	1,90	0,47
13A PT	0,43	0,23	1,22	1,38	3,33	0,78
14A PT	0,90	0,61	1,15	0,77	10,82	1,82
15A PT	0,57	0,43	0,41	0,62	18,69	2,15
16A PT	0,52	0,25	0,22	2,37	8,06	1,20
17A PT	0,84	0,68	0,83	5,61	7,23	0,66
18A PT	0,21	0,52	0,16	0,69	18,86	1,66
19A PT	0,33	0,22	0,13	0,63	7,02	0,98
20A PT	0,28	0,06	0,22	1,62	1,11	0,15
21A PT	0,01	0,07	0,12	0,06	3,69	1,33
22A PT	0,15	0,17	1,03	0,55	9,05	1,56
23A PT	0,69	0,27	0,16	1,70	14,92	2,59
24A PT	0,37	0,13	0,60	0,55	1,32	0,30
25A PT	0,41	0,18	0,95	0,75	0,14	0,03
26A PT	0,63	0,29	0,47	1,67	13,13	2,98
27A PT	0,16	0,15	0,43	1,84	0,94	0,24
28A PT	0,38	0,09	0,54	0,91	3,41	0,43
29A PT	0,40	0,09	0,86	0,46	1,32	0,33
30A PT	0,09	0,04	0,28	0,34	1,66	0,13

31A PT	0,33	0,07	0,46	0,36	2,16	0,32
32A PT	1,05	0,36	0,73	2,71	17,79	4,13
Mittelwert	0,53	0,25	0,64	1,73	7,08	1,56
Median	0,45	0,18	0,59	1,03	4,91	0,98
Range	1,09	0,64	1,60	9,81	18,72	4,48

Tab. III.4: Expressionswerte der 6 Gene in den Primärtumoren dargestellt als Mittelwertverhältnisse zu TBP

Darstellung des Expressionsniveaus der einzelnen Markergene in den Primärtumoren

ADAM 17

Die Expressionswerte für ADAM 17 in allen 32 Primärtumoren weisen einen arithmetischen Mittelwert von 0,53 und einen Median von 0,45 auf. Die Studienfälle 4, 7, 8, 9, 10, 14, 17, 32 weisen Ratiowerte oberhalb der 75. Perzentile, die einem Wert von 0,76 entspricht, auf. Der Höchstwert findet sich bei Fallnummer 7. Die Studienfälle 18, 19, 20, 21, 22, 27, 30, 31 spiegeln die Ratiowerte unterhalb der 25. Perzentile wieder. Bei Studienfall 21 konnte der geringste Expressionswert für ADAM 17 beobachtet werden. Die restlichen Studienfälle bewegen sich in einem mittleren Expressionsbereich, wie aus Abb. III.2 (a) ersichtlich wird.

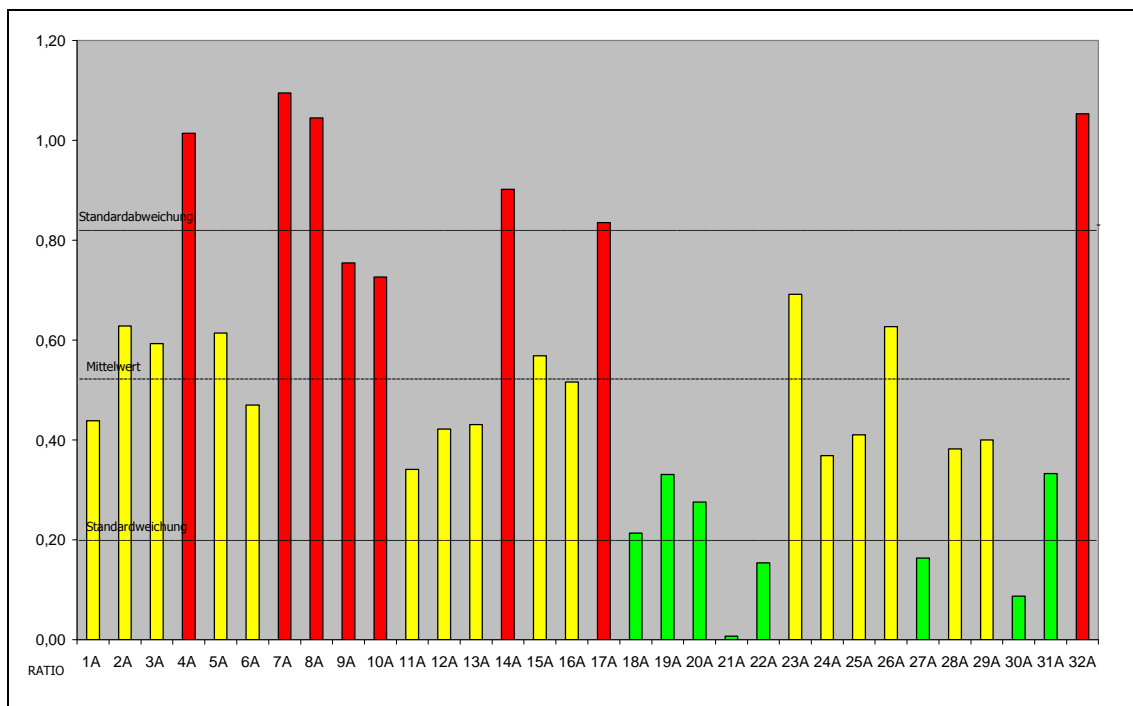
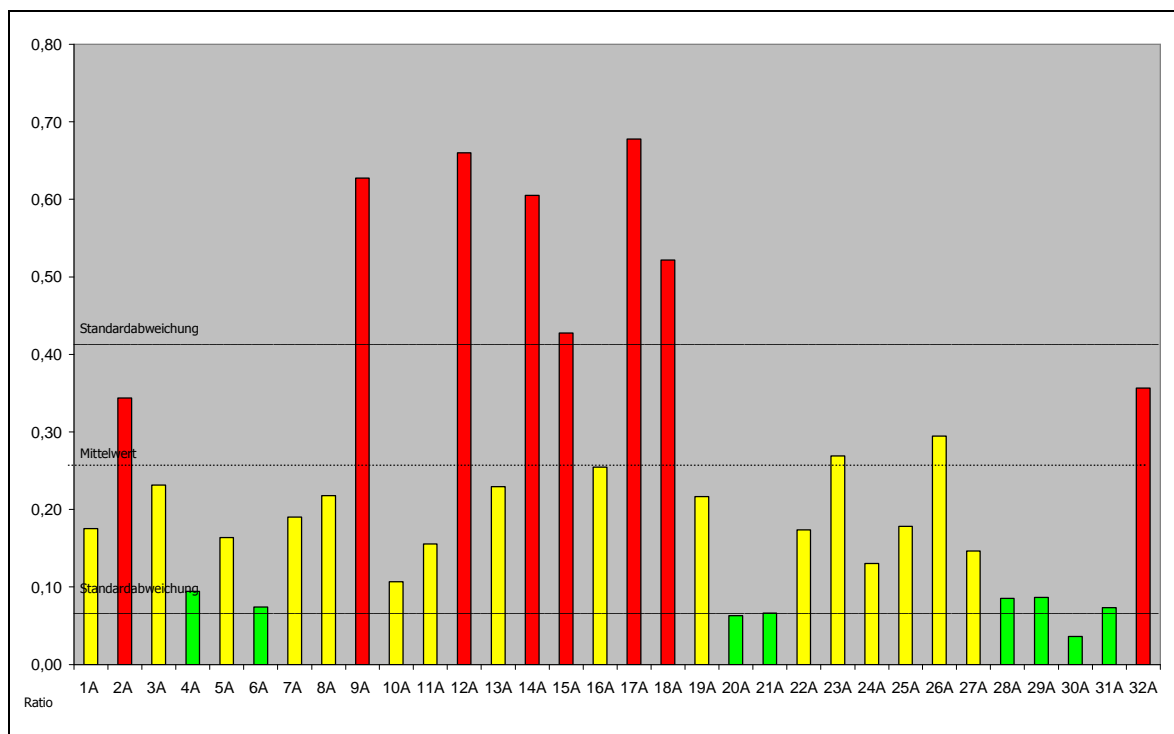


Abb. III.2 (a): Relatives Expressionsniveau für ADAM 17 (Ratio ADAM17/ TBP) in den Primärtumoren (n= 32)

ADAM 17	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
Fallzahl n= 32	0,53	0,29	0,01	1,10	0,33	0,45	0,72

Tab. III.5: Statistik ADAM 17**AXL**

Der Median für AXL zeigt einen Wert von 0,18. Höheres Expressionsniveau von AXL liegt bei den Studienfällen 2, 9, 12, 14, 15, 17, 18 und 32 vor, wobei Studienfall 17 mit einer Ratio von 0,68 den Maximalwert besitzt. In einem mittleren Expressionsbereich mit 50 % der Werte befinden sich die Studienfälle 1, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 15, 22, 23, 24, 25, 26 und 27. Geringeres Expressionsniveau zeigen die Studienfälle 4, 6, 20, 21, 28, 29, 30 und 31 mit Expressionswerten unterhalb der 25. Perzentile. Bei Studienfall 30 war die Anzahl der in die PCR eingesetzten Startkopien bei einem Ratiowert von 0,04 im Probenansatz sehr niedrig, so dass gerade noch ein Nachweis möglich war.

**Abb. III.2 (b):** Relatives Expressionsniveau für AXL (Ratio AXL/TBP) in den Primärtumoren (n= 32)

AXL	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
Fallzahl n= 32	0,25	0,19	0,04	0,68	0,10	0,18	0,33

Tab. III.6: Statistik AXL

LMNB1

Lamin B1 ist höher exprimiert in den Primärtumoren der Studienfälle 3, 4, 7, 13, 14, 17, 22, 25 und 2, welcher den höchsten Expressionswert besitzt. Niedrigere Expressionswerte mit Ratiowerten unter 0,28 lassen sich bei den Fällen 9, 16, 18, 19, 20, 21, 23 und 30 nachweisen. Bei den restlichen 50 % der Studienfälle liegt die Expression von Lamin B1 in einem mittleren Bereich.

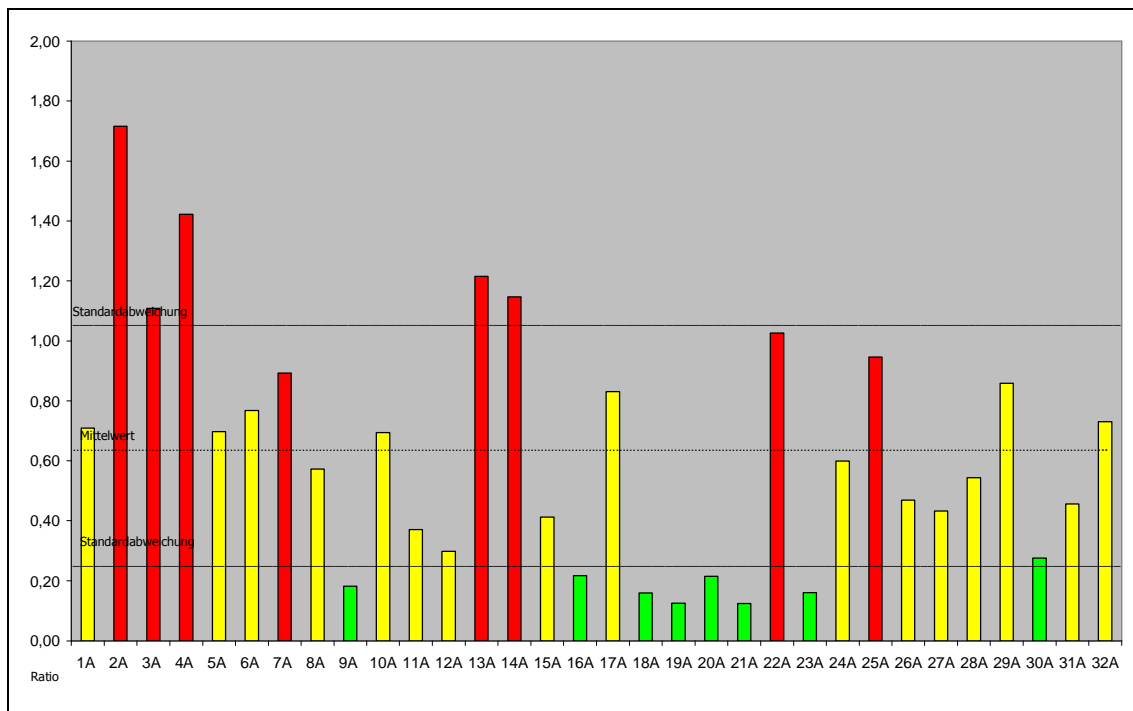


Abb. III.2 (c): Relatives Expressionsniveau für LMNB1 (Ratio LMNB1/ TBP) in den Primärtumoren (n= 32)

LMNB1	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
Fallzahl n= 32	0,64	0,40	0,12	1,72	0,28	0,59	0,88

Tab. III.7: Statistik LMNB1

Her- 2/neu

Die Expression des Tyrosinkinaserzeptors Her- 2/neu weist in den Primärtumoren der Studienfälle 1, 7, 8, 9, 16, 17, 27 und 32 ein höheres Ausgangsniveau auf, wobei Studienfall 8 mit einem Mittelwertverhältnis von 9,87 den höchsten Ratiowert aufzeigt. Das geringste Expressionsniveau liegt bei Studienfall 21 vor. Niedrigere Ratiowerte weisen zudem die Studienfälle 3, 4, 6, 21, 24, 29, 30 und 31 auf.

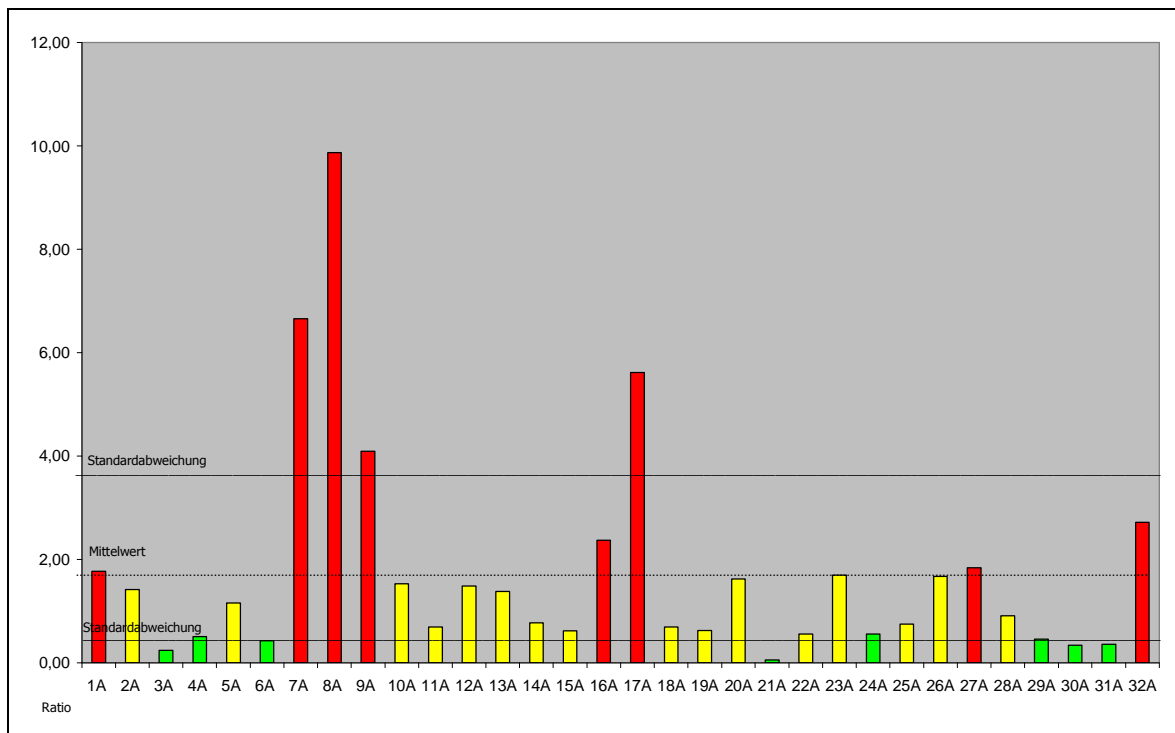


Abb. III.2 (d): Relatives Expressionsniveau für Her-2/neu (Ratio Her-2/neu/TBP) in den Primärtumoren (n= 32)

Her-2/neu	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
Fallzahl n= 32	1,73	2,10	0,06	9,87	0,55	1,03	1,75

Tab. III.8: Statistik Her-2/neu

COL1A1

Ein relativ höheres Expressionsniveau von COL1A1 zeigen die Studiennummern 2, 9, 11, 15, 18, 23, 26 und 32. Die Ratiowerte der Studienfälle 9, 15, 18 und 32 befinden sich im Bereich des Maximalwertes von 18,86. Die niedrigsten Expressionswerte besitzen die Primärtumoren der Studienfälle 4, 12, 20, 24, 25, 27, 29 und 30. Die übrigen 50 % der Ratiowerte für COL1A1 befinden sich in einem mittleren Bereich zwischen 1,97 und 12,53.

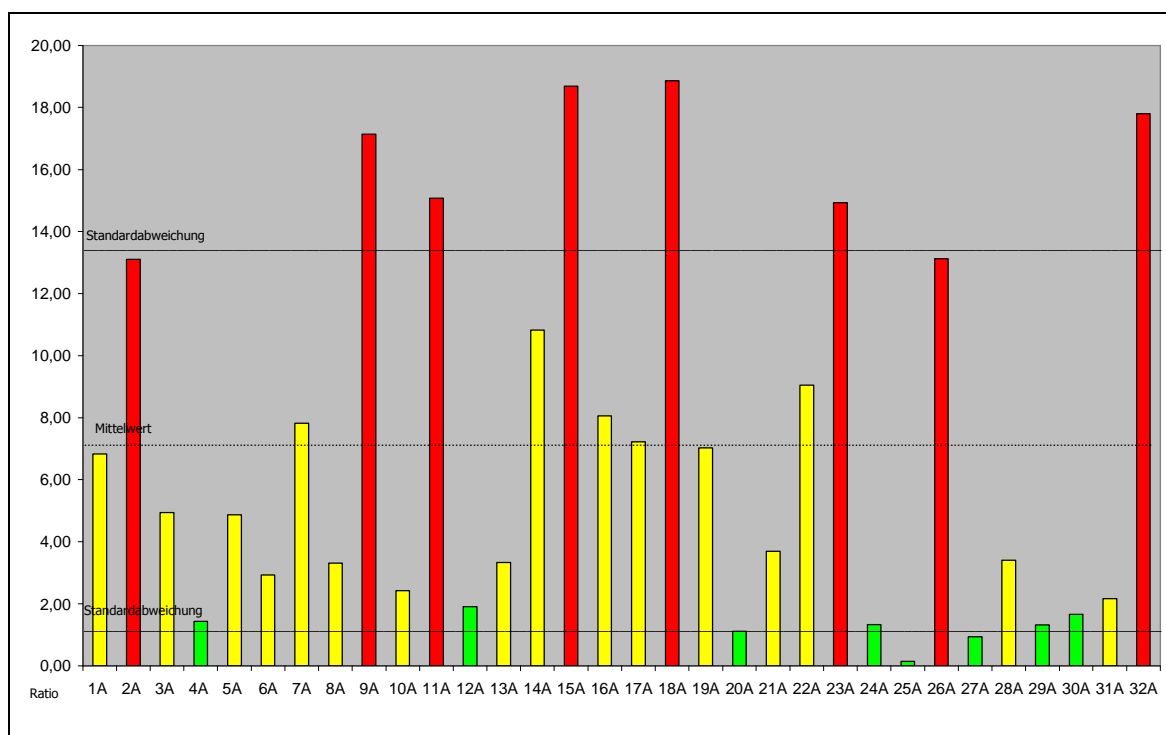


Abb. III.2 (e): Relatives Expressionsniveau COL1A1 (COL1A1/TBP) in den Primärtumoren (n= 32)

COL1A1	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
Fallzahl n= 32	7,08	6,08	0,14	18,86	1,97	4,91	12,53

Tab. III.9: Statistik COL1A1

COL1A2

Bei den Studienfällen 2, 9, 11, 14, 15, 23, 26 und 32 liegen höhere Expressionswerte nach der Perzentilenverteilung vor. 25 % der Studiengruppe (Studienfall 4, 10, 24, 25, 27, 30 und 31) sind durch ein geringeres Ausgangsniveau der COL1A2 Expression in den Primärtumoren gekennzeichnet. Bei den übrigen 16 Studienfällen ist ein mittleres Expressionsniveau erkennbar.

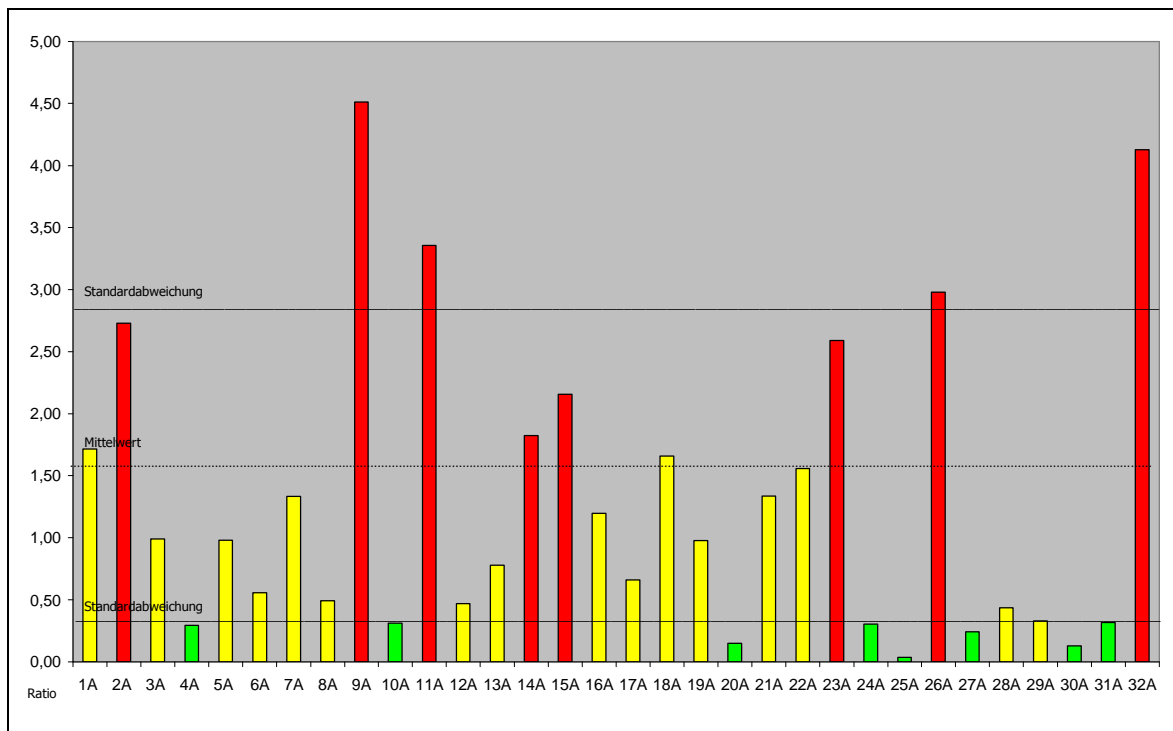


Abb. III.2 (f): Relatives Expressionsniveau COL1A2 (Ratio COL1A2/TBP) in den Primärtumoren (n= 32)

COL1A2	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
Fallzahl n= 32	1,56	1,30	0,03	4,51	0,32	0,98	1,80

Tab. III.10: Statistik COL1A2

Die folgende Tabelle (Tab. III.11) zeigt zusammenfassend eine graphische Übersicht über das Expressionsniveau aller Gene in den Primärtumoren. Die mit rot markierten zeigen hohe, die mit gelb unterlegten Felder mittlere und die grünen Bereiche niedrigere Ratiowerte in den Primärtumoren:

Patienten-Nummern	Mittelwert ADAM17/TBP	Mittelwert AXL/TBP)	Mittelwert (LMNB1/TBP)	Mittelwert (Her-2/TBP)	Mittelwert COL1A1/TBP	Mittelwert (COL1A2/TBP)
1A PT	0,44	0,18	0,71	1,77	6,83	1,71
2A PT	0,63	0,34	1,72	1,42	13,10	2,73
3A PT	0,59	0,23	1,11	0,24	4,95	0,99
4A PT	1,01	0,09	1,42	0,51	1,43	0,29
5A PT	0,61	0,16	0,70	1,15	4,87	0,98
6A PT	0,47	0,07	0,77	0,43	2,93	0,56
7A PT	1,10	0,19	0,89	6,66	7,82	1,33
8A PT	1,05	0,22	0,57	9,87	3,31	0,49
9A PT	0,75	0,63	0,18	4,09	17,14	4,51
10A PT	0,73	0,11	0,69	1,53	2,43	0,31
11A PT	0,34	0,16	0,37	0,70	15,08	3,36
12A PT	0,42	0,66	0,30	1,48	1,90	0,47
13A PT	0,43	0,23	1,22	1,38	3,33	0,78
14A PT	0,90	0,61	1,15	0,77	10,82	1,82
15A PT	0,57	0,44	0,41	0,62	18,69	2,15
16A PT	0,52	0,25	0,22	2,37	8,06	1,20
17A PT	0,84	0,68	0,83	5,61	7,23	0,66
18A PT	0,21	0,52	0,16	0,69	18,86	1,66
19A PT	0,33	0,22	0,13	0,63	7,02	0,98
20A PT	0,28	0,06	0,22	1,62	1,11	0,15
21A PT	0,01	0,07	0,12	0,06	3,69	1,33
22A PT	0,15	0,17	1,03	0,55	9,05	1,56
23A PT	0,69	0,27	0,16	1,70	14,92	2,59
24A PT	0,37	0,13	0,60	0,55	1,32	0,30
25A PT	0,41	0,18	0,95	0,75	0,14	0,03
26A PT	0,63	0,29	0,47	1,67	13,13	2,98
27A PT	0,16	0,15	0,43	1,84	0,94	0,24
28A PT	0,38	0,09	0,54	0,91	3,41	0,43
29A PT	0,40	0,09	0,86	0,46	1,32	0,33
30A PT	0,09	0,04	0,28	0,34	1,66	0,13
31A PT	0,33	0,07	0,46	0,36	2,16	0,32
32A PT	1,05	0,36	0,73	2,71	17,79	4,13

Tab. III.11: Darstellung der relativen Genexpressionswerte der 6 untersuchten Gene

Legende: rot= höhere Expression; gelb= mittlere Expression; grün= niedrigere Expression

Darstellung der Expressionsänderung Primärtumor- Lymphknotenmetastase

Die Tabelle III.12 gibt einen Überblick über die Ct-Werte in den Lymphknotenmetastasen. Die Ct- Werte der Studienfälle 20* und 23* sind jeweils in roter Farbe hervorgehoben. Die sehr hohen Ct- Werte für TBP aus den Doppelwertbestimmungen (hier nicht dargestellt) bei diesen Studienfällen können analog den Primärtumoren der Fälle 21 und 30 sowohl auf eine schlechte Qualität als auch auf eine geringe Ausgangsmenge der isolierten RNA zurückzuführen sein. Diese Studienfälle wurden bei der Bewertung der Ergebnisse im Diskussionsteil in einem gesonderten Abschnitt erwähnt (siehe Diskussion, Abschnitt 4.7; S. 98).

Fall	Ct ADAM 17	Ct AXL	Ct LMNB1	Ct Her-2/neu	Ct COL1A1	Ct COL1A2	Ct TBP
1B	28,59	27,57	27,25	28,95	23,91	25,69	29,00
2B	30,16	29,45	27,19	31,92	24,66	26,66	31,05
3B	27,19	26,82	23,81	32,52	22,19	24,86	27,21
4B	27,39	28,72	24,85	30,15	22,89	25,70	27,95
5B	30,17	30,91	28,34	31,27	26,57	28,35	30,99
6B	27,95	28,55	24,74	30,97	23,18	25,59	27,29
7B	26,47	28,26	24,29	23,62	21,89	24,39	27,38
8B	27,80	27,60	26,22	23,68	23,20	25,37	27,96
9B	26,07	26,61	26,66	28,93	22,13	25,01	27,62
10B	28,76	29,45	27,17	33,76	27,37	29,74	30,11
11B	28,35	27,39	28,06	29,33	21,00	23,22	28,42
12B	29,07	28,00	28,20	28,14	23,64	25,82	28,53
13B	27,03	25,70	23,59	26,47	21,13	24,22	28,08
14B	27,94	26,97	24,20	30,42	22,28	25,19	28,27
15B	31,13	28,31	29,84	32,00	27,42	30,67	30,61
16B	30,14	29,95	28,41	29,38	24,25	26,05	29,57
17B	26,54	26,72	23,29	25,43	23,86	26,19	27,29
18B	28,64	27,94	26,56	29,40	21,65	25,34	28,30
19B	31,92	30,17	30,46	31,11	26,08	29,32	30,88
20B*	35,67	32,80	36,36	36,09	28,20	32,16	34,84
21B	27,79	28,10	25,37	30,35	25,93	28,49	28,20
22B	32,13	30,37	28,89	33,09	23,50	26,17	30,88
23B*	34,06	31,01	33,02	32,93	29,08	32,22	33,58
24B	27,13	26,35	24,22	28,62	22,10	24,63	27,09
25B	30,05	29,10	30,40	29,32	24,73	27,54	30,39
26B	30,69	30,42	27,47	30,20	25,34	28,17	30,21
27B	28,12	26,59	26,19	28,05	22,49	25,04	28,41
28B	28,80	28,40	27,22	29,04	22,33	25,50	28,91
29B	28,56	27,55	24,71	28,46	23,27	26,24	28,13
30B	27,58	27,74	25,65	27,27	21,13	23,56	28,74
31B	28,83	28,32	27,29	32,77	26,97	29,07	28,83
32B	26,88	26,85	25,93	26,43	19,96	22,52	28,49

Abb. III.12: Übersicht über die Ct-Werte der 7 untersuchten Gene in den Lymphknotenmetastasen: die aufgeführten CT- Werte stellen Mittelwerte aus den im doppelten Ansatz bestimmten Patientenproben dar

Im Folgenden wird die Veränderung der Expression in den Lymphknotenmetastasen der Primärtumoren 1- 32 dargestellt.

Analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise bei den Primärtumoren wurden die Expressionsmittelwertverhältnisse für die mikrodisszierten Lymphknotenmetastasen der Studienfälle 1- 32 aus den Ct- Werten berechnet.

Die statistischen Maßzahlen wie Mittelwert, Median und Range sowie die Ratiowerte der Genexpression zu TBP in den Lymphknotenmetastasen sind folgender Tabelle (Tab. III.13) zu entnehmen:

Patienten-Nummern	Mittelwert ADAM17/TBP	Mittelwert AXL/TBP	Mittelwert (LMNB1/TBP)	Mittelwert (Her-2/TBP)	Mittelwert COL1A1/TBP	Mittelwert (COL1A2/TBP)
1B LK	0,57	0,21	0,44	1,87	1,40	0,44
2B LK	0,76	0,23	1,67	1,25	3,30	0,88
3B LK	0,46	0,11	1,32	0,08	1,30	0,23
4B LK	0,89	0,05	1,07	0,48	1,35	0,22
5B LK	0,73	0,09	0,77	1,70	0,99	0,30
6B LK	0,30	0,04	0,75	0,20	0,75	0,15
7B LK	0,81	0,05	1,07	14,68	1,73	0,33
8B LK	0,60	0,11	0,44	20,45	1,15	0,20
9B LK	0,65	0,16	0,27	0,78	1,71	0,27
10B LK	1,07	0,13	0,94	0,23	0,35	0,08
11B LK	0,47	0,16	0,18	1,04	5,74	1,32
12B LK	0,30	0,11	0,17	2,14	1,20	0,29
13B LK	0,88	0,41	2,62	4,39	4,27	0,58
14B LK	0,55	0,20	1,99	0,50	2,41	0,36
15B LK	0,31	0,36	0,23	0,89	0,47	0,06
16B LK	0,31	0,13	0,30	2,10	1,65	0,49
17B LK	0,73	0,12	1,92	4,87	0,49	0,11
18B LK	0,36	0,11	0,44	0,93	2,70	0,34
19B LK	0,80	0,13	0,18	1,74	1,24	0,16
20B LK	0,24	0,29	0,05	1,19	4,19	0,35
21B LK	0,59	0,09	0,89	0,50	0,25	0,05
22B LK	0,19	0,11	0,49	0,55	4,30	1,04
23B LK	0,31	0,42	0,23	3,46	1,12	0,15
24B LK	0,44	0,14	0,93	0,68	1,26	0,24
25B LK	0,54	0,19	0,14	3,62	2,07	0,34
26B LK	0,32	0,07	0,82	1,94	1,29	0,21
27B LK	0,54	0,27	0,60	2,18	2,30	0,44
28B LK	0,47	0,12	0,42	1,65	3,43	0,45
29B LK	0,34	0,12	1,38	1,42	1,19	0,20
30B LK	0,94	0,16	1,05	4,20	6,58	1,32
31B LK	0,44	0,12	0,38	0,18	0,20	0,05
32B LK	0,93	0,18	0,55	4,28	8,28	1,54
Mittelwert	0,56	0,16	0,77	2,69	2,21	0,41
Median	0,54	0,13	0,58	1,54	1,38	0,30
Range	0,88	0,37	2,57	20,37	8,08	1,49

Tabelle III.13: Expressionswerte der 6 untersuchten Gene in den Lymphknotenmetastasen dargestellt als Mittelwertverhältnisse zu TBP

Beim Vergleich der Genexpression in den Lymphknotenmetastasen mit den korrespondierenden Primärtumoren lautete die Fragestellung, ob und wie sich das Expressionsniveau der mRNA der einzelnen Gene in den Lymphknotenmetastasen von den Primärtumoren unterscheidet. Hierzu wurde als statistisches Auswerteverfahren ein Wilcoxon- Test für verbundene Stichproben (siehe dort) gewählt, mit dem die unterschiedliche Anzahl der mRNA Kopien in Primärtumoren und den entsprechenden Lymphknotenmetastasen auf Signifikanz beurteilt wurden.

Die Prüfung auf Signifikanz wurde zum einen für den unbereinigten Datensatz, d.h. für die Mittelwertverhältnisse aller Fallnummern, und zum anderen für einen ausgelesenen Datensatz, welcher den zufälligen Fehler berücksichtigt, durchgeführt. Der zufällige Fehler beruht auf Ungenauigkeiten in der experimentiellen Arbeitsdurchführung, Funktionsweise und Ablesung des PCR- Detektions Systems, als auch auf Schwankungen der Zusammensetzung der dabei verwendeten Reagenzien. Um diesen auf methodische Varianzen beruhenden Fehler möglichst klein zu halten, wurden zum einen die Proben in der PCR im Doppelansatz bestimmt, zum anderen der Datensatz der Endergebnisse mit Hilfe einer sogenannten Cut-off- Berechnung bereinigt. Für die Cut-off- Berechnung wurden die Quotienten aus den Expressionswerten von Lymphknoten und Primärtumor (LK/ PT) gebildet. Zahlenwerte unter 0,5, entsprechend einer Herunterregulation der Genexpression in der Lymphknotenmetastase, und Zahlenwerte über 2, gemäß einem mindestens doppelten Anstieg der Genexpression, wurden somit aus dem Gesamtdatenmaterial selektiert, da bei diesen Wertepaaren eine Veränderung im biologischen Verhalten des Tumors mit größerer Wahrscheinlichkeit anzunehmen ist. Wertepaare zwischen 0,5 und 2 stellen demnach einen meßtechnischen Graubereich dar, in dem eine biologische Relevanz der Expressionsunterschiede zwar nicht ausgeschlossen werden kann, der Einfluß methodenbedingter Varianzen auf Messergebnisse aber dennoch größer erscheint. Das mathematische Signifikanzniveau der durch diese Cut-off- Berechnung selektierten Fallzahl zeigt zwar eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass eine Änderung in der Genexpression mehr auf einer Veränderung der Tumorbiologie in der Lymphknotenmetastase als auf einem zufälligem Fehler beruht, jedoch findet im Diskussionsteil dieser Arbeit eine vergleichende und kritische Auseinandersetzung mit einer unterschiedlichen fallindividuellen Bewertung statt. Bei der Ergebnisdarstellung wurden sowohl der bereinigte als auch der unbereinigte Datensatz berücksichtigt. Anhand jedes einzelnen Gens erfolgt im Anschluß eine Darstellung der vergleichenden Expressionsanalyse von den Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen.

ADAM 17

50 % (n= 16) der 32 Fälle zeigen beim Vergleich der Expressionswerte von Primärtumor und Lymphknoten niedrigere Werte im Sinne einer Herunterregulation, bei 50 % findet man einen Anstieg der Expressionswerte. Somit lässt sich in der Gesamtzahl der Fälle mit dem Signifikanzniveau $p= 0,808$ keine eindeutige Tendenz der Werte erkennen. Verglichen mit den Primärtumoren zeigt die Werteverteilung lediglich einen leichten Anstieg des Medianwertes (0,54). Führt man nun die oben beschriebene Cut-off- Berechnung zur Minimierung methodischer Varianzen durch, ergibt sich folgendes Bild: 84 % der Fälle lassen keine signifikante Veränderung des Expressionslevels in der Lymphknotenmetastase erkennen, wohingegen bei 16 % ein signifikanter Anstieg der Expressionswerte zu verzeichnen ist. Hierbei handelt es sich um die Studienfälle 13, 19, 21, 27 und 30. Bei isolierter Betrachtung dieser Studienfälle ergibt sich ein signifikanter Anstieg der mRNA Expression von ADAM 17 in den Lymphknotenmetastasen mit $p= 0,043$.

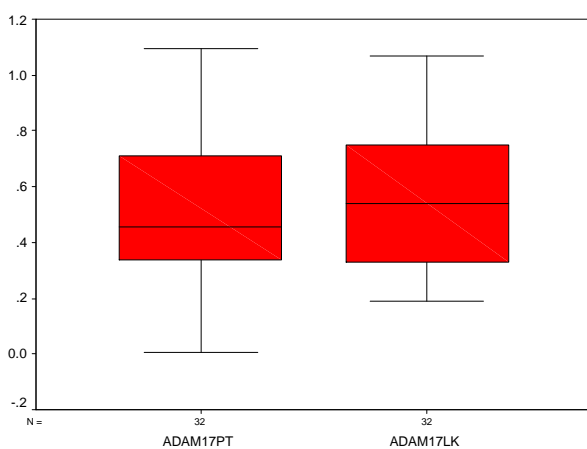


Abb. III.3 (a): Boxplotdarstellung für ADAM 17: Die Darstellung lässt bei Betrachtung aller Studienfälle einen leichten Anstieg des Medians im Vergleich zum Primärtumor erkennen (n= 32) ($p= 0,808$)

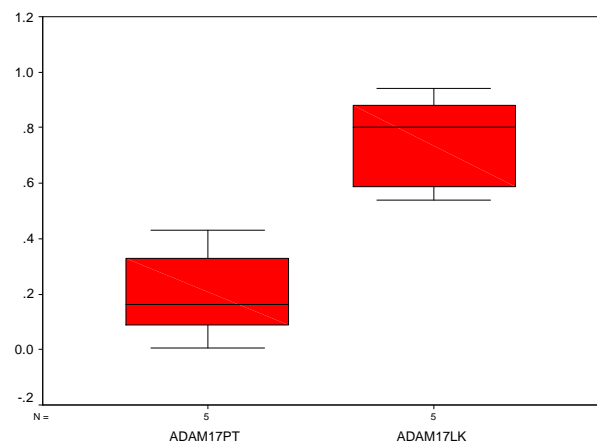


Abb. III.3 (b): Boxplotdarstellung für ADAM 17 nach Cut-off- Berechnung: 5 Studienfälle zeigen signifikante Hochregulation in der Lymphknotenmetastase im Vergleich zum Primärtumor (n= 5) ($p= 0,043$)

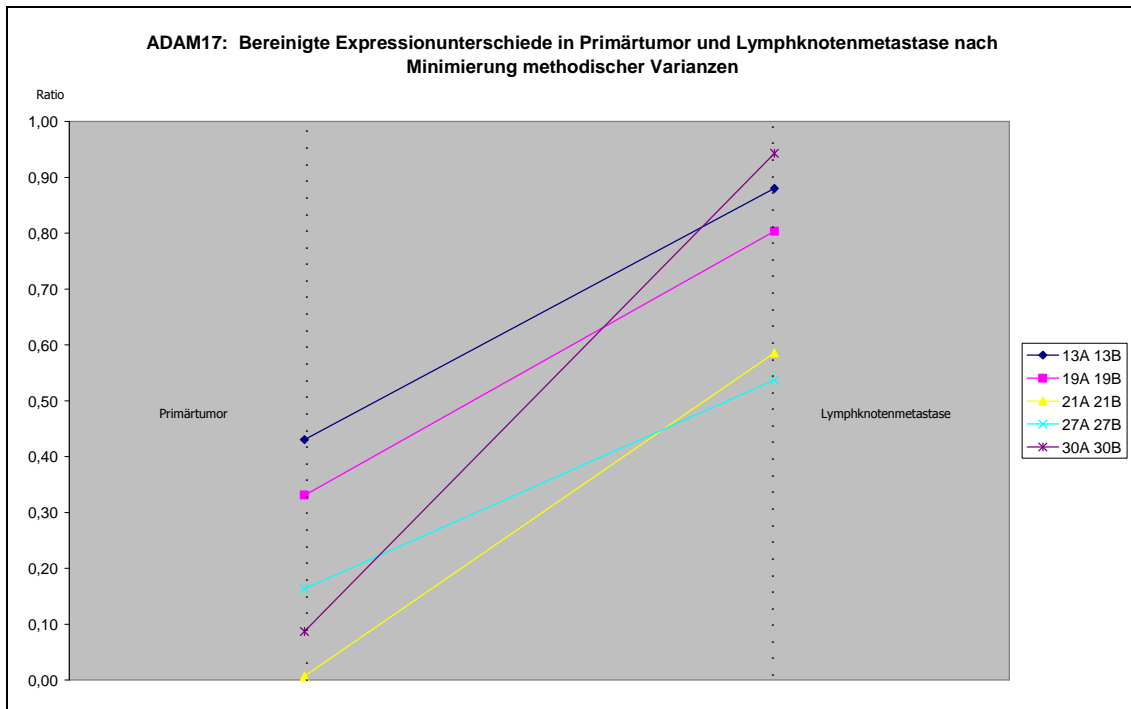


Abb. III.3 (c): Expressionsanstieg von ADAM 17 in der Lymphknotenmetastase im Vergleich zum Primärtumor bei 5 Studienfällen (n= 5)

ADAM 17	25. Perzentile	Median	75. Perzentile	Signifikanzniveau p
Primärtumor n= 5	0,05	0,16	0,38	0,043
Lymphknoten n= 5	0,56	0,80	0,91	

Tabelle III.14: Wilcoxon- Paaranalyse ADAM 17

AXL

56 % der Primärtumoren zeigen ein vermindertes, 44 % ein erhöhtes Expressionsniveau im Vergleich zu der jeweiligen Lymphknotenmetastase. Das Signifikanzniveau $p = 0,056$ lässt eine Tendenz zum Abfall der Expression im Lymphknoten erkennen. Die Cut-off- Berechnung rückt die Veränderungen in 37,5 % der Fälle (n= 12) in den Vordergrund. Bei den Studienfällen 3, 7, 8, 9, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 26 und 30 sind mit $p = 0,023$ signifikante Veränderungen erkennbar. Von den 12 Studienfällen zeigen 10 geringere Ratiowerte, bei 2 Studienfällen (Fallnummern 20, 30) konnte ein Expressionsanstieg in der Lymphknoten-

metastase nachgewiesen werden. Die höchsten Expressionsabfälle in den Lymphknotenmetastasen zeigen sich bei den Studienfällen 9, 12, 14, 17 und 18.

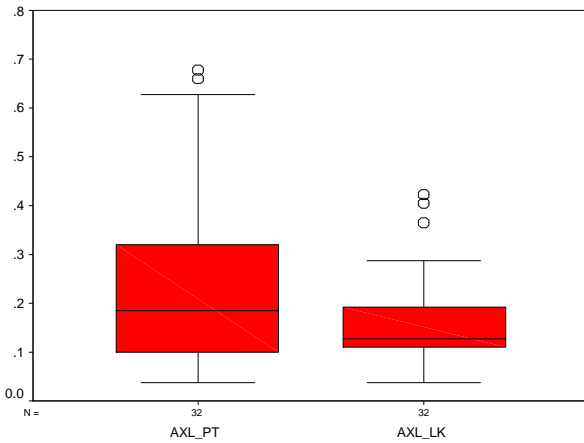


Abb. III.4 (a): Boxplotdarstellung für AXL: Tendenz zur Herunterregulation der relativen Genexpression in der Lymphknotenmetastase innerhalb der gesamten Studiengruppe (n= 32) (p= 0,056)

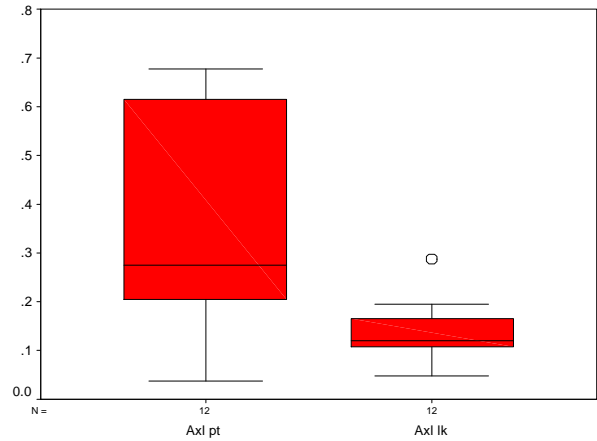


Abb. III.4 (b): Boxplotdarstellung für AXL nach Cut-off- Berechnung: Signifikante Herunterregulation der relativen Genexpression in der Lymphknotenmetastase (n= 12) (p= 0,023)

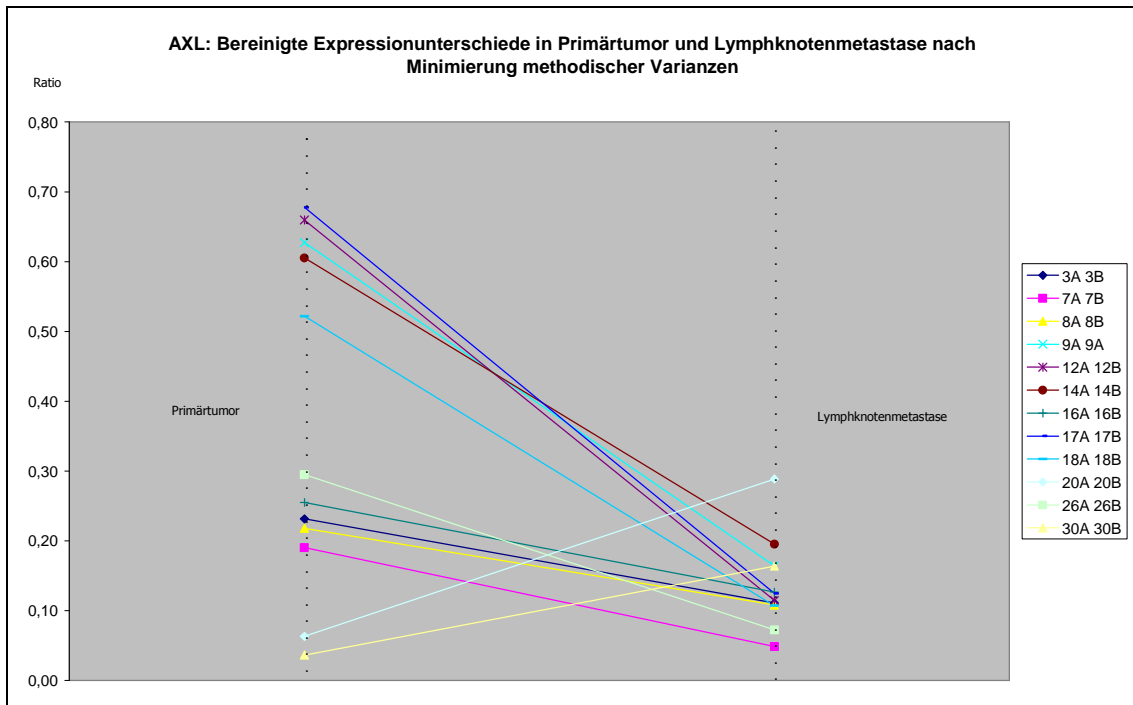


Abb. III.4 (c): Vergleich der relativen Genexpression von AXL in Primärtumor und Lymphknotenmetastase: 10 Studienfälle zeigen eine Herunterregulation, 2 Studienfälle (Fallnummern 20, 30) eine Hochregulation in der Lymphknotenmetastase (n= 10)

AXL	25. Perzentile	Median	75. Perzentile	Signifikanzniveau P
Primärtumor n= 12	0,20	0,27	0,62	0,023
Lymphknoten n= 12	0,11	0,12	0,16	

Tab. III.15: Wilcoxon- Paaranalyse AXL

LMNB1

Betrachtet man die Expressionsverhältnisse hinsichtlich LMNB1, findet man in 56 % der Fälle einen höheren Expressionswert in den Lymphknotenmetastasen, wohingegen bei 44 % niedrigere Expressionswerte zu beobachten sind. Nach Durchführung der Wilcoxon- Paaranalyse zeigt LMNB1 mit $p= 0,217$ keine signifikante Veränderung bzw. Tendenz der Hoch- oder Herunterregulation. Nach der Cut-off Analyse erhält man 31 % (= 10 Studienfälle) der Werte mit den höchsten Expressionsänderungen. 69 % der Paardifferenzen zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen sind demnach als identisch anzusehen, d.h. es existieren in dem im Rahmen dieser Untersuchung ausgewählten Patientenkollektives keine Expressionsunterschiede zwischen beiden Lokalisationen. Von den oben genannten 31 % der Studiengruppe zeigen 4 Fällen einen Expressionsabfall in den Lymphknotenmetastasen, bei 6 Studienfällen ist ein Anstieg feststellbar. Studienfall 13 zeigt sowohl das größte Ausgangsniveau als auch den stärksten Anstieg der relativen Genexpression. Höhere Anstiege lassen sich ebenso bei den Fallnummern 17, 21 und 30 beobachten. Den höchsten Expressionsabfall weisen die Studienfälle 22 und 25 auf. Mit einem Signifikanzniveau von $p= 0,333$ ist für LMNB1 innerhalb dieser Studiengruppe keine eindeutige Tendenz einer Expressionsänderung in den Lymphknotenmetastasen erkennbar.

3. Ergebnisse

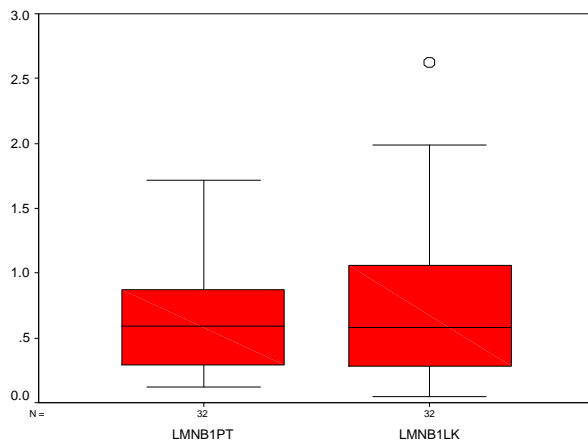


Abb.III.5 (a): Boxplotdarstellung für LMNB1:
Keine signifikante Änderung der relativen Genexpression im Vergleich Primärtumor bzw. Lymphknotenmetastase (n= 32) (p= 0,217)

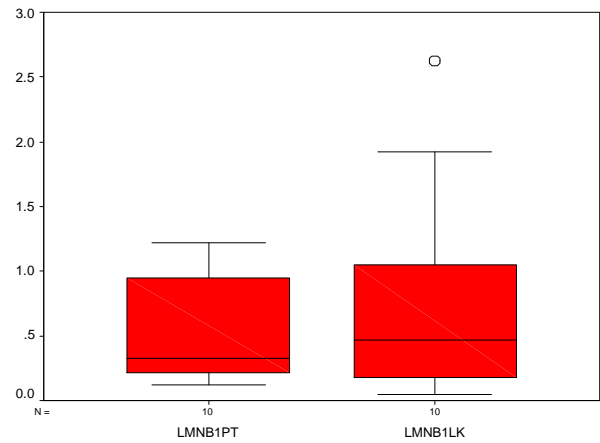


Abb.III.5 (b): Boxplotdarstellung für LMNB1 nach Cut- off- Berechnung: keine signifikante Änderung der relativen Genexpression in der Lymphknotenmetastase (n= 10) (p= 0,333)

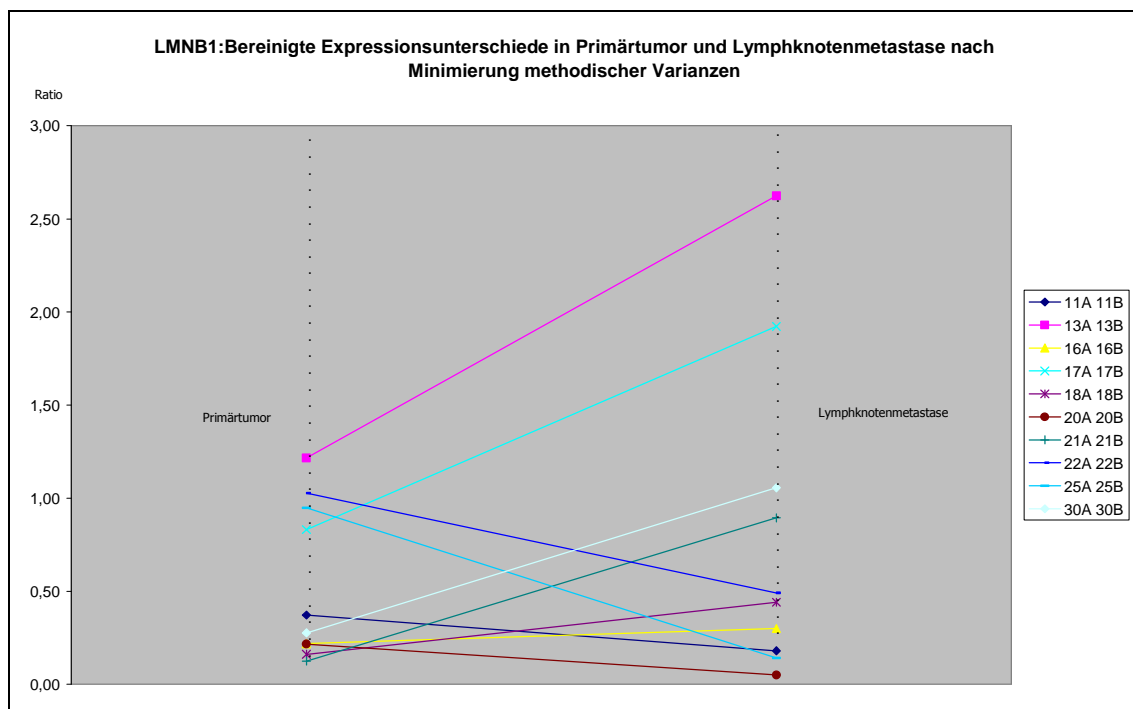


Abb.III.5 (c): Vergleich der relativen Genexpression für LMNB1 in Primärtumor und Lymphknotenmetastase: 10 Studienfälle mit teilweise ansteigender, aber auch abfallender Expression in der Lymphknotenmetastase (n= 10)

LMNB1	25. Perzentile	Median	75. Perzentile	Signifikanzniveau p
Primärtumor n= 10	0,20	0,32	0,97	0,333
Lymphknoten n= 10	0,17	0,47	1,27	

Tab.III.16: Wilcoxon-Paaranalyse LMNB1**Her-2/neu**

62,5 % der Studienfälle zeigen in der Lymphknotenmetastase einen Anstieg der relativen Genexpression, bei 37,5 % findet man in den Lymphknotenmetastasen niedrigere Expressionswerte als im Primärtumor. Um den zufälligen Fehler zu minimieren, werden auch bei Her-2/neu isoliert die Fälle betrachtet, bei denen sich die Expressionsveränderungen in einer Größenordnung bewegen, die die Wahrscheinlichkeit der Entdeckung biologisch relevanter Veränderungen erhöht. Nach Durchführung der Cut-off- Berechnung bleiben 41 % (n= 13) übrig. 4 Studienfälle (Fallnummern 3, 6, 9, 10) zeigen eine Herunterregulation, 9 Studienfälle (7, 8, 13, 19, 21, 23, 25, 29, 30) eine Hochregulation der Expression in der Lymphknotenmetastase. Bei den ausgewählten 13 Fällen ist mit $p= 0,064$ eine Tendenz zur Hochregulation von Her- 2/neu im Lymphknoten zu erkennen.

3. Ergebnisse

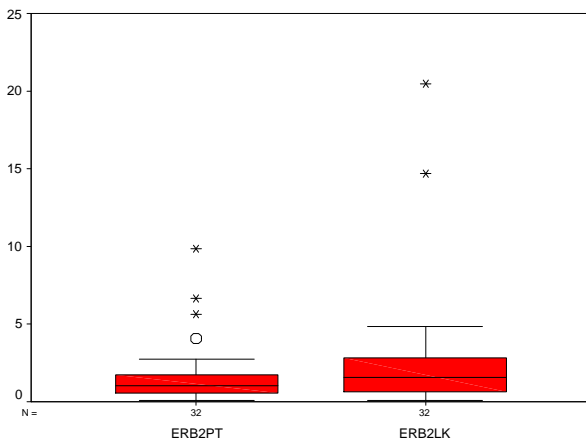


Abb. III.6 (a): Boxplotdarstellung für Her- 2/neu: Verlagerung der relativen Genexpression von Her- 2/neu auf ein höheres Niveau in der Lymphknotenmetastase (n= 32) (p= 0,023)

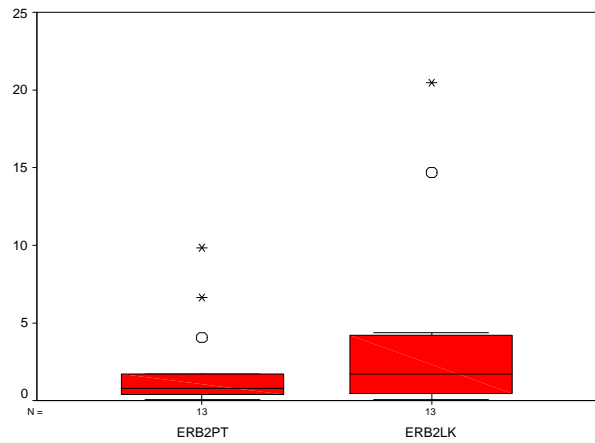


Abb. III.6 (b): Boxplotdarstellung für Her- 2/neu nach Cut-off- Berechnung: Tendenz zur Hochregulation der relativen Genexpression in der Lymphknotenmetastase (n= 13) (p= 0,064)

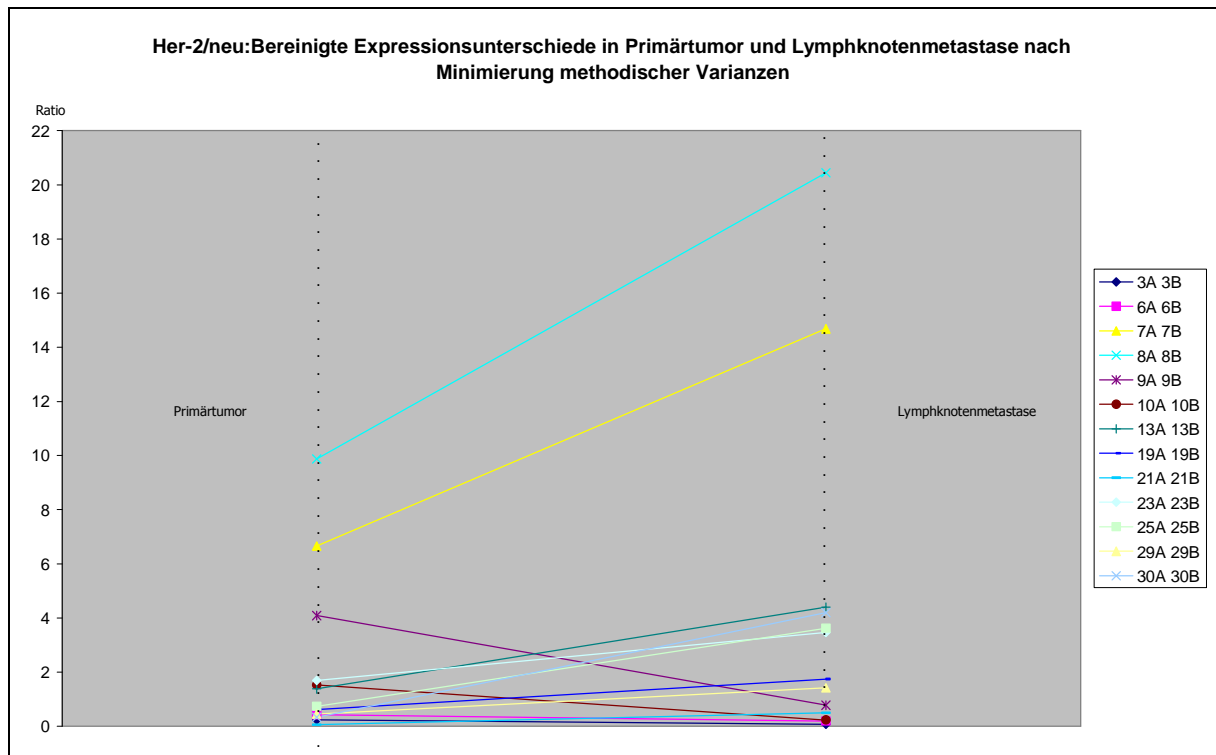


Abb. III.6 (c): Vergleich der relativen Genexpression von Her- 2/neu in Primärtumor und Lymphknotenmetastase: 9 Studienfälle zeigen Hochregulation, 4 hingegen Herunterregulation der Ratiowerte in der Lymphknotenmetastase. Die Studienfälle 7 und 8 besitzen das höchste Expressionsniveau im Primärtumor und zeigen den stärksten Expressionsanstieg in der Lymphknotenmetastase innerhalb der gesamten Studiengruppe (n= 13)

Her- 2/neu	25. Perzentile	Median	75. Perzentile	Signifikanzniveau p
Primärtumor (n= 13)	0,38	0,75	2,89	0,064
Lymphknoten (n= 13)	0,37	1,74	4,30	

Tab.III.17: Ergebnis Wilcoxon- Paaranalyse für Her- 2/neu

COL1A1

81,5 % der Primärtumoren zeigen niedrigere Expressionswerte in den Lymphknoten. 18,75 % der Fälle weisen höhere Werte in den entsprechenden Lymphknotenmetastasen auf. Die Cut-off Analyse lenkt die Aufmerksamkeit auf 81,25 % der Gesamtfallzahl (n= 26), deren relative Expressionswerte unter 0,5 oder über den Wert 2 in der Quotientendarstellung LK/PT kommen. Von diesen 26 Studienfällen fällt die Expression in 85 % (n= 22) in der Lymphknotenmetastase ab, bei lediglich 15 % (n= 4) ist ein Anstieg zu erkennen.

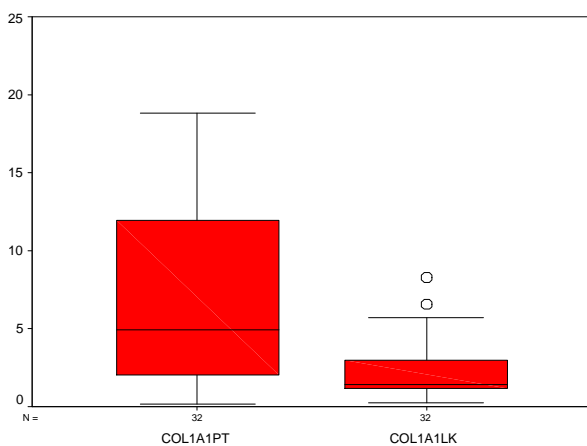


Abb. III.7 (a): Boxplotdarstellung für COL1A1: Herunterregulation der relativen Genexpression in der Lymphknotenmetastase (n= 32) ($p < 0,01$)

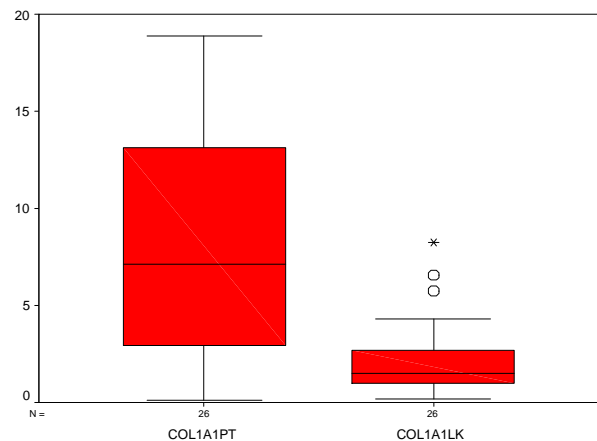


Abb. III.7 (b): Boxplotdarstellung für COL1A1 nach Cut- off- Berechnung: Signifikante Änderungen der relativen Genexpression in der Lymphknotenmetastase sind bei 26 Studienfällen zu beobachten (n= 26) ($p < 0,01$)

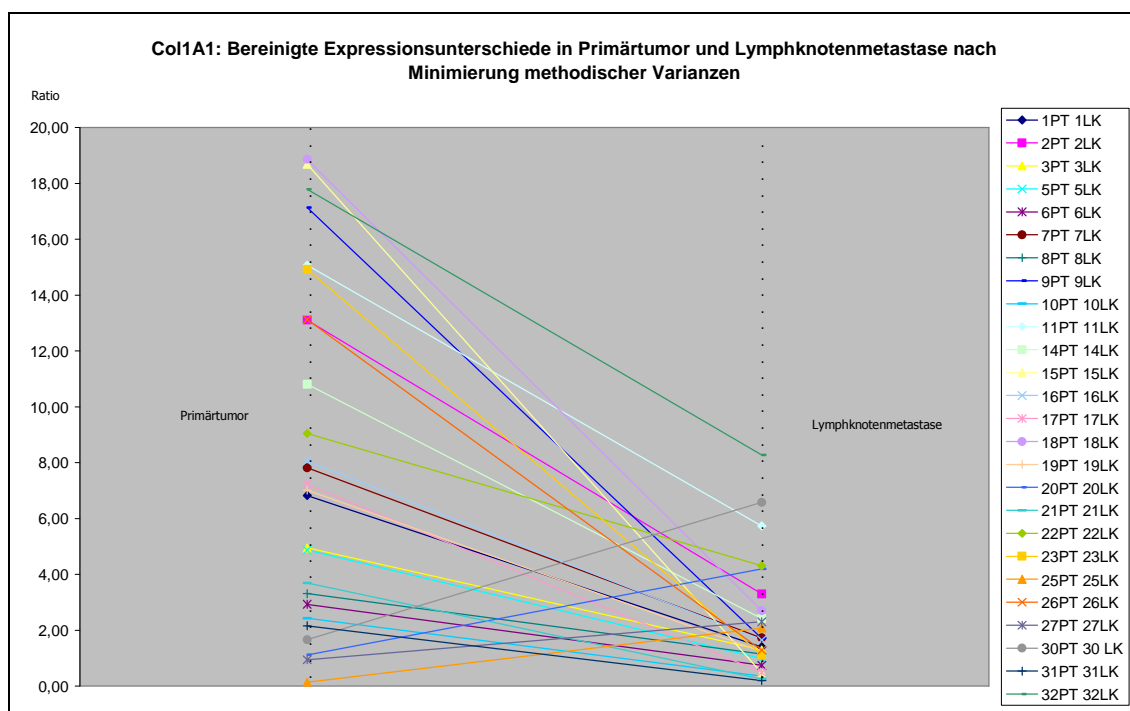


Abb. III.7 (c): Vergleich der relativen Genexpression von COL1A1 in Primärtumor und Lymphknotenmetastase. 22 Studienfälle zeigen signifikante Herunterregulation in der Lymphknotenmetastase, bei 15 % der Studienfälle findet man eine Hochregulation der relativen Genexpression in der Lymphknotenmetastase (n= 26)

COL1A1	25. Perzentile	Median	75. Perzentile	Signifikanzniveau p
Primärtumor n= 26	2,80	7,12	13,58	< 0,01
Lymphknoten n= 26	0,93	1,53	2,85	

Tab. III.18: Wilcoxon- Paaranalyse COL1A1

COL1A2

Col1A2 weist in 87,5 % der Fälle in der Lymphknotenmetastase ein niedrigeres Expressionsniveau auf. Lediglich 12,5 % zeigen eine höhere Expression in der Lymphknotenmetastase. Die Paaranalyse des Wilcoxon- Tests ergibt mit $p < 0,01$ Signifikanz.

Führt man die Cut-off- Berechnung durch, erhält man 23 Studienfälle, bei denen mit größter Wahrscheinlichkeit von biologisch relevanten Expressionsunterschieden ausgehen kann. Bei 87 % dieser Studienfälle ($n = 20$) war eine Herunterregulation, bei 13 % ($n = 3$) eine Hochregulation der Ratiowerte nachweisbar.

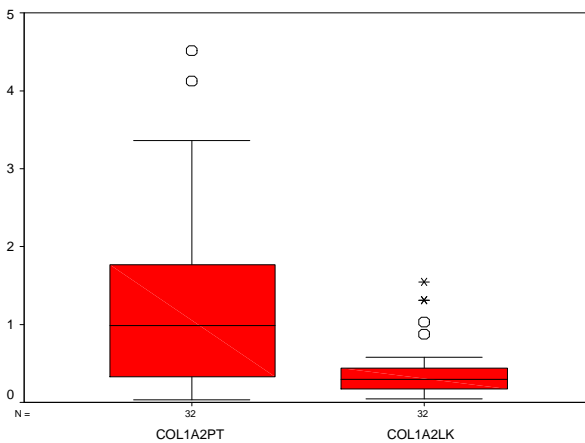


Abb. III.8 (a): Boxplotdarstellung für COL1A2: Analog zu COL1A1 ist auch für COL1A2 eine Herunterregulation in der Lymphknotenmetastase zu beobachten ($n = 32$) ($p < 0,01$)

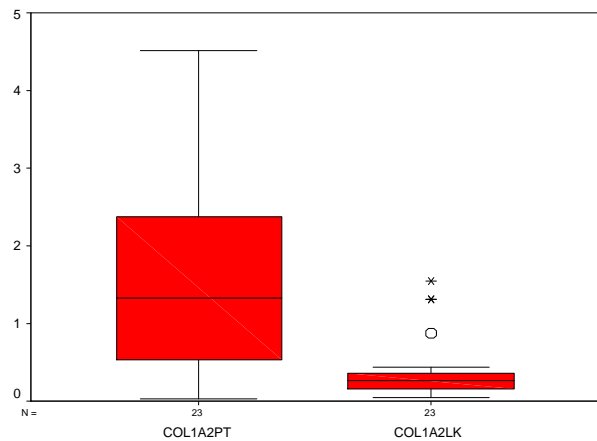


Abb. III.8 (b): Boxplotdarstellung für COL1A2 nach Cut-off- Berechnung: Signifikante Expressionsunterschiede in der Lymphknotenmetastase bei 23 Studienfällen ($n = 23$) ($p < 0,01$)

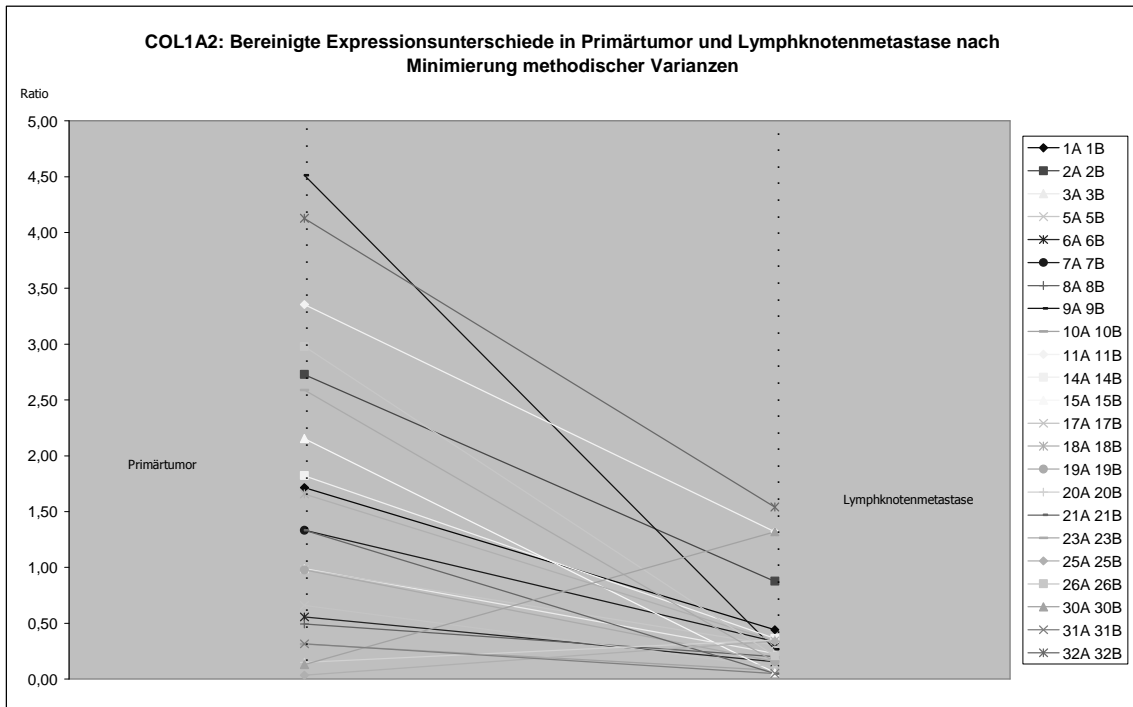


Abb. III.8 (c): Vergleich der relativen Genexpression von COL1A2 in Primärtumor und Lymphknotenmetastase; 20 Studienfälle zeigen eine Hochregulation der Expression in der Lymphknotenmetastase. Bei 3 Studienfällen kann eine Herunterregulation der relativen Genexpression beobachtet werden (n= 23)

COL1A2	25. Perzentile	Median	75. Perzentile	Signifikanzniveau p
Primärtumor n= 23	0,49	1,33	2,59	< 0,01
Lymphknoten n= 23	0,15	0,27	0,36	

Tab. III.19: Wilcoxon- Paaranalyse für COL1A2

Gegenläufige Veränderung der Her- 2/neu und COL1A1 Expression in der Lymphknotenmetastase

Her- 2/neu/ COL1A1:

47 % der Studienfälle lassen im direkten Vergleich mit ihren Primärtumoren eine gegenläufige Veränderung der Expression von Her- 2/neu und COL1A1 in der Lymphknotenmetastase erkennen. Diese Studienfälle (Fallnummern 1, 5, 7, 8, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 23, 24,

26, 29, 32) zeigen eine Hochregulation von Her- 2/neu und eine Herunterregulation von COL1A1 in der Lymphknotenmetastase.

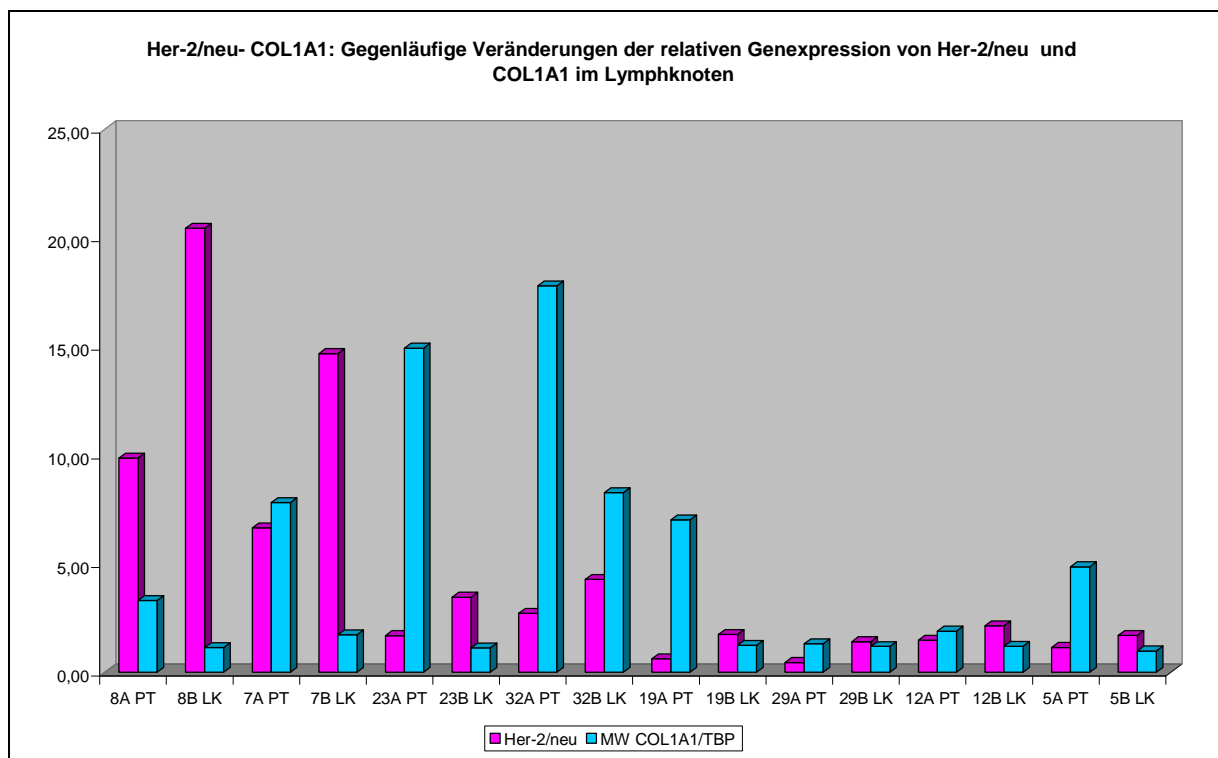


Abb. III.9: Expression von COL1A1 und Her- 2/neu mit gegenläufiger Veränderung in der Lymphknotenmetastase

Zusammenschau der Gene in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen

Im Folgenden erfolgt eine Zusammenschau aller 6 untersuchten Gene. Hierbei werden alle 32 Studienfälle hinsichtlich ihrer jeweiligen Expressionsmuster miteinander verglichen. Folgende Abbildung gibt einen Überblick über das Expressionsmuster der ausgewählten Gene in den Primärtumoren und den Lymphknotenmetastasen innerhalb der 32 Studienfälle.

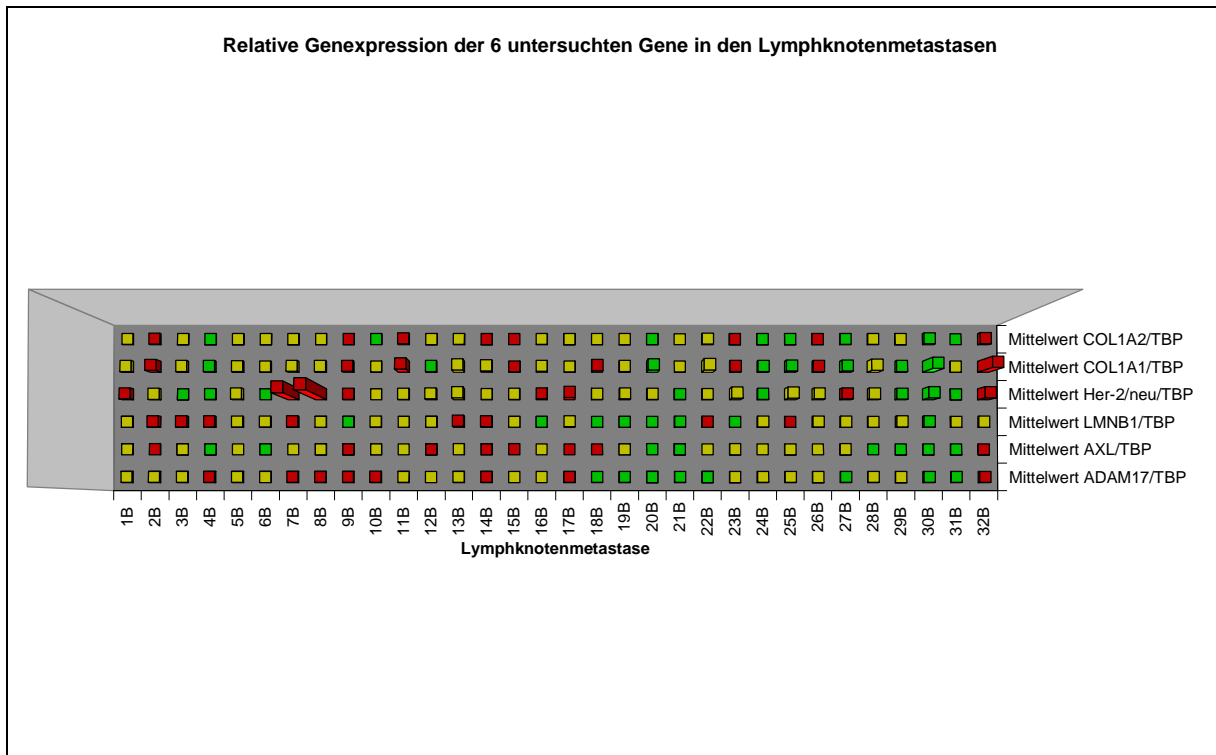
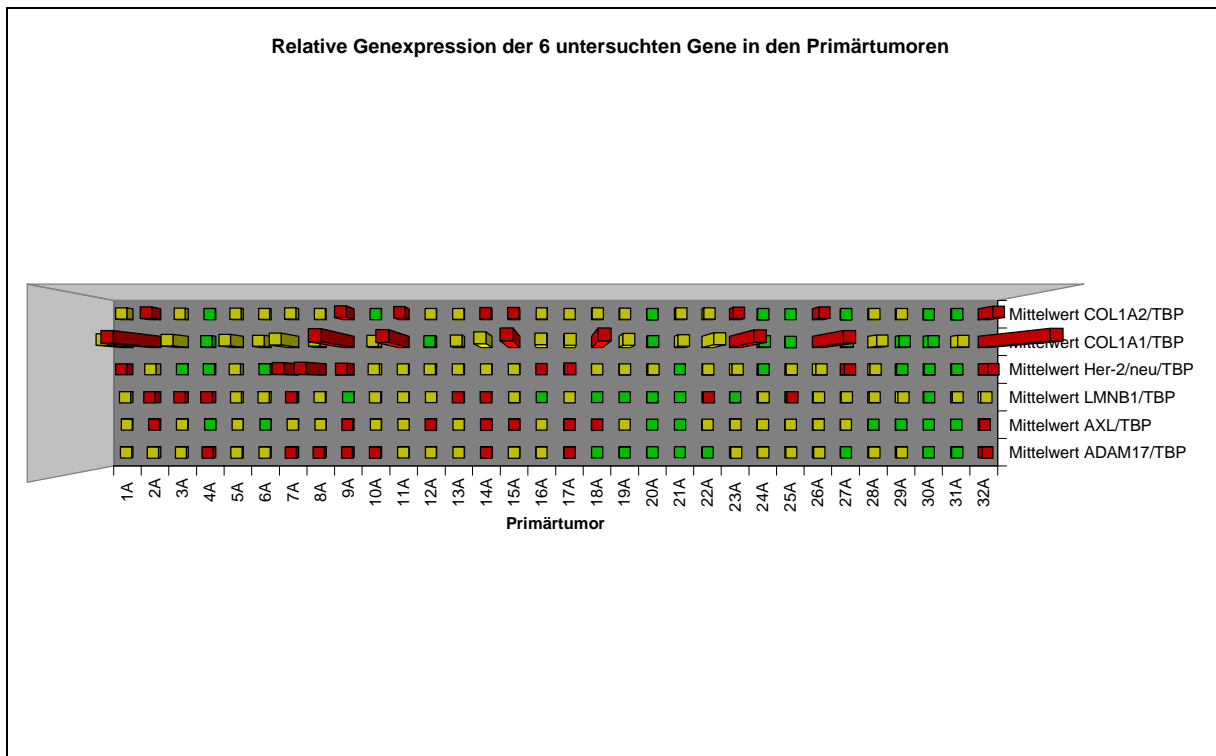


Abb. III.10 (a), (b): Darstellung der Expressionsmuster aller Studienfälle in den Primärtumoren (A) und Lymphknotenmetastasen (B) im Überblick; Legende: Rot= Expression über der 75. Perzentile; Gelb= Expression 25.-75. Perzentile; Grün= Expression unter der 25. Perzentile

Fallzahl n= 32	Minimum	Maximum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
ADAM 17 PT	0,07	1,10	0,33	0,45	0,72
AXL PT	0,04	0,70	0,10	0,18	0,33
LMNB1 PT	0,12	1,72	0,28	0,59	0,88
Her-2/neu PT	0,06	9,87	0,55	1,04	1,75
COL1A1 PT	0,14	18,87	1,97	4,91	12,53
COL1A2 PT	0,03	4,51	0,32	0,98	1,80

Tab. III. 20: Statistische Maßzahlen aller 6 untersuchten Gene in den Primärtumoren im Überblick

Fallzahl n= 32	Minimum	Maximum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
ADAM17 LK	0,15	1,10	0,40	0,59	0,83
AXL LK	0,48	0,43	0,10	0,14	0,19
LMNB 1 LK	0,50	2,62	0,33	0,59	0,89
Her-2/neu LK	0,80	20,45	0,57	1,42	2,63
COL1A1 LK	0,20	8,28	1,13	1,54	3,15
COL1A2 LK	0,48	1,56	0,17	0,32	0,46

Tab. III.21: Statistische Maßzahlen aller 6 untersuchten Gene in der Lymphknotenmetastase im Überblick

Beschreibung der Expressionsmuster in den Primärtumoren :

31 % der Studiengruppe (Studienfälle 5, 6, 19, 20, 21, 24, 28, 29, 30, 31) besitzen im Primärtumor ein Expressionsmuster, das für keines der 6 untersuchten Gene ein höheres Expressionsniveau nach der Perzentilenverteilung belegen kann. In dieser Untergruppe der Studienfälle bewegen sich die Expressionswerte für alle Gene im unteren und mittleren Bereich der Perzentilenverteilung der Gesamtstudiengruppe.

28 % der Studiengruppe (Studienfälle 1, 3, 10, 12, 13, 16, 22, 25, 27) weisen in ihrem Expressionsmuster höhere Werte eines der untersuchten Gene oberhalb der 75. Perzentile auf. In dieser Untergruppe zeigt LMNB1 bei 44 % der Fälle (Studienfälle 3, 13, 22, 25) eine Überexpression. 33 % der untersuchten Primärtumore (Studienfälle 1, 16, 27) zeigen eine

höhere relative Expression von Her- 2/neu und jeweils 11 % eine alleinige Überexpression von ADAM 17 und AXL.

41 % der Studiengruppe (Fallnummern 2, 4, 7, 8, 9, 11, 14, 15, 17, 18, 23, 26, 32) weisen heterogen in mehreren Genen Überexpression auf:

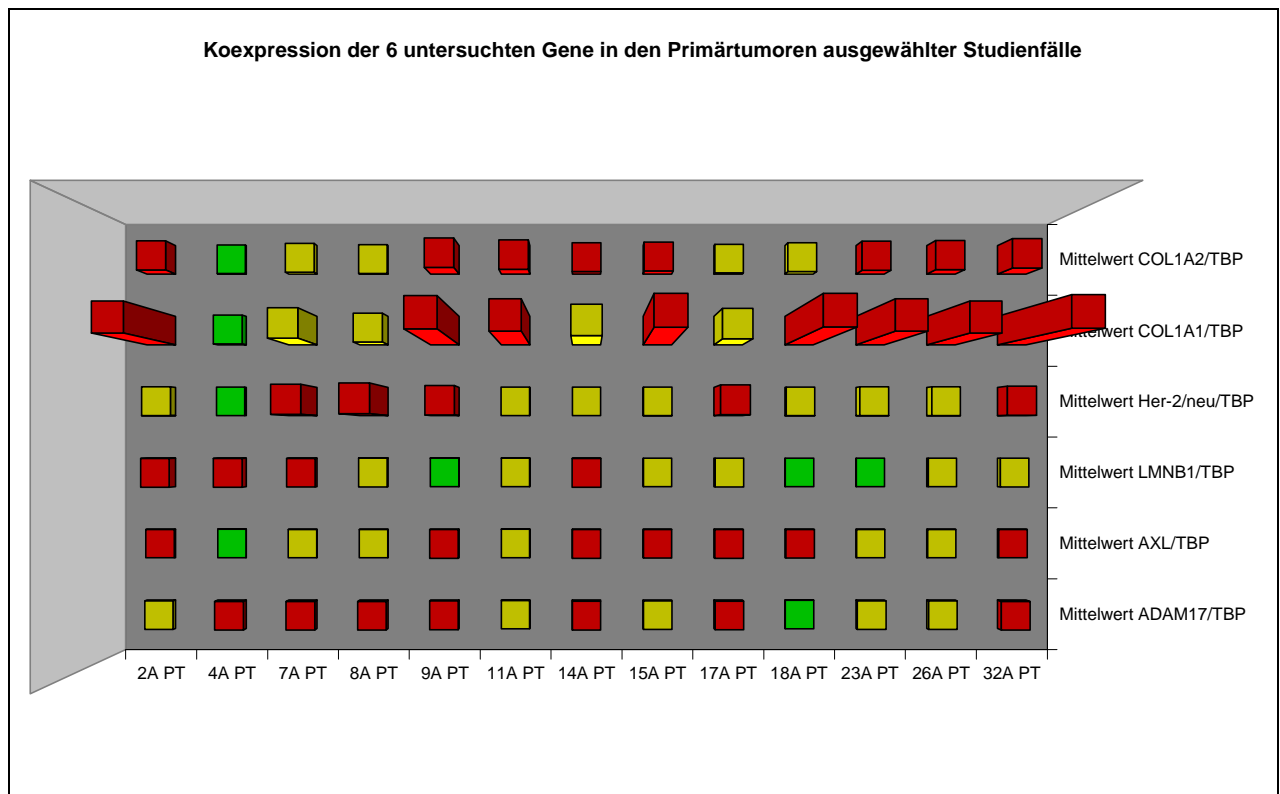


Abb. III.11: Überblick über 41 % der Studienfälle mit höherer Expression mehrerer Gene in den Primärtumoren (Farbenlegende siehe Abb. III.10)

Im Folgenden erfolgt in der Zusammenschau der untersuchten Gene eine Analyse des Expressionsmusters dieser Studienfälle (vgl. Abb. III.11), welche 41 % der Gesamtstudiengruppe ausmachen. Ein direkter Vergleich der Ratiowerte ist aufgrund der unterschiedlichen Effizienz der PCR- Assays nicht möglich (siehe Material und Methoden), so dass anhand der Perzentilenverteilung der Expressionswerte (siehe oben) nur eine relative Abschätzung der unterschiedlichen Expressionsniveaus der Gene innerhalb der Gesamtstudiengruppe möglich ist.

ADAM 17

Höhere Expression von ADAM 17 zeigen 54 % (7 Studienfälle) der Untergruppe. 4 Studienfälle sind mit höherer Coexpression von AXL verbunden. 5 Primärtumoren zeigen

neben höherer ADAM 17 Expression gleichzeitig auch Überexpression von Her- 2/neu. 3 Studienfälle mit ADAM 17 Überexpression weisen auch höhere Expressionswerte von LMNB1 auf. Im Vergleich zu COL1A1 bzw. COL1A2 findet man bei 5 bzw. 4 Studienfällen ein geringeres Expressionsniveau von ADAM 17.

LMNB1

Von den 4 Studienfällen mit höherer Expression von LMNB1 weisen jeweils 3 Fälle geringere Expression von Her- 2/neu und hohe Koexpression zu ADAM 17 auf. Bei 2 Studienfällen findet sich eine hohe Koexpression zu AXL. COL1A1 ist im Vergleich zu LMNB 1 bei 3 Fällen relativ niedriger exprimiert. Jeweils 2 Studienfälle besitzen bei hohen LMNB1 Werten höhere bzw. niedrigere Expressionswerte von COL1A2.

Her- 2/neu

5 Studienfälle mit hoher Her- 2/neu Expression weisen hohe Coexpression von ADAM 17 auf. Bei 3 Studienfällen liegt bei hoher Expression von Her- 2/neu eine geringere relative Genexpression von COL1A1 und COL1A2 vor. LMNB1 und AXL zeigen unregelmäßiges Expressionsverhalten bezüglich der Her- 2/neu Genexpression.

COL1A1

5 von 8 Studienfällen mit Hochregulation von COL1A1 zeigen vergleichsweise geringere Expressionswerte von Her- 2/neu. Eine hohe Koexpression mit COL1A2 weisen 7 dieser Studienfälle auf. Das Expressionsverhalten zu den anderen Genen ist stark variabel.

COL1A2

Die Beziehung von Col1A2 zu den 5 anderen Genen kann der Beschreibung der anderen Gene entnommen werden.

4. Diskussion

4.1 Kurzpräsentation der Ergebnisse

Die vorliegende Studie zeigt, daß eine Gruppe von sechs ausgewählten Genen (**ADAM 17, AXL, LMNB1, Her- 2/neu, COL1A1, COL1A2**), die in früheren Studien mit der Metastasierung maligner Tumore in Verbindung gebracht wurden, in einer Studiengruppe von nodal positiven Mammakarzinomen individuell unterschiedlich exprimiert werden.

Bei einem Teil der ausgewerteten Fälle ergaben sich anhand der vergleichenden Untersuchung dieser Gene in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen Hinweise darauf, daß einige dieser epithelialen und stromalen Gene (**COL1A1, COL1A2**) für das Erwerben der zellulären Metastasierungsfähigkeit im Rahmen der lymphogenen Metastasierung auf molekularer Ebene eine Rolle spielen könnten. Das hierbei teilweise beobachtete unterschiedliche Expressionsverhalten der untersuchten Gene in der Lymphknotenmetastase kann nach dem Konzept der Tumorheterogenität als ein Hinweis für die Entstehung einer Lymphknotenmetastase aus einer Zelle oder einer bestimmten Zellpopulation innerhalb des Primärtumors angesehen werden.

4.2 Hintergrund der Themenstellung

Vor allem in der älteren Literatur wurde die Hypothese vertreten, daß einerseits eine molekulargenetische Unterscheidung von Primärtumor und Metastase aufgrund unterschiedlicher genotypischer zellulärer Eigenschaften möglich sein muß und andererseits die Entstehung von Metastasen unterschiedlicher Lokalisation entsprechend dem Konzept der Tumorheterogenität aus unterschiedlich biologisch spezialisierten Vorläuferzellen des Primärtumors stattfindet (Fiedler IJ et al.,1973; Fidler IJ et al.,1977; Fidler IJ et al.,1980; Poste G et al., 1980; Hart IR et al., 1981; Fidler IJ et al., 1982; Talmadge JE et al., 1982; Talmadge JE et al., 1987; Chambers AF et al., 1988; Nicolson GL et al., 1982; Clark EA et al., 2000).

Da die Beobachtungen zahlreicher Arbeitsgruppen an Tumoren verschiedener Entitäten , die diese Hypothese untermauern sollten, überwiegend nicht an in vivo gewonnenem Patiententmaterial, sondern an Zellkulturen in vitro und im Tierexperiment getroffen wurden, kann die Aussagekraft dieser Beobachtungen aufgrund der angewandten Untersuchungstechniken in der Literatur neben breiter Akzeptanz auch kritisch beurteilt werden (Heppner GH et al., 1983).

In der neueren Literatur findet bei vielen Autoren ein neues Konzept der Metastasierung Zuspruch, welches besagt, daß die Fähigkeit zur Metastasierung nicht im Rahmen der Tumorprogression erworben wird, sondern von Anfang an in den meisten Zellen mancher Primärtumore als inhärente Eigenschaft festgelegt zu sein scheint (Van de Vijver MJ et al., 2002; Van't Veer LJ et al., 2003; Ramaswamy S et al., 2003). Van't Veer et al. und Van de Vijver et al. etablierten ihr 70 Gene umfassendes Prognoseprofil, das bei einem Teil ihrer Studienfälle mit Mammakarzinom mit dem Auftreten von Fernmetastasen korrelierte, in klinisch orientierten Studien, wobei keine vergleichende molekulargenetische Untersuchung mit dem entsprechendem metastatischem Gewebe durchgeführt wurde, welche ein unterschiedliches Expressionsverhalten eines oder mehrerer Gene im Vergleich zum dazugehörigen Primärtumor hätte aufdecken können. Der paarweise Vergleich primärer Mammakarzinome mit den dazugehörigen Fernmetastasen unterschiedlicher Lokalisation erbrachte Weigelt et al. innerhalb ihrer untersuchten Studiengruppe keinen Hinweis auf metastasierungsspezifische Expressionsänderungen (Weigelt B et al., 2003). Perou et al. beobachteten bei ihren Untersuchungen ein ähnliches Expressionsmuster in den Lymphknotenmetastasen zweier primärer Mammakarzinome (Perou CM et al., 2000), was jedoch bereits aufgrund der geringen Fallzahl nur bedingt aussagekräftig erscheint. Die mit Metastasierung assoziierte Gensignatur von Ramaswamy et al. (2003) entstand durch den Vergleich von metastatischen und nichtmetastatischen Adenokarzinomen unterschiedlicher Organherkunft und dem nicht paarweise durchgeführten Vergleich von Primärlokalisationen und Metastasen, wodurch bereits eine Aussage über fallbezogene Expressionsunterschiede nicht möglich war.

Da die untersuchten Tumorgewebe aller aufgeführten Arbeiten nicht mikrodissiziert wurden, ist es dennoch durchaus möglich, dass bei diesen Untersuchungen vereinzelte Zellklone oder Zellpopulationen mit differentem Expressionsverhalten in den Geweben vorhanden waren. Zudem wird für gezielte molekulare Untersuchungen eine Genanalyse mit Hilfe der Microarray- Technik aus einem vollständig eingesetzten Gewebe einer möglicherweise vorhandenen intratumoralen Heterogenität mit unterschiedlicher Tumor- Stroma- Relation nur bedingt gerecht (Wang W et al., 2003).

Bislang gibt es nur wenige Arbeiten, die einen molekulargenetischen Vergleich von primären Mammakarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen durchgeführt haben. Folglich ist diese Arbeit die erste, die dies in größerem Umfang unternommen. Im Vergleich zur hämatogenen ist über lymphogene Metastasierung bislang nur wenig bekannt (Carr I et al., 1983). So ist bislang nicht bekannt, ob bei der Absiedlung von Tumorzellen in den regionären Lymphknoten klonale Selektion eine Rolle spielt oder gar lymphknotenspezifische Klone

existieren. Für die Studie wurden retrospektiv 32 Patientenfälle herausgesucht, bei denen ausreichend Gewebe von jeweils beiden Tumorlokalisationen vorhanden war, um das Expressionsverhalten der sechs Gene in Primärtumor und Lymphknoten zu untersuchen. Fälle mit klinisch bekannter Fernmetastasierung oder einem Zweitmalignom wurden ausgeschlossen, um mögliche Überlagerungen auszuschließen. Der Befall der regionären Lymphknoten bei Mammakarzinom ist in der Abwesenheit einer Fernmetastasierung aufgrund seiner hohen prognostischen Relevanz für den klinisch tätigen Arzt von großer Bedeutung. Die bislang unvollständigen Kenntnisse über die molekulargenetischen Grundlagen der Metastasierung erschweren bislang die Entwicklung neuer Therapieansätze.

4.3 Konzept der Tumorheterogenität

Die Betrachtungsweise der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse kann unter der Hypothese gesehen werden, daß maligne Zellen innerhalb eines Primärtumors keine einheitliche Population von Zellen darstellen, sondern sich in Form verschiedenster Zellklone oder Zellpopulationen in ihren genotypischen und folglich auch phänotypischen biologischen Eigenschaften unterscheiden. Diese Sichtweise basiert auf dem Konzept der Tumorheterogenität (Kerbel RS et al., 1979; Hart IR et al., 1981; Fidler IJ et al., 1977; Kripke ML et al., 1978). Da dieser zentrale Begriff jedoch nicht einheitlich definiert ist, sondern verschiedene morphologische und zeitliche Aspekte umfasst, die für das Verständnis dieser Arbeit und deren Ergebnisse von großer Wichtigkeit sind, soll im folgenden unter Einbeziehung der eigenen Beobachtungen eine Erläuterung erfolgen.

Morphologische Aspekte der Tumorheterogenität:

Bereits bei der Reevaluierung und Reklassifizierung der histologischen Schnittpräparate zusammen mit erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. F. Fend; Dr. K. Specht) zeigten sich in den Primärtumoren lichtmikroskopisch erkennbar große interindividuelle Fallunterschiede der in die Studie einbezogenen invasiv wachsenden Mammakarzinome, was keinesfalls überraschend war. Selbst der ca. 85 % umfassende Anteil der Studiengruppe mit identischem histologischen Typ (invasiv- duktal) zeigte auch bei gleichem Grading (G2: 34 %; G3: 66 %) eine starke Variationsbreite sowohl in Bezug auf morphologische Charakteristika wie Zellgröße, Zellpolarität und Mitoserate als auch hinsichtlich gewebsarchitektonischer Merkmale wie Wachstumsmuster, dem Anteil nekrotischer Areale und einem unterschied-

lichen Anteil von Stroma mit nichtmalignen Zellbestandteilen. Unter den nichtmalignen Zellbestandteilen stellten Lymphozyten, die die neoplastischen Zellen umgaben oder infiltrierten, den Hauptanteil dar (**Interindividuelle Heterogenität**). Aber auch innerhalb der einzelnen Fälle der Studiengruppe ließen sich Areale mit unterschiedlicher Zellmorphologie, Verteilung der Tumorzellen, des Tumorstromas und entzündlicher Infiltrate erkennen. Bereits in der älteren Literatur ist beschrieben, daß sich maligne Zellen innerhalb bestimmter Areale eines Tumors auch ultrastrukturell in Zellmembraneigenschaften, Antigenexpression, immunologischen Eigenschaften und der Metastasierungsfähigkeit (Suzuki N et al., 1978; Weiss L et al., 1980; Heppner GH et al., 1983) unterscheiden. Diese morphologische und biologische Heterogenität wird durch die unterschiedliche Expression einer bislang unbekanntem Zahl von Genen auf zellulärer Ebene verursacht (Bishop JM et al., 1991; Land H et al., 1983) (**Intratumorale Heterogenität**).

Zeitliche Aspekte der Tumorheterogenität

Unter der Progression eines Tumors versteht man seine schrittweise Entwicklung über mehrere qualitative Stadien (Foulds L et al., 1975). Hanahan et al. machen für die Genese maligner Zellen die genotypischen Veränderungen verantwortlich, die Unabhängigkeit von äußeren Wachstumssignalen, die Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren, Apoptoseinhibition, Angiogenese, Gewebsinvasion und Metastasierung bedingen (Hanahan D et al., 2000). Unter der Annahme, daß diese Eigenschaften einerseits von einzelnen Tumorzellpopulationen nicht durch onkogenetische Alterationen innerhalb eines strengen zeitlichen Ablaufs erworben werden und andererseits durch Alterationen einer bislang unbekanntem Zahl verschiedener Gene bedingt werden könnten, ist für den Vorgang der Metastasierungs durchaus vorstellbar, daß maligne Tumore gleicher Entität im Besitz einer Vielzahl von genetischen Metastasierungsprogrammen sein könnten (Hunter KW et al., 2001). Viele Gene wurden mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen in den letzten Jahren mit dem Vorgang der Metastasierungs in Verbindung gebracht (Chambers AF et al., 2002; Woodhouse EC et al., 1997). Da die meisten dieser molekulargenetischen Untersuchungen jedoch unter In-vitro-Bedingungen erfolgten, stehen bislang nur wenige Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Metastasierungs in vivo zur Verfügung. Die im Rahmen dieser Arbeit bei allen untersuchten Genen beobachtbaren Expressionsunterschiede in den Lymphknotenmetastasen könnten demnach Rückschlüsse auf deren unterschiedliche fallabhängige Bedeutung für die Lymphknotenmetastasierungs zulassen.

Praktische Konsequenz der Tumorheterogenität für molekulargenetische Untersuchungen

Zahlreiche Studien, die sich mit der intratumoralen Heterogenität beschäftigten, basierten auf durchflusszytometrischen DNA- Untersuchungen (Bonsing BA et al., 1993), zytogenetischen Untersuchungen (Pandis N et al., 1995), Techniken der In-situ-Hybridisierung (Matsumara K et al., 1992) und Allelotypisierung (Chen LC et al., 1992).

Hieraus wird ersichtlich, daß sowohl die Vielzahl der angewandten analytischen Methoden als auch das breite Spektrum der verwandten Untersuchungsmaterialien (tiefgefrorenes Gewebe, Archivmaterial, Zellkulturen etc.) eine Reihe von Problemen in sich birgt. Die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Laboratorien bleibt dadurch eingeschränkt und erschwert einen möglichen breiten klinischen Einsatz neuer Techniken. Einige Autoren sehen in der Metastasenforschung die isolierte Betrachtung einzelner Subpopulationen aus malignen Tumoren als die beste Vorgehensweise an (Poste G et al., 1982). Dem ist entgegenzuhalten, daß eine derartige Sichtweise der Komplexität der Tumorheterogenität nicht vollends gerecht wird, da wahrscheinlich genetische Alteration und Selektion einer Einzelzelle ohne Berücksichtigung des „Microenvironment“ den Vorgang der Metastasierung nicht ausreichend erklären können. Im Gegensatz hierzu sind jedoch auch Untersuchungen an komplexen Gesamtgeweben problematisch, da eine fehlende Differenzierung zwischen malignen und nichtmalignen Zellbestandteilen möglicherweise zu Fehlinterpretationen führt. Mit der Weiterentwicklung der unterschiedlichen Mikrodissektionsverfahren in den letzten Jahren entstand eine neue Möglichkeit, homogeneres Gewebematerial für molekulare Untersuchungen zu erhalten (Gillespie JW et al., 2001).

4.4 Bedeutung der verwendeten Technik

Die Amplifikation von Genabschnitten stellt bei Mammakarzinomen die häufigste genetische Anomalie dar. Andere Mechanismen der Protoonkogenaktivierung wie Punktmutationen, chromosomales Rearrangement und Geninsertion scheinen hingegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Bieche I et al., 1995). Einige Vorarbeiten konnten anhand der Her- 2/neu Bestimmung in einem Vergleich unterschiedlicher Bestimmungsmethoden (FISH-Analyse, RT- PCR, IHC) zeigen, daß eine Genüberexpression auf Ebene der mRNA zuverlässig mit dem Vorhandensein derartiger Amplifikationen auf DNA- Ebene korreliert (Specht K et al., 2001; Walch A et al., 2001; Tubbs RR et al., 2001). Da bei schätzungsweise 3 bis 15 % aller Mammakarzinome eine Diskordanz von Amplifikation und Proteinexpression beobachtet

werden kann, sind mit Anwendung der RT-PCR im Gegensatz zu anderen Techniken auch bei diesen Fällen quantitative Aussagen über die Genexpression möglich (Jimenez RE et al., 2000).

Ein weiterer Vorteil der verwendeten Methode besteht darin, daß die im Rahmen dieser Arbeit getroffenen Aussagen im Gegensatz zu vielen anderen Arbeiten auf einem in vivo gewonnenem Datenmaterial basieren.

Die Mehrzahl der in den letzten Jahren veröffentlichten Studien, die sich unter verschiedenen Fragestellungen mit der Progression und Metastasierung des Mammakarzinomes beschäftigten, verwendete die cDNA-Microarray Technik, die prinzipiell auch eine Möglichkeit zur Expressionsanalyse an mikrodisektiertem Gewebe darstellt (Sgroi DC et al., 1999). Zweifelsohne ermöglicht diese neuere Technik eindrucksvolle Einblicke in komplexe Genexpressionsmuster maligner Tumore; ihr methodenbedingter Nachteil besteht aber in ihrer Anforderung an frisches oder tiefgefrorenes Untersuchungsgut, da ihre Anwendung an Paraffingewebe oftmals nur unzureichende Ergebnisse liefert. Dies hat aufgrund des nur in begrenztem Umfang vorhandenem Untersuchungsmaterial eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit dieser Methode zur Folge und erschwert aufgrund nicht standardisierter Arbeitstechniken eine potentielle klinische Anwendung (Paik S et al., 2004). Auch der direkte Proteinnachweis mittels immunhistochemischer Färbung (IHC) bei archivarischem paraffin-eingebettetem Gewebe kann methodisch problematisch sein. So kann insbesondere bei älteren Paraffinblöcken die Intensität der Immunfärbung der Tumormarker beeinträchtigt sein (Jakobs TW et al., 1996). Auch konnten einige Arbeiten zeigen, daß die verschiedenen, sich im Handel befindenden Antikörper eine starke Variation von Sensitivität und Spezifität bei Anwendung an Paraffinmaterial aufweisen (Busmanis I et al., 1994; Press MF et al., 1994). An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß immunhistochemische Verfahren aufgrund eines bislang uneinheitlichen Scoring-Systems nur bedingt quantitative Aussagen ermöglichen und einer gewissen Beobachtungsvariabilität unterliegen (Press MF et al., 1994).

4.5 Praktische Vorgehensweise bei den molekularen Untersuchungen

Mit der Kombination von Laser capture microdissection (LCM) und RT-PCR kamen bei dieser Studie zuverlässige Methoden zum Einsatz, die an routinemäßig formalinfixiertem Paraffingewebe eine vergleichende molekulargenetische Untersuchung von Primärtumoren und den entsprechenden Lymphknotenmetastasen in höherer Fallzahl ermöglichen. Dies erlaubt eine retrospektive Herangehensweise mittels Archivmaterial. Im Vorfeld der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde die sichere praktische Handhabung der angewandten Methoden eingeübt. Alle im experimentellen Teil der Arbeit verwendeten Versuchsprotokolle wurden am Institut für Pathologie und pathologische Anatomie der TU München evaluiert (Specht K et al., 2001). Um für die Genexpressionsanalyse aus den entparaffinierten Schnittpräparaten eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen, kam bei fast allen Studienfällen (außer Fälle 15 u. 21) für je beide Tumorlokalisationen die Laser capture microdissection (LCM) zum Einsatz. Dadurch gelang es, nur die Zellverbände der interessierenden neoplastischen Zellen mitsamt ihres umgebenden Stromas („Microenvironment“) aus den Schnitten zu isolieren, die somit bei erhaltener Gewebsarchitektur und Morphologie ohne spätere Verfälschung der Ergebnisse durch nicht maligne zelluläre Komponenten (z.B. Lymphozyten, Gefäßendothelzellen, Fettzellen) weiterverarbeitet werden konnten. Somit konnte eine Einschränkung des Problems der Tumorheterogenität erreicht werden (Fend F et al., 2000).

Da sich die manuelle Herstellung von Schnittpräparaten aus Paraffinblöcken aufgrund des unterschiedlichen Kalkgehaltes von Mammakarzinomen nicht immer leicht gestaltet und die zu isolierende mRNA während Durchführung der einzelnen Arbeitsabläufe leicht zu Degradation neigt (siehe Abschnitt 3.3, S.59f.), wurde die Mikrodissektion an mehreren Schnitten (durchschnittlich 2) durchgeführt und das erhaltene Gewebe in ein gemeinsames Gefäß („Pooling“) überführt. Zudem wurde durch eine schnelle Weiterverarbeitung der mikrodissektierten Gewebsschnitte innerhalb von maximal 7 Tagen eine mögliche lagerungsbedingte Beeinflussung der Nukleinsäurequalität vermindert. Außerdem ermöglichten die Ct-Werte des Haushaltsgens TBP (TATA-BOX Binding Protein) bei allen Proben Aussagen über die vorhandene Menge und Qualität der in die RT-PCR eingesetzten cDNA. Ct-Werte für TBP bis einschließlich 32 wurden als optimal befunden. Dies war bei fast allen untersuchten Proben der Fall, lediglich die Primärtumoren der Studienfälle 21 bzw. 32 und die Lymphknotenmetastasen der Studienfälle 20 bzw. 23 zeigten spätere Anstiege des Reportersignals,

weshalb die Ergebnisse der Untersuchungen bei diesen kritischer gesehen werden müssen (siehe auch Abschnitt 4.7; S. 98).

Die nach Durchführung der mathematischen Auswertung erhaltenen Mittelwertverhältnisse der untersuchten Gene zu TBP (Ratio) repräsentieren die Durchschnittsmenge von mRNA der mikrodissektierten Gewebsareale in den Primärtumoren und den Lymphknotenmetastasen. Durch den Vergleich mit den Expressionswerten der Lymphknotenmetastasen können indirekt Rückschlüsse hinsichtlich einer möglichen zellulären Heterogenität der Tumorzellen auf Seiten der Primärtumoren gezogen werden.

4.6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Expressionsanalyse

Klinische Beobachtungen haben gezeigt, daß maligne Tumoren der Mamma während ihrer Erstehung eine Vielzahl von Tumorzellen in den Organismus aussenden, jedoch nur ein kleiner Teil von diesen die Fähigkeit zur Bildung eines invasiv- destruierenden wachsenden sekundären Tumors in einem Fremdorgan besitzt (Liotta LA et al., 1974; Nicolson GL et al., 1991). Dies zeigt sich im Nachweis disseminierter Knochenmarkszellen, der Beobachtung vereinzelter Tumorzellen in histologisch ansonsten unauffälligen Lymphknoten und dem Auftreten zirkulierender Tumorzellen im Serum bei Patientinnen, bei denen jedoch keine Metastasierung beobachtet werden konnte (Melamed MR et al., 1992).

Hieraus wird ersichtlich, daß der Vorgang der Metastasierung ein ineffizienter und hochselektiver Vorgang zu sein scheint, da nur ein kleiner Anteil maligner Zellen eines Tumors die volle Metastasierungsfähigkeit mit den dafür notwendigen geno- und phänotypischen Eigenschaften besitzt. Eine Reihe älterer Arbeiten konnte an tierexperimentellen Modellen zeigen, daß Alterationen einer Vielzahl einzelner Onkogene malignen Zellen metastatische Eigenschaften verleihen können (Chambers AF, 1988). Da metastatische Zellen sich in einer Vielzahl von Genprodukten von nichtmetastatischen Zellen unterscheiden, ist der Metastasierungsprozeß in vivo aber wahrscheinlich nicht mit der Alteration eines einzelnen Genes zu erklären. Vielmehr scheint es wahrscheinlicher, daß die Regulation der Expression für die Metastasierung wichtiger Gene in jedem Tumor individuell unterschiedlich durch eine Vielzahl von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, Wachstumsfaktoren und hormonellen Einflüssen gesteuert wird.

Die bei dieser Arbeit beobachtbaren Expressionsunterschiede von **ADAM 17 (5 Fälle)**, **AXL (12 Fälle)** und **Her- 2/neu (13 Fälle)** in den Lymphknotenmetastasen lassen sich demnach in

zweierlei Hinsicht interpretieren. Nach dem Konzept der Tumorheterogenität erhält man den Hinweis, daß bereits in den entsprechenden Primärtumoren vereinzelte Zellen oder Zellpopulationen vorhanden sind, die dieses unterschiedliche Expressionsverhalten aufweisen und somit im Gegensatz zu anderen Tumorzellen des Primärtumors die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen könnten (Fidler IJ et al., 1977; Poste G et al., 1980; Fidler IJ et al., 1982).

Ebenso ist vorstellbar, daß Tumorzellen sowohl im Primärtumor als auch während ihrer Passage durch das lymphatische Gefäßsystems und nach der Absiedlung im Lymphknoten aufgrund fortlaufend veränderter Umweltbedingungen (pH-Wert, Sauerstoffgehalt, nutritive Faktoren) einem ständigen Selektionsdruck ausgesetzt sind (Poste G et al., 1982). Eine Änderung im Expressionsverhalten oben genannter Gene mit daraus resultierendem, verändert tumorbiologischen Verhalten könnte demnach diesen Zellen zu einem Wachstumsvorteil in der Lymphknotenmetastase verhelfen.

Das unterschiedliche Expressionsverhalten der Gene COL1A1 und COL1A2 in den untersuchten Primärtumoren und die bei einem überwiegenden Teil der Studienfälle beobachtete Herunterregulation in den Lymphknotenmetastasen ist als ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des „Microenvironments“ für die Metastasierung anzusehen (Cavallaro U et al., 2001).

4.7 Eingeschränkt verwertbare Studienfälle

Die Primärtumoren der Studienfälle 21 und 30 und die Lymphknotenmetastasen der Studienfälle 20 und 23 sind aufgrund ihrer hohen TBP- Werte gesondert zu erwähnen (siehe Tab. III.3; S. 62, Tab. III.12; S. 71). Die späten Anstiege des Reportersignals bei diesen Studienfällen können entweder auf eine geringere in die PCR eingesetzte RNA- Menge, so dass demzufolge eine größere Zahl von PCR- Zyklen für die Hochamplifikation des Haushaltsgens nötig war, oder auf eine schlechtere Nukleinsäurequalität der Proben zurückgeführt werden. An dieser Stelle sei insbesondere die Möglichkeit erwähnt, dass eine Fremdkontamination dieser Proben durch RNA degradierende RNasen und DNasen während der Versuchsdurchführung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Eher unwahrscheinlich scheinen dagegen zufällige Fehler bei Durchführung der RT- PCR verantwortlich zu sein, beispielsweise Pipettierfehler oder mangelnde Auflösung der RNA in den Ansätzen, da auch die Ct- Werte der untersuchten Zielsequenzen überwiegend höhere Werte aufweisen. Da bei der relativen Quantifizierung die Expressionswerte der untersuchten Gene im

Verhältnis zum Haushaltsgen interpretiert werden, bleibt der Wert des Quotienten sowohl für die Expression in den Primärtumoren als auch für die vergleichende Expressionsanalyse von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen verwertbar. Aus diesem Grund wurden diese Studienfälle trotz ihrer aus biologischer Sicht eingeschränkten Aussagekraft in die statistische Auswertung miteinbezogen.

4.8 Bewertung der molekularen Untersuchungen in den Primärtumoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expressionslevel von sechs mit Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung gebrachten Genen anhand von archiviertem Paraffinmaterial untersucht. In unterschiedlichem Umfang wurde deren Bedeutung für das Erlangen der zellulären Metastasierungsfähigkeit bereits in einigen Arbeiten der letzten Jahre untersucht. Die vorliegende Studie zeigt, daß in einer Studiengruppe von nodal positiven Mammakarzinomen diese Gene unterschiedlich exprimiert werden. Dieses unterschiedliche Expressionsverhalten der einzelnen Gene in den Primärtumoren nodal positiver Mammakarzinome spiegelt einerseits die genotypische Variabilität des Mammakarzinoms wider, andererseits ist es als ein Hinweis auf die potentielle Eignung der untersuchten Gene als tumorbiologische Marker zu verstehen. Mit Ausnahme des Her-2/neu-Onkogens liegen bei den restlichen Genen derzeit bislang aber nur wenig gesicherte Erkenntnisse vor. Mit Durchführung der RT-PCR gelang bei allen 32 Studienfällen für die untersuchten Gene in unterschiedlichem Umfang der Nachweis von mRNA auf Transkriptionsebene. Da keine geeignet große Vergleichsgruppe nichtmetastasierter Mammakarzinome herangezogen wurde, erfolgt der Vergleich der Genexpressionslevel innerhalb der Studiengruppe. Hierdurch konnten fallindividuelle Hinweise auf die onkogenetische Bedeutung dieser Gene in einer Studiengruppe primärer Mammakarzinome gewonnen werden. Im nächsten Abschnitt wird unter Einbeziehung der eigenen Ergebnisse in kurzer Darstellung ein Einblick in den aktuellen Wissenstand über die molekulargenetische Bedeutung der untersuchten Gene und den vermuteten komplexen pathophysiologischen Aufgaben ihrer Genprodukte gegeben:

(Anmerkung zu Abschnitt 4.8: Im Gegensatz zur Perzentilendarstellung, die einen groben Überblick der Expressionslevel in den Primärtumoren ermöglicht, bezieht die Beurteilung der Daten mithilfe der arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen Extrem- und Ausreißerwerte stärker mit ein. Bei der Beurteilung der biologischen Relevanz der Genexpression in den Primärtumoren erscheint die Verwendung dieser Maßzahlen daher ein stringenteres Kriterium zu sein. Einige Studienfälle, die höhere Expression nach der Perzentilenverteilung aufweisen, werden hier deshalb nicht mehr erwähnt, da mit Ausnahme des Her-2/neu-Gens für die untersuchten Genen keine Vergleichswerte existieren.)

ADAM 17 (TNF- α converting enzyme)

Die Expressionsanalyse für ADAM 17 konnte bei 6 der 32 Studienfälle (= 19 %) eine Überexpression innerhalb der Studiengruppe (Mittelwert: 0,53; Standardabweichung: 0,29) nachweisen (siehe Ergebnisse, Abb. III.2 (a); S. 64 und Tab. III.5; S. 65). Bei einer Range der Expressionswerte von 1,09 innerhalb der 32 Studienfälle zeigen die invasiv duktales Mammakarzinome der Studienfälle 4, 7, 8, 14, 17 und 32 eine Ratio zu TBP zwischen 0,84 (Studienfall 17) und 1,10 (Studienfall 7). Über das Expressionsverhalten von ADAM 17 in malignen Tumoren stehen bislang im Gegensatz zu den Matrix- Metalloproteasen (MMP) nur einige wenige Arbeiten zur Verfügung. Die Ergebnisse zweier neuerer Arbeiten konnten jedoch in einem Vergleich mit nichttumorösem Gewebe innerhalb ihrer untersuchten Studiengruppen erhöhte Expression von ADAM 17 bei primären Mammakarzinomen nachweisen (Borrell-Pages M et al., 2003; Lendeckel U et al., 2004). ADAM 17 gehört zu einer bislang mehr als 30 Gene umfassenden Genfamilie, die mit membrangebundenen Glykoproteinen der Zelloberfläche unterschiedlichster Aufgaben in Verbindung gebracht wird. Räumlich betrachtet bestehen diese Membranproteine aus 8 zusammenhängenden, aber funktionell unterschiedlichen Proteindomänen (Black RA et al., 1998; Wolfsberg TG et al., 1995; Schlondorff J et al., 1999). Besondere Aufmerksamkeit in den letzten Jahren erlangte ADAM 17 in der Forschung aufgrund seiner proteolytischen Eigenschaften (Metalloprotease) und der Fähigkeit, mit Integrinrezeptoren in Wechselwirkung treten zu können (Disintegrin). Neben der Fähigkeit, Bestandteile der extrazellulären Matrix abzubauen, beeinflusst möglicherweise ADAM 17 als Regulationsprotein durch proteolytische Spaltung zahlreicher Membranproteine deren biologische Aktivität und die Freisetzung löslich wirksamer autokrin und parakrin wirksamer Zytokine und Wachstumsfaktoren von der Zelloberfläche (Schlondorff J et al., 1999; Mullberg J et al., 2000).

Als eine zentrale Bedeutung dieser Vorgänge werden ein möglicher Einfluß auf das Wachstum und die Differenzierung maligner Tumore angenommen. Die Disintegrin- Domäne ermöglicht die Bindung an Integrinrezeptoren, wodurch über zelluläre Interaktionen und Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix Einfluß auf Migrationfähigkeit und Adhäsion der Tumorzellen genommen werden könnte (Lendeckel U et al., 2004).

AXL

Neben dem in zahlreichen Arbeiten untersuchten EGFR-Rezeptor und dem Her- 2/neu-Protoonkogen konnte an Mammakarzinomen die Expression oder Überexpression eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktorrezeptoren, Regulatorproteinen und Onkoproteinen mit Tyrosinkinaseaktivität nachgewiesen werden (Cance WG et al., 1993). Der Nachweis von AXL in malignen Tumoren unterschiedlichster Herkunft sowie In- vitro- Untersuchungen an Zelllinien gaben in der Vergangenheit Hinweise auf dessen hohes onkogenes Potential (Ito T et al., 1999; Tsou AP et al., 1998; O'Bryan JP et al., 1991). AXL wird insbesondere ein Einfluß auf die Proliferation und Differenzierung maligner Zellen zugeschrieben (Braunger J et al., 1997).

Analog dem Her- 2/neu- Protoonkogen wird auch für die Rezeptortyrosinkinase AXL eine Überexpression bei 25 % der primären Mammakarzinome angenommen (Burcher A et al., 1998).

Die vorliegende Studie konnte bei einer Range von 0,64 für den Tyrosinkinaserzeptor AXL Expressionsschwankungen innerhalb der 32 untersuchten Primärtumore belegen. Bei einem Mittelwert der Expression von 0,25 und einer Standardabweichung von 0,19 konnte eine Überexpression von AXL bei den Studienfällen 9, 12, 14, 15, 17 und 18 nachgewiesen werden. Sehr geringe Expressionswerte hingegen weisen die Studienfälle 20, 21 und 30 auf, die circa um das 10- fache geringere Ratiowerte als oben genannte Fälle aufwiesen (vgl. Ergebnisse, Abb. III.2 (b); S. 65 und Tab. III.6; S. 66).

Im inaktiven Zustand handelt es sich bei den Tyrosinkinaserzeptoren um Polypeptide mit nur einer hydrophoben, die Membran durchspannenden Domäne. Nach Bindung eines Liganden entstehen über die Bildung von Homodimeren die funktionell aktiven Rezeptoren (Braunger J et al., 1997). Neben einer transmembranösen hydrophoben Bindungsdomäne bildet eine extrazelluläre Domäne die Bindungsstelle für einen Liganden, während die zytoplasmatische Domäne über eine ligandenaktivierte Tyrosinkinase die Autophosphorylierung mehrerer für den jeweiligen Rezeptor typischer Tyrosylreste katalysiert (Ullrich A, 1990). Die phosphorylierten Tyrosylreste ermöglichen einer Reihe von intrazellulären Adapterproteinen, die im Besitz einer dafür notwendigen Domäne sind, die Anlagerung an den Rezeptor (Pawson T, 1993). Diese Adapterproteine sollen bei Überexpression des AXL-Rezeptors über verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege für die mitogene Wirkung des AXL- Liganden GAS6 (Growth arrest-specific gene 6) verantwortlich sein (Mark M et al., 1996; Tanaka K et al., 1998). Andere Autoren halten bei Überexpression von

AXL auch eine ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors durch spontane Homodimerisierung für möglich (Schlessinger J, 1990).

LMNB1

Die Intermediärfilamente bilden nach aktuellem Wissenstand eine von 65 Genen codierte heterogene Gruppe von Proteinen, denen eine Reihe unterschiedlichster Aufgaben bei zellbiologischen Phänomenen wie Zellteilung, Formerhaltung von Zellen, Zellmotilität und Zellpolarität zugeschrieben wird (Steinert PM, 1988). Während von den verschiedenen zytosmatischen Intermediärfilamenten sowohl ihr zell- und gewebsspezifisches Auftreten als auch deren Beteiligung an zytoskelettalem Zellaufbau und intrazellulärer Signaltransduktion in der Literatur umfangreich beschrieben worden sind, erlangen in den letzten Jahren auch die Lamine als Intermediärfilamente der innernukleären Kernmembran zunehmend Aufmerksamkeit. Während man in früheren Studien annahm, daß die Lamine ubiquitär in eukaryotischen Zellen im Sinne von Haushaltsproteinen rein statische Aufgaben zur Erhaltung der Kernintegrität besitzen würden (Herrman H, 2003), konnten neuere Arbeiten zeigen, daß die Expression von Lamin B1 auch in gesunden menschlichen Geweben variiert (Broers JL et al., 1997). Ebenso werden Mutationen des Lamin B1 Gens mit einer Reihe von hereditären Krankheiten in Verbindung gebracht (Wolfner MF, 2001). Grundsätzlich wird in der Literatur darüber spekuliert, daß Lamine eine wichtige Rolle bei der Replikation der DNA, der intranukleären Organisation des Chromatins, der Zellteilung und Vorgängen während der Zellapoptose spielen könnten (Wolfner MF, 2001). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß bei den untersuchten nodal positiven Primärtumoren Lamin B 1 mit einem Mittelwert von 0,64 und einer Standardabweichung von 0,40 ein unterschiedliches Expressionsniveau aufweist (siehe Ergebnisse, Abb. **III.2 (c)** und Tab. **III.7**; S. 66).

Bei einer Range von 1,60 lagen die Ratiowerte bei 7 Studienfällen auf sehr geringem Niveau. Im Gegensatz hierzu konnte bei 5 von 32 Studienfällen (= 16 %) (Studienfall 2, 3, 4, 13, 14) eine hohe Expression von LMNB1 beobachtet werden.

Über die molekulare pathophysiologische Bedeutung der Lamine bei malignen Tumoren, insbesondere beim Mammakarzinom ist bislang nur wenig bekannt.

Jedoch konnte eine Vorarbeit Hinweise darauf geben, daß eine erhöhte Expression von Lamin B bei primären Adenokarzinomen mit einer klinisch relevanten Prognoseverschlechterung einhergehen könnte (Ramaswamy S et al., 2003).

HER- 2/neu

Bei den Studienfällen 1 und 7 war bei den Patientendaten (Ergebnisse, Tab. **III.1**; S. 55 f.) eine über Immunhistochemie routinemäßig bestimmte Her- 2/neu Positivität bekannt. Hierbei zeigten bei Studienfall 1 50 % beziehungsweise bei Studienfall 7 100 % der Primärtumorzellen starke Positivität für Her- 2/neu. So war es keinesfalls überraschend, dass diese beiden Studienfälle mit Ratiowerten von 1,77 (Studienfall 1) und 6,66 (Studienfall 7) auch auf Ebene der mRNA höhere Expressionswerte innerhalb der Studiengruppe aufwiesen. Obwohl bei den Studienfällen 8, 9, 16, 17, 27 und 32 keine Vorbestimmung des Her- 2/neu Status den Patientendaten zu entnehmen war, sprachen die hohen Expressionswerte auch bei diesen Studienfällen für eine Her- 2/neu Positivität der Primärtumoren. Bei 3 Studienfällen (Studienfall 13, 15, 30) waren die Primärtumoren Her- 2/neu immunhistochemisch negativ getestet worden (siehe Ergebnisse, Tab. **III.1**; S. 55f.). In Übereinstimmung hierzu wiesen diese Primärtumoren niedrigere Ratiowerte des Her- 2/neu- Gens auf.

Für die gesamte Studiengruppe (Mittelwert 1,73; Standardabweichung: 2,10) zeigte die Range von 9,81 eine stark variable Expression für Her- 2/neu auf (siehe Ergebnisse, Abb. **III.8**; S. 67). Da bislang kein eigener Ligand für den Her- 2/neu Tyrosinkinase-Rezeptor gefunden werden konnte, wird als Voraussetzung für seine biologische Aktivierung eine Interaktion (Heterodimerisierung) mit anderen Rezeptoren der c-erbB- Onkogenfamilie (EGFR, Her- 2/neu, Her- 3, Her- 4) (siehe Einleitung, Tab. **I.6**; S. 23) vermutet (Connelly PA, 1990; Tzahar E et al., 1996; Yarden Y et al., 2001; Craven RJ et al., 2003). Ebenso wird bei Überexpression des Her- 2/neu- Proteins eine Autoaktivierung und eine Beteiligung an Vorgängen der intrazellulären Signaltransduktion analog den Rezeptortyrosinkinasen für möglich gehalten (Di Fiore PP et al., 1987; Hudziak RM, 1987). Neben einem generellen Einfluß des Her- 2/neu Proteins auf Wachstum und Differenzierungsgrad maligner Zellen werden in der Literatur unter anderem die Beeinflussung von Zellmotilität, Zelladhäsion und Aktivität proteolytischer Enzyme als für Invasion und Metastasierung wichtige Funktionen diskutiert (Yu D et al., 1994; Tan M et al., 1997; Hung MC et al., 1999; Yu D et al., 2000; Eccles SA et al., 2001).

COL1A1 und COL1A2

Als Zeichen einer gestörten Gewebshömoostase ist bei manchen invasiv wachsenden Mammarkarzinomen eine starke fibroproliferative Antwort des Tumorstromas innerhalb der Tumorzellverbände und der umliegenden Gewebe zu beobachten (Rasmussen HB et al., 1992). Die

möglichen tumorbiologischen Hintergründe dieser Beobachtung sind bislang im Detail größtenteils unverstanden. Für die Entstehung des Tumorstromas werden gegenseitige Wechselwirkungen zwischen epithelialen und stromalen Komponenten verantwortlich gemacht, die im Rahmen eines Remodellingprozesses neben einem erhöhten proteolytischen Abbau eine erhöhte Produktion und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen im Tumorgewebe auslösen (Ohtani H et al., 1998; Heppner KJ et al., 1996; Gregoire M et al., 1995). Hinweise existieren dafür, daß durch die gesteigerte Bildung von Matrixproteinen von seitens interstitieller Bindegewebszellen innerhalb der soliden Tumorzellverbände (Fibroblasten, Myofibroblasten) ein geeignetes Mikro-Milieu entsteht, welches Einfluß auf die Invasion- und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen nehmen könnte (Cavallaro U, 2001; Jensen BV et al., 2002; Quaranta V et al., 2003). Da Kollagen Typ I einen wesentlichen Baustein der extrazellulären Matrix darstellt, wurde bei dieser Arbeit das Expressionsverhalten von COL1A1 und COL1A2, die für die Synthese der Pro- α 1- bzw. der Pro- α 2-Ketten des intrazellulären Prokollagens verantwortlich sind, als Parameter des Kollagenumsatzes innerhalb der Studiengruppe untersucht. Eine gemeinsame Überexpression von COL1A1 und COL1A2 in den Primärtumoren konnte bei den Studienfällen 9, 11 und 32 beobachtet werden. Eine höhere Expression von COL1A1 zeigen zusätzlich drei Studienfälle (Studienfall 15, 18, 23), wohingegen bei einem Studienfall (Studienfall 26) lediglich ein höheres Expressionsniveau von COL1A2 nachgewiesen werden konnte. Eine Range von 18,72 bzw. 4,48 für COL1A1 und COL1A2 zeigt die stark vorhandene Expressionsvariabilität dieser Gene in der Studiengruppe auf (siehe Ergebnisse, Abb. **III.2 (e), (f)**; S. 68 f.). Die Bedeutung einer erhöhten Expression und Produktion des ubiquitär im menschlichen Körper vorkommenden Kollagen Typ1 als extrazellulärer biologischer Marker bei malignen Tumoren wurde in der Vergangenheit unterschiedlich beurteilt (Halvorsen TB et al., 1989; Seemayer TA et al., 1981). Aus zwei aktuelleren Vorarbeiten ergaben sich jedoch Hinweise darauf, daß die erhöhte Synthese von Kollagen Typ I bei primären Mammakarzinomen aus prognostischer Sicht einen aggressiveren Krankheitsverlauf mit einer höheren Fernmetastasierungsrate widerspiegeln könnte (Ramaswamy S et al., 2003; Jensen BV et al., 2002).

4.9 Beurteilung der Coexpression ADAM 17 (TNF- α converting enzyme)/ Her- 2/neu

Für das Verständnis der Entstehung phänotypischer tumorbiologischer Eigenschaften des Mammakarzinoms besitzen Beobachtungen möglicher funktionaler Zusammenhänge auf molekulargenetischer Ebene großen Wert. In der Zusammenschau der untersuchten Gene

zeigte sich eine starke interindividuelle Variabilität der Genexpressionmuster, so dass die Schwierigkeit molekulargenetischer Analysen darin besteht, bei einer relativ geringen Zahl von Studienfällen gleichsinniges oder gegenläufiges Expressionsverhalten der Gene untereinander zu beurteilen. Da, wie bereits erwähnt, die biologische Wirksamkeit von Proteinen von einer Vielzahl posttranskriptionaler und posttranslationaler Modifikationsvorgängen mitbestimmt wird, können Aussagen über die pathophysiologische Bedeutung einer Überexpression der entsprechenden Gene auf mRNA Ebene nur mit äußerster Vorsicht getroffen werden.

Zahlreiche Hinweise existieren jedoch dafür, dass invasives Tumorwachstum und Metastasierung Her- 2/neu positiver Tumoren unter anderem auf einer transkriptionalen Hochregulation proteolytischer Enzymaktivität beruhen könnte (Eccles S et al., 2001). Eine interessante Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit stellten daher die Studienfälle dar, bei denen neben einer höheren Expression des Her- 2/neu Gens eine relativ starke Expression von ADAM 17 in den Primärtumoren zu beobachten war. Besonders auffällig zeigte sich dies bei 3 Studienfällen (Studienfall 7, 8, 17), bei denen für beide Gene Ratiowerte oberhalb der jeweiligen Standardabweichungen beobachtet werden konnten. Ebenso kann bei weiteren 2 Studienfällen (Studienfall 9, 32) über einen möglichen pathophysiologischen Zusammenhang dieser Koexpression spekuliert werden (siehe Ergebnisse, Abb. **III.10 (a)**; S. 86; Abb. **III.11**; S.88).

Aufgrund der relativ geringen Zahl von Gesamtstudienfällen kann diese Beobachtung statistisch zwar nicht abgesichert werden, jedoch ergeben sich aus der Literatur Hinweise, die durchaus eine Interpretation ermöglichen.

Es wird vermutet, dass eine Modulation der biologischen Aktivität des Her- 2/neu-Proteins durch die proteolytische Abspaltung der Rezeptorektodomäne (p 110) stattfinden könnte. So konnte bei manchen Mammakarzinomen eine membrangebundene Rezeptorvariante (p 95) mit Tyrosinkinaseaktivität beobachtet werden, welche bei den untersuchten Fällen mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korrelierte. (Christianson et al., 1998). Ebenso gelang der Nachweis des Spaltproduktes p110 in Serum und Primärtumoren von Mammakarzinompatientinnen (Leitzel K et al., 1995; Harris LN et al., 1996; Yamauchi H et al., 1996; Colomer R et al., 2000). Durchaus vorstellbar wäre demnach, dass diese Rezeptorspaltung des Her- 2/neu Proteins durch ADAM 17 stattfindet. Jedoch liegt darüber bislang nur in geringem Umfang Literatur vor. Lediglich für den Her- 4 Rezeptor konnte dieser funktionelle Zusammenhang zu ADAM 17 erbracht werden (Rio C et al., 2000). Es sei jedoch auch erwähnt, dass einige Autoren die Rezeptormodifikation durch ADAM 17 eher für unwahr-

scheinlich halten (Black RA et al., 1996; Codony-Servat J et al., 1999). Da einerseits der Protease ADAM 17 eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung löslicher Rezeptorliganden zugeschrieben wird und andererseits, wie bereits erwähnt, eine Heterodimerisierung von Her-2/neu mit anderen Rezeptortyrosinkinasen der c-erbB- Onkogenfamilie zu beobachten ist, erscheint auch indirekt ein biologischer Zusammenhang zwischen ADAM 17 und Her-2/neu möglich (Graus-Porta D et al., 1997; Borrell-Pages M et al., 2003). Ferner könnte unter den zahlreichen Substraten, die in der aktuellen Literatur für ADAM 17 diskutiert werden, dem Zytokin TNF- α eine wichtige Rolle zukommen, da diesem neben inflammatorischen auch antiproliferative Eigenschaften zugeschrieben werden. Eine ältere Arbeit konnte in einer Untersuchung an Mammakarzinomen zeigen, dass mithilfe gegen das Her-2/neu Protein gerichteter Antikörper eine Potenzierung dieser antiproliferativen Eigenschaften von TNF- α erzielt werden kann (Hudziak RM et al., 1989). Die beobachtete starke Coexpression der mRNA von ADAM 17 und Her-2/neu könnte demnach zusammen mit den Literaturhinweisen ein Beleg sein, dass ADAM 17 eine regulative Funktion bei der Progression Her-2/neu positiver Primärtumoren zukommen könnte.

4.10 Beurteilung der vergleichenden Expressionsanalyse in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen

Bislang ist weitgehend unbekannt, in welchem molekulargenetischem Zusammenhang die für Invasion und Metastasierung postulierten Metastasierungsgene für die Generierung des metastatischen Phänotyps stehen. Im Sinne des klassischen Tumorprogressionsmodell sollte die metastatische Aktivität von Tumorzellen auf späte genetische Alterationen dieser Gene zurückzuführen sein. Der Nachweis solcher für die Metastasierung kausaler Mutationen in vivo konnte jedoch an spontan auftretenden soliden menschlichen Tumoren bislang nicht erbracht werden (Yokota J et al., 2000). Die Beobachtung, daß Alterationen vieler mit Metastasierung in Verbindung gebrachter Gene auch in prä malignen und frühen invasiven Krankheiten beobachtet werden konnten, zeigt die große Variation individueller Tumorprogression auf und stellt die Existenz spezifischer Metastasierungsgene in Frage (Hanahan D et al., 2000). Eine Studie konnte zwar mithilfe einer Analyse der DNS- Ploidie bei 50 % ihrer untersuchten Studienfälle beobachten, dass die Mehrzahl der malignen Zellen des Primärtumors sich von den metastatischen Zellen unterscheiden läßt, über eine Heterogenität im Expressionsverhalten spezifischer Gene in Primärtumor und regionärer Lymphknotenmetastasen ist jedoch derzeit nur wenig bekannt (Symmans WF et al., 1995). Die

klonale Selektionstheorie fand als Metastasierungsmodell zwar breite Akzeptanz, jedoch ist der Anteil metastasierungsfähiger Subklone in primären Tumoren weiterhin unbekannt. Da auch vergleichende Untersuchungen von primären Tumoren und deren Metastasen vielfach keine genotypischen Unterschiede, die den Vorgang der Metastasierung erklären könnten, aufdecken konnten, wurde vielfach der Rückschluß gezogen, daß die Bestimmung der durchschnittlichen Expression spezifischer genetischer Marker in den Primärtumoren geeignet sei, in Korrelation mit klinischen Daten Aussagen über die Metastasierungsfähigkeit maligner Tumoren zu treffen (MCGuire WL et al., 1990; Slamon DJ et al., 1989; Lidereau R et al., 1989). Jedoch konnte bislang aus der Vielzahl von Genen, die aus In- vivo- oder In- vitro- Untersuchungen mit dem Vorgang der Metastasierung in Verbindung gebracht wurden, kein Markergen gefunden werden, das zuverlässig mit dem klinischen Auftreten einer Metastasierung in Verbindung gebracht werden konnte. Dies könnte teilweise darauf zurückführbar sein, daß genetische Alterationen in Primärtumoren in einer Vielzahl von Fällen unterschätzt werden könnten, wenn diese nur in einem geringeren Anteil von Tumorzellen vorhanden sind oder durch mehrere genetisch unterschiedliche Klone oder Populationen verschleiert werden. Eine vergleichende Expressionsanalyse von primären Mammakarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen erschien sinnvoll, da mit dem Nachweis von Expressionsunterschieden spezifischer Gene möglicherweise den In- vivo- Bedingungen entsprechende Informationen über die molekularen Grundlagen der lymphogenen Metastasierung gewonnen werden konnten, die für nachfolgende Untersuchungen von diagnostischem und therapeutischem Nutzen sein könnten (siehe Abschnitt **4.11**):

ADAM 17

Unter den stringenten Kriterien der Cut-off- Berechnung gelang der Nachweis von Expressionsunterschieden zwischen Primärtumoren und regionären Lymphknotenmetastasen für eine Untergruppe von 5 Studienfällen (Studienfälle 13, 19, 21, 27, 30) (siehe Abb. **III.3 (c)**; S. 75). Eine interessante Beobachtung war, dass einheitlich bei diesen Studienfällen auf einem Signifikanzniveau von $p=0,043$ ein Anstieg der Ratiowerte in den Lymphknotenmetastasen zu beobachten war (siehe Ergebnisse, Abb. **III.3 (b)**; S. 74 und Tab. **III.14**; S. 75). Dies zeigt für diese Studienfälle, dass die Mehrzahl der Primärtumorzellen scheinbar eine geringere Expression dieses Gens aufweist. Der einheitlich zu beobachtende Anstieg der mRNA Expression stellt eine interessante Beobachtung dar, die eine Bedeutung der Hoch-

regulation von ADAM 17 für den lymphogenen Metastasierungsprozess vermuten lässt. Die molekularen Mechanismen, auf die diese Expressionsheterogenität von Primär- und Sekundärlokalisierung zurückgeführt werden könnte, sind bislang unbekannt. Da invasives Tumorstadium und Metastasierung abhängig von zeitlich balancierten Veränderungen proteolytischer Aktivität, Zell-Zell und Zell-Matrixinteraktionen sind, könnten metastatische Tumorzellen durch die Hochregulation von ADAM 17 einen Selektionsvorteil bei der Metastasierung erlangen. So könnte ADAM 17 als spätere genetische Alteration in einigen Primärtumorzellen an der Generierung des metastatischen Phänotyps beteiligt sein.

AXL

Die spärlich vorhandene Literatur scheint dafür zu sprechen, dass eine Hochregulation der Rezeptortyrosinkinase AXL in metastatischen Tumorzellen stattfindet. So konnte eine Arbeit, deren Ergebnisse allerdings auf Beobachtungen verschiedener Zelllinien der Prostata basierten, eine höhere Expression von AXL in metastasierungsfähigen Zelllinien beobachten (Jakob AN et al., 1999). Ebenso wird berichtet, dass AXL in hämatogenen Fernmetastasen kolorektaler Karzinome um das 10fache höher exprimiert wird als in Primärtumoren und Normalgewebe (Craven RJ et al., 1995). Überraschend war daher, dass bei der vorliegenden Arbeit nur bei 2 Studienfällen (Studienfall 20 und 30) eine Hochregulation von AXL in den Lymphknotenmetastasen nachweisbar war. Hingegen zeigten immerhin 10 Studienfälle (Studienfall 3, 7, 8, 9, 12, 14, 16, 17, 18, 26) bei einem Signifikanzniveau $p=0,023$ niedrigere Expression in den regionären Lymphknotenmetastasen (siehe Ergebnisse Abb. III.4 (b), Abb. III.4 (c) und Tab. III.15; S. 76 f.). Die Interpretation einer solchen Beobachtung ist mit Schwierigkeiten verbunden. So kann nicht geklärt werden, ob die beobachtete Herunterregulation von AXL bei einer relativ hohen Zahl von Studienfällen (ca. 32 %) innerhalb der Studiengruppe im Vergleich zum Gesamtkollektiv auf eine zufällige Überrepräsentation oder eventuell aber auch auf unterschiedliche biologische Eigenschaften hämatogen beziehungsweise lymphogen metastasierter Zellen zurückzuführen ist. Dem Anschein nach scheinen sich in diesen Primärtumoren Zellpopulationen mit geringerer Expression von AXL zu befinden, welche jedoch dennoch die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen. Derartige Beobachtungen, die auch bei vergleichenden Untersuchungen anderer Rezeptortyrosinkinasen beschrieben worden sind (siehe Abschnitt Her-2/neu), stellen bei dieser Untergruppe von Studienfällen die Bedeutung von AXL für den Vorgang der lymphogenen Metastasierung in Frage. Möglicherweise besitzt das Gen jedoch auch negativ regulatorische Eigenschaften bei der

Tumorprogression, da die Mehrzahl der Primärtumorzellen höhere Expressionswerte aufweist. Über das Expressionsverhalten von AXL in regionären Lymphknotenmetastasen bei Mammakarzinomen liegen aber derzeit noch keine Vergleichsdaten vor.

LMNB1

Die vergleichende Expressionsanalyse konnte unter den Kriterien des Cut- offs für 10 von 32 Studienfällen (= 31 %) mit $p= 0,333$ nicht signifikante gegensätzliche Expressionsunterschiede in den jeweiligen Lymphknotenmetastasen aufdecken (siehe Abb. **III.5 (b)**, **(c)**, Tab. **III.16**; S. 78 f.). Diese Expressionsunterschiede müssen jedoch auch bei diesen Studienfällen hinsichtlich ihrer möglichen biologischen Relevanz unterschiedlich bewertet werden. So sind bei 4 Studienfällen (Studienfall 11, 16, 18, 20) zwar die Kriterien des Cut- offs erfüllt; die Ratiowerte und deren Veränderungen bewegen sich aber auf niedrigem Niveau, was eine biologische Relevanz dieser Expressionsunterschiede in den Lymphknotenmetastasen fraglich erscheinen läßt (vgl. Ergebnisse, Abb. **III.5 (c)**; S. 78). Von den 6 übrigen Studienfällen zeigen 4 Fälle (Studienfall 13, 17, 21, 30) eine Hochregulation von LMNB1 in den Lymphknotenmetastasen, die im Zusammenhang mit dem Metastasierungsvorgang interessant erscheint.

Diese Expressionsanstiege sind in stärkerem Ausmaß bei den Studienfällen 13 und 17 zu beobachten. Jedoch geben auch für LMNB1 2 Fälle (Studienfall 22, 25) aufgrund ihrer Herunterregulation der mRNA Expression in den Lymphknotenmetastasen Hinweis darauf, dass das Expressionsverhalten einzelner Gene in metastasierungsfähigen Zellen im individuellen Fall komplexen Regulationsmechanismen unterliegt.

Her- 2/neu:

Die überwiegende Zahl der Studien in der Vergangenheit, die einen paarweisen Vergleich des Her- 2/neu Status in Primärtumoren und deren metastatischen Absiedlungen durchführten, beschrieben unabhängig von der Bestimmungsmethode (IHC, FISH-Analyse) eine Konkordanz des Her- 2/neu- Status sowohl in regionären Lymphknotenmetastasen als auch in Fernmetastasen unterschiedlicher Lokalisation (Lacroix H et al., 1989; Simon R et al., 1989; Niehans GA et al., 1993; Masood S et al., 2000; Symann WF et al., 2000; Shimizu C et al., 2000; Cardoso F et al., 2001; Vincent-Salomon A et al., 2002; Xu R et al., 2002; Gong Y et al., 2005).

Jedoch finden sich in der Literatur auch Hinweise, dass bei bis zu 20 % der Mamma-karzinome eine Diskordanz bezüglich des Her- 2/neu Status zwischen primären und sekundären Tumorlokalisationen vorliegen könnte (Gancberg D et al., 2002; Edgerton SM et al., 2003; Sekido Y et al., 2003). Eine neuere Arbeit konnte in einem Vergleich von zirkulierenden Tumorzellen mit dem korrespondierendem Primärtumorgewebe zeigen, dass 9 von 24 (= 37,5 %) der untersuchten Primärtumoren in zirkulierenden Tumorzellen eine Amplifikation des Her- 2/neu Gens aufwiesen (Meng S et al., 2004). Die Beobachtung, dass manche Patientinnen mit ursprünglich Her- 2/neu negativen Primärtumoren im weiteren Krankheitsverlauf hohe Serumkonzentrationen des extrazellulären Spaltproduktes p110 (siehe auch Abschnitt 4.9) aufweisen, stützt die Theorie, dass eine im Rahmen der Tumorprogression erworbene Überexpression des Her- 2/neu- Gens einen Selektionsvorteil für eine bereits im Primärtumor vorhandene Population von Zellen darstellen könnte. Unter den Kriterien des Cut- offs ist für die vorliegende Studie bei 19 Studienfällen (= 59 %) eine Konkordanz bezüglich des Her- 2/neu- Status zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase anzunehmen. Eine interessante Beobachtung war jedoch, dass immerhin 13 Studienfälle (= 41 %) mit einem Signifikanzniveau $p = 0,064$ Expressionsunterschiede in den Metastasen aufwiesen (siehe Abb. III.6 (b), (c), S. 80 und Tab. III.17; S. 81).

Bei 9 von 32 Fällen (= 28 %) konnte ein Anstieg der Her- 2/neu- Expression beobachtet werden. Besonders die Studienfälle 7 und 8, welche bereits in den Primärtumoren höhere Ratiowerte aufwiesen, zeigten in den Lymphknotenmetastasen die größten Expressionsunterschiede, die möglicherweise auf eine weitere oder aber größere Reinheit der Tumorzellpopulation hindeuten. Mäßige Anstiege hingegen konnten bei 4 Studienfällen (13, 23, 25, 30) nachgewiesen werden. An dieser Stelle sei bereits erwähnt, dass sich aus klinischer Sicht diese Fälle als besonders interessant darstellen (siehe Abschnitt 4.11; S.113). Da bei Studienfall 13 und 30 eine Zunahme der Ratio in der Lymphknotenmetastase zu beobachten und, wie bereits in Abschnitt 4.8 beschrieben, eine über Immunhistochemie routinemäßig bestimmte Her- 2/neu Negativität dieser Primärtumoren bekannt war, ist bei den Fällen 23 und 25 höchstwahrscheinlich ebenfalls von einer Her- 2/neu Positivität der Lymphknotenmetastase auszugehen, da bei diesen ähnliche Expressionsunterschiede beobachtet werden konnten (siehe oben, vgl. auch Tab. III.1; S. 56 , Abb. III.2 (d); S. 67). Bei den Studienfällen 19, 21 und 29 hingegen scheinen die Expressionsanstiege aufgrund der geringen Ratiowerte nur von geringerer Relevanz zu sein. Die Beobachtung dieser Expressionsunterschiede in metastatischen Tumorzellen scheint im Gegensatz zu anderen Arbeiten zu stehen, die die tumorbiologische Bedeutung des Her- 2/neu Proto-Onkogens eher in früheren

Krankheitsstadien vermuten (Mommers EC et al., 1998; Stark A et al., 2000; Xu R et al., 2002). Einige Arbeitsgruppen konnten unter Verwendung mit immunhistochemischer Nachweisverfahren eine Proteinüberexpression von Her- 2/neu bereits bei gering differenzierten und ausgedehnten duktalem In- situ- Karzinomen beobachten (Moreno A et al., 1997; Mack L et al., 1997). Für die Genamplifikation von Her- 2/ neu konnte auch ein Zusammenhang mit dem histopathologischen Grading invasiver Mammakarzinome hergestellt werden. So zeigte eine Untersuchung an 73 hochdifferenzierten invasiv duktalem und 67 invasiv lobulären Karzinomen, dass lediglich jeweils nur ein Studienfall eine Her- 2/neu Amplifikation aufwies (Ross JS et al., 2003). Eine relevante Herunterregulation der Her- 2/neu- Expression war im Rahmen dieser Arbeit für die beiden Studienfälle 9 und 10 nachweisbar. Die Beobachtung derartiger Fälle gibt in Übereinstimmung mit einigen Autoren einen indirekten Hinweis auf die offensichtlich fallindividuell unterschiedlichen Aufgaben von Her- 2/neu im Rahmen der Tumorprogression (Revillion F et al., 1998; Menard S et al., 2000; Klapper LN et al., 2000).

COL1A1 und COL1A2:

Bei der histologischen Reevaluierung der Studienfälle war bereits unter lichtmikroskopischer Begutachtung feststellbar, dass im Gegensatz zu den Primärtumoren die soliden metastatischen Tumorzellverbände in den Lymphknotenmetastasen ein aus morphologischer Sicht homogeneres Erscheinungsbild mit einer geringeren oder fehlenden interzellulären Ausprägung bindegewebiger stromaler Bestandteile aufwiesen. So war es keinesfalls überraschend, dass die Mehrzahl der Studienfälle in den mikrodissektierten Arealen der Lymphknotenmetastasen größtenteils eine auch wesentlich geringere Expression der mRNA von COL1A1 und COL1A2 aufwiesen. Bei 22 der 32 Studienfälle (= 69 %) war eine Herunterregulation von Col1A1 mit $p < 0,01$ zu beobachten, welche besonders bei 6 Studienfällen (9, 11, 15, 18, 23, 32) - mit bereits höherem Ausgangsniveau der Expression im Primärtumor – feststellbar war (siehe Ergebnisse, Abb. **III.2 (e)**; S. 68, Abb. **III.7 (b), (c)**, Abb. **III.18**; S. 81 f.). Analog zu COL1A1 waren bei 20 von 32 Studienfällen (= 62 %) auch für COL1A2 niedrigere Ratiowerte in den Lymphknotenmetastasen feststellbar, die am deutlichsten bei den Studienfällen 2, 9, 11, 26, 21 und 32 sichtbar wurden (siehe Ergebnisse, Abb. **III.2 (f)**; S.69, Abb. **III.8 (b), (c)** und Abb. **III.19**; S. 83 f).

Zwei Vorarbeiten berichten über eine Hochregulation der Gene COL1A1 und COL1A2 in hämatogenen Fernmetastasen bei Adenokarzinomen unterschiedlichen Ursprungs und den

Nachweis hoher Mengen von Kollagen Typ I in metastatischen Tumorabsiedlungen. (Ramaswamy S et al., 2003; Brown LF et al., 1999). Im Einklang zu diesen Autoren konnte eine weitere Untersuchung an prognostisch ungünstigen fernmetastasierten Mammakarzinomen sehr hohe Serumspiegel von Propeptiden des Kollagens Typ I feststellen, von denen vermutet wird, dass sie bei der extrazellulären Umwandlung des Prokollagen in fibrilläres Kollagen als sogenannte Registerpeptide in die Zirkulation freigesetzt werden. Allerdings konnte diese Studie auch zeigen, dass Mammakarzinome bei alleinigem metastatischem Lymphknotenbefall nur sehr niedrige Serumkonzentrationen dieses Spaltproduktes aufwiesen (Jensen BV et al., 2002). Im Einklang mit zuletzt genannter Beobachtung konnte die vorliegende Studie für die Mehrzahl der untersuchten Studienfälle zeigen, dass für die Bildung solider Tumorzellverbände innerhalb der regionären Lymphknoten die Expression von COL1A1 und COL1A2 eine geringere Rolle als in den Primärtumoren zu spielen scheint. Überraschend war jedoch auch der Expressionsnachweis in den Lymphknotenmetastasen, da die Studienfälle histologisch nur eine gering ausgeprägte Stromakomponente aufwiesen. Da die Kollagenexpression stromalen Zellen zugeschrieben wird, befanden sich unter den mikrodissektierten Arealen der Primärtumoren dem Anschein nach auch Zellen mesenchymaler Herkunft, welche im Mikro- Milieu der epithelialen Tumorzellen für die fibroproliferative Reaktion verantwortlich gemacht werden können. Dieses Erkenntnis ist nicht unerwartet, wird doch in der Literatur, wie bereits erwähnt, aktivierten und abnormalen Myofibroblasten im Rahmen epithelialer-mesenchymaler Wechselwirkungen eine wichtige Aufgabe bei der Schaffung geeigneter Bedingungen, die den Primärtumorzellen invasives Wachstum und Metastasierung ermöglichen sollen, zugesprochen (Ronnov- Jessen L et al., 1995; Gregoire M et al., 1995).

Erwähnt werden sollte, dass bei der Untersuchung von COL1A1 (4 Studienfälle) und COL1A2 (3 Studienfälle) auch eine höhere mRNA der beiden Gene in den Lymphknotenmetastasen gefunden werden konnte. Da sich diese Veränderungen aber durchwegs auf einem niedrigen Wertenniveau bewegten, erscheint eine biologische Bedeutung dieser Beobachtung unwahrscheinlich, so dass eine Interpretation dieser Expressionsänderungen irrelevant erscheint.

4.11 Klinische Aspekte

Das Her- 2/neu Proto-Onkogen und sein Genprodukt, das Her- 2/neu Protein, werden aufgrund ihrer prognostischen Aussagekraft, die eine Identifikation von Patientinnen mit erhöhtem Risiko einer lymphogenen oder hämatogenen Metastasierung ermöglichen soll, für die Behandlung des Mammakarzinoms immer bedeutsamer. Zudem besteht mit dem therapeutischen Einsatz des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin™) die Möglichkeit, direkten Einfluß auf die Prognose Her- 2/neu positiver Tumore zu nehmen. Eine Vielzahl klinischer Studien konnte zeigen, dass Patientinnen mit fortgeschrittenem metastasiertem Mammakarzinom durch eine alleinige oder mit anderen Chemotherapeutika kombinierte Verabreichung von Trastuzumab (Herceptin™) höhere chemotherapeutische Anspruchsraten bei längerer Remissionsdauer, verbesserten Überlebensraten und einer Senkung des Mortalitätsrisiko aufweisen (Slamon DJ et al., 2001, Vogel C et al., 2001).

Zudem deuten neuere Arbeiten darauf hin, dass auch in der neoadjuvanten oder adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms der Einsatz von Trastuzumab (Herceptin™) in der Zukunft Erfolge erzielen könnte.

Jedoch bleibt kritisch anzumerken, dass neben dem klinischen Nutzen eine derartige Therapie auch mit Risiken verbunden ist. Zu den am meisten beschriebenen Nebenwirkungen von Trastuzumab (Herceptin™) zählt eine erhöhte Kardiotoxizität, die vor allem bei älteren Patientinnen beobachtet werden kann. Nicht zuletzt auch aufgrund der hohen Behandlungskosten erfordert der Einsatz von Trastuzumab (Herceptin™) eine strenge Indikationsstellung im Rahmen einer individuellen Therapieplanung.

Derzeit herrscht im klinischen Rahmen nicht nur im Hinblick auf die angemessene Bestimmungsmethodik, sondern auch bei der Wahl des Bestimmungsortes des Her- 2/neu Status noch Uneinigkeit.

In der klinischen Praxis stellt derzeit lediglich die Bestimmung des Her- 2/neu Status mittels Immunhistochemie am Probenmaterial von Primärtumoren eine routinemäßige Vorgehensweise dar. Da in der Literatur in großer Mehrheit von einer Konkordanz des Her- 2/Status zwischen Primärlokalisierung und metastatischen Tumorabsiedlungen ausgegangen wird, findet nur selten eine spätere Biopsie und Bestimmung an metastatischem Gewebe statt, die eine eventuelle De- novo- Überexpression des Her- 2/neu Proto-Onkogens aufdecken könnte. Dennoch belegen einige Vorarbeiten und die vorliegende Studie, dass der Her- 2/neu- Status eines Primärtumors und synchroner regionärer Lymphknotenmetastasen nicht zwangsläufig als identisch vorausgesetzt werden sollte.

Diese Arbeit dürfte die erste ihrer Art sein, die eine vergleichende Untersuchung der Expression von mRNA des Her- 2/neu Proto-Onkogens an primären Mammakarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen mithilfe einer RT- PCR durchführte. Die bei 41 % der gesamten Studiengruppe beobachteten Expressionsunterschiede der mRNA des Her- 2/neu Proto-Onkogens könnten durchaus praktische therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen. So sprechen möglicherweise 4 Studienfälle (13, 23, 25, 30) der vorliegenden Arbeit dafür, dass Patientinnen mit einem Her- 2/neu negativem Primärtumor nicht einer Therapie mit Trastuzumab (Herceptin™) zugeführt werden, obwohl sie aufgrund der Her- 2/neu Positivität ihrer Lymphknotenmetastase möglicherweise davon hätten profitieren können. Bei den Studienfällen 13 und 25 wurde im weiteren Krankheitsverlauf eine Fernmetastasierung diagnostiziert. Da dem Anschein nach die Primärtumore dieser Studienfälle eine oder mehrere Zell-populationen mit höherer Her- 2/neu- Expression beinhalten, wäre eventuell - geht man von einem Selektionsvorteil Her- 2/neu positiver Zellen bei der Metastasierung aus - die Gabe von Trastuzumab (Herceptin™) sinnvoll gewesen. Bei 2 Studienfällen (7, 8), von denen die immunhistochemisch bestimmte Her-2/neu Positivität eines Primärtumors (Studienfall 7) bekannt war, liegen aufgrund der starken Hochregulation der mRNA Expression in den Lymphknotenmetastasen möglicherweise in den Primärtumoren dieser Fälle unterschiedliche genomische Mutationen (z.B. Polysomie, Genamplifikation) vor, welche jedoch ebenfalls unter Umständen unterschiedliche therapeutische Anspruchsraten in sich bergen könnten.

Andererseits könnte die Herunterregulation der Her- 2/neu- Ratio der Studienfälle 9 und 10 in den Metastasen einen möglichen Grund für ein Therapieversagen von Trastuzumab (Herceptin™) darstellen. So konnte eine Studie an Chemotherapie- resistenten metastasierten Her-2/neu positiven Mammakarzinomen nur eine Anspruchsrate von 25 % gegenüber Trastuzumab (Herceptin™) nachweisen (Pegram MD et al., 1993). Eine andere Arbeit konnte in einer Teilstudiengruppe anhand einer FISH-Analyse bei 3 von 31 (= 6,5 %) Fällen eine Her- 2/neu Positivität regionärer Lymphknotenmetastasen bei negativem Primärtumor belegen (Simon R et al., 2001). Da eine derartige Beobachtung solcher Fälle aber anscheinend relativ selten ist, können derartige Fälle der Diskordanz der Her- 2/neu Expression höchstwahrscheinlich nicht als Hauptursache für diese hohe Rate von Therapieversagen herangezogen werden.

In der klinischen Praxis sollte die alleinige Bestimmung des Her- 2/neu Status am Primärtumorgewebe aufgrund dieser Daten überdacht werden. Die Dissektion der axillären Lymphknoten stellt einen Teil der primär chirurgischen Therapie dar. Somit steht Paraffinmaterial von Lymphknotenmetastasen ausreichend zur Verfügung, das ohne größeren

Aufwand einer Her- 2/neu Bestimmung auch zu einem späteren Zeitpunkt zugänglich ist. Hierbei sollte die Bestimmung des Her- 2/neu Status an mehreren befallenen Lymphknoten erfolgen, um das Risiko einer eventuell vorhandenen partiellen Diskordanz zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen, wie sie in der Literatur beschrieben wurde, zu vermindern (Simon R et al., 2001). Möglicherweise könnten sich dadurch für die betroffenen Patientinnen - unabhängig vom jeweiligen Krankheitsstadium - durch einen indirekten Nachweis der Präsenz vereinzelter Her- 2/neu positiver Zellen im Primärtumor, die derzeit der Routinediagnostik noch entgehen, die bereits beschriebenen therapeutischen Konsequenzen ergeben.

4.12 Fazit

Die vorgelegte Studie an 32 nodal positiven Mammakarzinomen legt dar, dass es sich bei den Tumorzellen innerhalb eines invasiven Primärtumors keineswegs um eine einheitliche Population von Zellen handelt (Intratumorale Heterogenität). So konnte bei 23 von 32 (73 %) untersuchten Mammakarzinomen mit dem Nachweis von mRNA Expressionsunterschieden metaserelevanter Gene in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen gezeigt werden, dass metastatische Tumorzellen sich von der Mehrzahl der im Primärtumor vorhandenen Tumorzellen unterscheiden lassen. Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die genotypischen Voraussetzungen der zellulären Metastasierungsfähigkeit nur einer Minderheit von Zellen innerhalb eines Primärtumors vorbehalten bleibt. Da maligne Zellen eines Tumors mit zunehmender Dauer eine Vielzahl von genetischen Veränderungen zeigen und der genetisch instabile Tumorzellklon, wie aus In- vitro- und In- vivo- Untersuchungen bekannt ist, zunehmend zu weiteren Alterationen neigt, könnte ein geändertes Expressionsverhalten der untersuchten Gene - resultierend in unterschiedlichen mRNA Mengen auf Transkriptionsebene - einen Selektionsvorteil dieser Tumorzellen bei der lymphogenen Metastasierung widerspiegeln (Yokota J, 2000). Im Einklang mit einer aktuelleren Vorarbeit ist somit höchstwahrscheinlich davon auszugehen, dass die phänotypischen Eigenschaften für die Metastasierung durch molekulargenetische Veränderungen gemäß dem Tumorprogressionsmodell erst zu einem späteren Zeitpunkt erworben werden (Kang Y et al., 2003). Große Aufmerksamkeit konnten in den letzten Jahren einige Vorarbeiten erlangen, denen mit Hilfe der Microarray-Technik bei ihren Untersuchungen am Mammakarzinom die Identifizierung bestimmter genetischer Signaturen in Primärtumoren gelang, die dem Anschein nach prognostische Bedeutung besitzen (Van't Veer LJ et al., 2003; Van de Vijver

MJ et al., 2002; Ramaswamy S et al., 2003). Zweifelsohne besitzen diese Arbeiten großen Wert, da derartige komplexe Gensignaturen möglicherweise in der Zukunft bei der individuellen Risikostratifizierung hilfreich sein könnten. Daher war die Mehrzahl der molekulargenetischen Studien in den letzten Jahren stark klinisch ausgerichtet, wobei mit Hilfe leistungsstarker neuer Analyseverfahren eine große Zahl neuer onkogenetischer Tumormarker gewonnen werden konnte, deren genaue tumorbiologische Bedeutung für den Metastasierungsvorgang jedoch bislang größtenteils unbekannt ist. Möglicherweise spiegelt die Analyse des durchschnittlichen Expressionsverhaltens von onkogenen Tumormarkern in Primärtumoren deren Metastasierungspotential wider; für die Entdeckung genauerer prognostischer Faktoren und möglicherweise neuer biologischer Therapieansätze kommt jedoch der Erforschung kausaler genetischer Veränderungen eine zentrale Rolle zu (Hunter K et al., 2003). Obwohl die molekulargenetischen Ursachen der Metastasierung in den letzten Jahren im Mittelpunkt der onkologischen Forschung standen, sind bislang nur wenig gesicherte Erkenntnisse vorhanden und die Untersuchungsergebnisse vieler Arbeiten oftmals widersprüchlich.

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten genetischen Marker bleibt abschließend anzumerken, dass die Hochregulation der mRNA Expression von ADAM 17 in einigen Lymphknotenmetasen - wenn auch nur in geringer Fallzahl (5 von 32 Studienfälle) beobachtet - sich aus biologischer Sicht am eindeutigsten darstellte. Weitergehende Untersuchungen an ADAM 17 sollten, unter Berücksichtigung dieser scheinbaren Expressionsheterogenität, diese vermutete Rolle untermauern, da hieraus möglicherweise für die Zukunft, beispielsweise durch Entwicklung eines Antikörpers, ein neuartiger therapeutischer Ansatz entstehen könnte, der durch eine direkte Beeinflussung biologischer Tumoreigenschaften die Metastasierung des Tumors verhindern könnte. Besonders interessant erscheint dieser Ausblick nicht zuletzt aufgrund der Beobachtung eines möglichen funktionellen Zusammenhangs mit dem Her- 2/neu Proto-Onkogen, der vielleicht in Zukunft für eine effizientere Behandlung Her-2/neu positiver Tumore genutzt werden könnte (siehe Abschnitt **4.10**; S. 106 ff.).

4.13 Noch ungeklärte Fragen

Über die prognostische Bedeutung der untersuchten Gene kann die vorliegende Arbeit keine Aussage treffen. Dies ist zum einen auf die retrospektive Ausrichtung der Untersuchung mit einer relativ geringen Fallzahl und unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen, zum anderen auf das Fehlen eines geeignet großen Vergleichskollektivs nodal-negativer Mammakarzinome

zurückzuführen. Während für Her- 2/neu der prognostische Wert bei nodal positiven Mammakarzinomen als gesichert gilt, liegen für die Onkogene ADAM 17 und AXL bislang keine nennenswerten klinischen Daten vor. Auch für LMNB1 und die stromal exprimierten Gene Col1A1 und Col1A2, auf deren prognostischen Wert eine Vorarbeit erste Hinweise geben konnte, ist eine weitere Evaluation erforderlich. Dies sollte nach einer von McGuire und Hayes beschriebenen Vorgehensweise erfolgen (siehe Anhang 7.4; S. 142) (McGuire WL, 1991; Hayes DF, 2001). Das bei dieser Arbeit festgestellte unterschiedliche Expressionsverhalten der untersuchten Gene in den analysierten 32 Primärtumoren gibt jedoch einen Einblick in die molekulargenetische Variabilität des Mammakarzinoms. So ist durchaus vorstellbar, dass die unterschiedliche Expression der untersuchten Gene unterschiedliche tumorbiologische Eigenschaften, die Einfluß auf den klinischen Krankheitsverlauf nehmen, widerspiegelt.

Ferner ist unklar, inwiefern das Verfahren der quantitativen Genexpressionsanalyse, basierend auf dem Nachweis unterschiedlicher mRNA Kopiezahlen, geeignet ist, klinische Vorhersagen zu treffen. Für das Her- 2/neu Protoonkogen beispielsweise scheint die mit der RT- PCR Technik gemessene Expression von mRNA mit der aus prognostischer Sicht wichtigen Genamplifikation des Her- 2/neu zu korrelieren (Ross JS et al., 2003).

Die vorliegende Arbeit konnte zwar bei einem Teil der Studienfälle einen Hinweis geben, dass für das molekulargenetische Verständnis der lymphogenen Metastasierung die Berücksichtigung spezifischer genetischer Veränderungen von einzelnen Zellpopulationen unerlässlich ist; jedoch ist auch zu erwähnen, dass bei der Einzelbeobachtung der 4 epithelial exprimierten Gene bei einem beträchtlichem Teil der Studienfälle keine Expressionsunterschiede in den Lymphknotenmetastasen aufgedeckt werden konnten (ADAM 17: 84 %; AXL: 63 %; LMNB1: 69 %; Her- 2/neu: 59 %). Da bei allen Studienfällen eine lichtmikroskopisch gestützte Auswahl möglichst großer Tumorzellverbände durchgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei diesen Studienfällen kleinere Zellpopulationen in den Ursprungsgewebe mit differentem Expressionsverhalten vorhanden waren. Möglicherweise spielen jedoch auch die ausgewählten Gene bei diesen Studienfällen hinsichtlich der Metastasierung keine entscheidende Rolle.

Auch bei den Studienfällen mit beobachtbaren Expressionsunterschieden bleiben wichtige Fragen noch offen. So bleibt der Einfluß von AXL, LMNB1 und Her- 2/neu auf den Metastasierungsprozess aufgrund der teilweise gegensätzlichen Expressionsunterschiede in den Lymphknotenmetastasen ungewiß. Zwar erlaubt die Expressionsänderung eines Gens einerseits zwar Spekulationen über die Änderung phänotypischer Zelleigenschaften,

andererseits ist aber zu bedenken, daß die Expression einzelner Gene auf DNA Ebene vermutlich einer Vielzahl positiv und negativ regulatorisch wirksamer Einflüsse unterworfen ist (Liotta LA et al., 1991), über die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur spekuliert werden kann. Dies könnte eine Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Beobachtungen darstellen.

Zudem kann diese Studie keine Aussagen über eventuelle Vorgänge einer posttranskriptionalen und posttranslationalen Prozessierung treffen, welche über intra- und extrazelluläre Faktoren die biologische Proteinaktivität steuern. Hierbei ist anzunehmen, dass hierfür auch Bindegewebszellen im Mikro- Milieu der Tumorzellen mitverantwortlich sind. Auf welche Weise dies geschehen könnte, ist allerdings bislang weitgehend unbekannt.

Abschließend bleibt anzumerken, dass das Verständnis der molekulargenetischen Grundlagen der lymphogenen Metastasierung erst am Anfang steht. Mithilfe der modernen Microarray-Technik steht mittlerweile eine Technik zur Verfügung, mit der eine Identifizierung beteiligter Gene erfolgen könnte.

5. Zusammenfassung

Bei Mammakarzinomen handelt es sich aus klinischer, morphologischer und genetischer Hinsicht um eine stark heterogene Gruppe von Erkrankungen. Aus prognostischer und therapeutischer Sicht ist der morphologische Nachweis eines metastatischen Tumorbefalls der axillären Lymphknoten von großer Bedeutung. Über die molekulargenetischen Veränderungen, die für die Entstehung metastasierungsfähiger Tumorzellen aus einem Primärtumor verantwortlich gemacht werden können, herrscht jedoch derzeit in der Literatur noch Uneinigkeit. Insbesondere über das Expressionsverhalten spezifischer Gene in Primärtumoren und axillären Lymphknotenmetastasen ist wenig bekannt. Für die Untersuchungen fand im Vorfeld der Arbeit eine Auswahl von sechs Genen statt, über deren Bedeutung im Rahmen des Metastasierungsvorgangs in den letzten Jahren spekuliert wurde. Zur Untersuchung kamen ADAM 17 (Metalloprotease), AXL (Rezeptortyrosinkinase), LMNB1 (Intermediärfilament), Her- 2/neu (Rezeptortyrosinkinase) und die stromal exprimierten Gene COL1A1 und COL1A2 (Kollagen Typ I).

Die Hauptzielsetzung der vorliegenden Dissertation bestand darin, mittels einer vergleichenden quantitativen Genexpressionsanalyse zu klären, ob für diese molekularen Marker Unterschiede im mRNA Expressionsverhalten in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen aufgedeckt werden können.

Hierzu erfolgte zuerst eine ausführliche Suche nach geeignetem archiviertem, in Paraffin eingebettetem Gewebematerial von Primärtumorgewebe und den dazugehörigen axillären Lymphknotenmetastasen nodal positiver Mammakarzinome. Bei den hierbei gefundenen Fällen wurden nach Durchsicht der klinischen und histopathologischen Daten alle Patientinnen mit malignen Begleiterkrankungen oder einer bekannten Fernmetastasierung ausgeschlossen. Im Anschluß fand eine histologische Reevaluation aller Fälle statt. Insgesamt blieben 32 Studienfälle übrig, bei denen es sich überwiegend um nodal positive G 2 und G3 Mammakarzinome vom invasiv duktalem Typ handelte. Nach manueller Herstellung von Schnittpräparaten mit dem Mikrotom schloss sich eine Entparaffinierung basierend auf ab- und ansteigenden Alkoholreihen mit kurzer Hämalan- Gegenfärbung an. Um eine Isolierung von Tumorzellverbänden aus den Gewebsschnitten zu erreichen, kam die Laser Capture Mikodissektion (LCM) zum Einsatz, lediglich bei 2 Studienfällen wurde eine manuelle Mikrodissektion durchgeführt. Nach Durchführung einer RNA-Extraktion der mikrodisssektierten Tumorzellen fand eine Amplifikation der ausgewählten Zielsequenzen und des Haushaltgens TBP jeweils beider Tumorlokalisationen mittels RT- PCR mit

entsprechenden Primer-Probe Sets (Assays on demand) statt. Alle Abschnitte des praktischen Teils wurden anhand evaluierter Versuchsprotokolle unter RNasen freien Arbeitsbedingungen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach dem Prinzip der Berechnung der relativen Genexpression der einzelnen Marker im Verhältnis zu einem Haushaltsgen. Bei jeweils 2 Studienfällen sprachen die hohen Ct- Werte der untersuchten Zielsequenzen und des Haushaltsgens TBP in Primärtumor und Lymphknotenmetastase für eine schlechtere Nukleinsäurequalität. Da hierdurch aber kein direkter Einfluß auf die Mittelwertverhältnisse bestand, wurden auch diese Studienfälle in die Auswertung miteinbezogen.

Für die untersuchten molekularen Marker konnten innerhalb der Studiengruppe in den Primärtumoren unterschiedliche mRNA Mengen nachgewiesen werden, wodurch Hinweise auf eine mögliche fallindividuell unterschiedliche pathophysiologische Bedeutung der einzelnen Gene gewonnen werden konnten. Auffällig war hierbei, dass die Primärtumoren einer Untergruppe von 5 Studienfällen neben einer höheren Her- 2/neu Expression auch hohe mRNA Mengen von ADAM 17 aufwiesen. Diese Beobachtung ist möglicherweise als Ausdruck einer gesteigerten proteolytischen Aktivität Her- 2/neu exprimierender Mammakarzinome zu werten.

Für die vergleichende Expressionsanalyse von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen wurde für die gesamte Studiengruppe ein Cut- off festgelegt, um aus biologischer Sicht relevante Expressionsunterschiede aufdecken zu können. Vorliegende Studie konnte zeigen, daß die bei 5 Studienfällen beobachtete Hochregulation von ADAM 17 in den Lymphknotenmetastasen im Rahmen der Metastasierung einen Selektionsvorteil für Tumorzellen widerspiegeln könnte. Weniger eindeutig stellten sich die Expressionsunterschiede bei AXL und LMNB1 dar. So spricht das mithilfe des Cut- offs bereinigte Datenmaterial dieser Studie sowohl bei AXL aufgrund der bei der Mehrzahl der Studienfälle beobachteten Herunterregulation (10 von 12 Fällen) als auch bei LMNB1, das möglicherweise aufgrund der bislang unverstandenen Regulation der Genaktivität keine einheitliche Tendenz der Expressionsänderungen erkennen lassen konnte, gegen eine Beteiligung am Metastasierungsprozess. Ferner konnte bei 13 von 32 Studienfällen für das Her- 2/neu Protoonkogen gezeigt werden, dass die mRNA Expression in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen nicht zwangsläufig gleichgesetzt werden sollte. Bei 4 von 9 Studienfällen, bei denen Expressionsanstiege beobachtet werden konnten, ist höchstwahrscheinlich von einer Her- 2/neu Positivität der Lymphknotenmetastasen bei Her- 2/neu negativen Primärtumoren auszugehen. Bei 2 von 4 Studienfällen lag in den Lymphknotenmetastasen eindeutig eine geringere relative Genexpression vor. Derartige Diskordanzen bezüglich des Her-2/neu Status könnten in den

nächsten Jahren klinische Auswirkungen bei Diagnose und Therapie Her- 2/neu positiver Mammakarzinome erlangen.

Die beobachteten Expressionsunterschiede in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen sprechen demnach dafür, dass es sich bei den Tumorzellen eines Primärtumors um eine heterogene Zellpopulation handelt. Die Fähigkeit zur Metastasierung bleibt dem Anschein nach nur einer Minderheit von Tumorzellen eines Primärtumors vorbehalten, welche durch zusätzliche genetische Alterationen die phänotypischen Voraussetzungen zur Metastasenbildung erlangen.

6. Literaturverzeichnis

Ahr A., Holtrich U., Solbach C., Scharl A., Strebhardt K., Karn T. & Kaufmann M. (2001) Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. *J Pathol*, 195: 312.

Albain K.S., Allred D.C. & Clark G.M. (1994) Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr*, 35.

Allred D.C., Clark G.M., Tandon A.K., Molina R., Tormey D.C., Osborne C.K., Gilchrist K.W., Mansour E.G., Abeloff M., Eudey L. & et al. (1992) HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol*, 10: 599.

American Joint Committee on cancer (2000) AJCC Cancer staging handbook, breast, 5th edn Vol.1. Fleming I., Cooper J., Henson D., Hutter R., Kennedy B.J., Murphy B. (eds.). Lippincott-Raven. Philadelphia.

Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J., Baughman S., Benz C.C., Dantis L., Sklarin N.T., Seidman A.D., Hudis C.A., Moore J., Rosen P.P., Twaddell T., Henderson I.C. & Norton L. (1996) Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 14: 737.

Bernards R. & Weinberg R.A. (2002) A progression puzzle. *Nature*, 418: 823.

Bieche I. & Lidereau R. (1995) Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 14: 227.

Bieche I., Onody P., Laurendeau I., Olivi M., Vidaud D., Lidereau R. & Vidaud M. (1999) Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem*, 45: 1148.

Bishop J.M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64: 235.

Black R.A., Durie F.H., Otten-Evans C., Miller R., Slack J.L., Lynch D.H., Castner B., Mohler K.M., Gerhart M., Johnson R.S., Itoh Y., Okada Y. & Nagase H. (1996) Relaxed specificity of matrix metalloproteinases (MMPS) and TIMP insensitivity of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production suggest the major TNF-alpha converting enzyme is not an MMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 225: 400.

Black R.A. & White J.M. (1998) ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 654.

Blanks R.G., Moss S.M., McGahan C.E., Quinn M.J. & Babb P.J. (2000) Effect of NHS breast screening programme on mortality from breast cancer in England and Wales, 1990-8: comparison of observed with predicted mortality. *Bmj*, 321: 665.

Bloom H.J. & Richardson W.W. (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, 11: 359.

- Bonner R.F., Emmert-Buck M., Cole K., Pohida T., Chuaqui R., Goldstein S. & Liotta L.A. (1997) Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, 278: 1481.
- Bonsing B.A., Devilee P., Cleton-Jansen A.M., Kuipers-Dijkshoorn N., Fleuren G.J. & Cornelisse C.J. (1993) Evidence for limited molecular genetic heterogeneity as defined by allelotyping and clonal analysis in nine metastatic breast carcinomas. *Cancer Res*, 53: 3804.
- Borrell-Pages M., Rojo F., Albanell J., Baselga J. & Arribas J. (2003) TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *Embo J*, 22: 1114.
- Braunger J., Schleithoff L., Schulz A.S., Kessler H., Lammers R., Ullrich A., Bartram C.R. & Janssen J.W. (1997) Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene*, 14: 2619.
- Brinckerhoff C.E. & Matrisian L.M. (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 207.
- Broers J.L., Machiels B.M., Kuijpers H.J., Smedts F., van den Kieboom R., Raymond Y. & Ramaekers F.C. (1997) A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol*, 107: 505.
- Brown L.F., Guidi A.J., Schnitt S.J., Van De Water L., Iruela-Arispe M.L., Yeo T.K., Tognazzi K. & Dvorak H.F. (1999) Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*, 5: 1041.
- Burchert A., Attar E.C., McCloskey P., Fridell Y.W. & Liu E.T. (1998) Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 16: 3177.
- Burke H.B., Hoang A., Iglehart J.D. & Marks J.R. (1998) Predicting response to adjuvant and radiation therapy in patients with early stage breast carcinoma. *Cancer*, 82: 874.
- Busmanis I., Feleppa F., Jones A., McGrath K.M., Reed R., Collins J., Russell I. & Begley C.G. (1994) Analysis of cerbB2 expression using a panel of 6 commercially available antibodies. *Pathology*, 26: 261.
- Cance W.G., Craven R.J., Weiner T.M. & Liu E.T. (1993) Novel protein kinases expressed in human breast cancer. *Int J Cancer*, 54: 571.
- Cardoso F., Di Leo A., Larsimont D., Gancberg D., Rouas G., Dolci S., Ferreira F., Paesmans M. & Piccart M. (2001) Evaluation of HER2, p53, bcl-2, topoisomerase II-alpha, heat shock proteins 27 and 70 in primary breast cancer and metastatic ipsilateral axillary lymph nodes. *Ann Oncol*, 12: 615.
- Carr I. (1983) Lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 2: 307.
- Carter C.L., Allen C. & Henson D.E. (1989) Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 63: 181.
- Cavallaro U. & Christofori G. (2001) Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta*, 1552: 39.

- Chambers A.F. & Wilson S. (1988) Use of NeoR B16F1 murine melanoma cells to assess clonality of experimental metastases in the immune-deficient chick embryo. *Clin Exp Metastasis*, 6: 171.
- Chambers A.F. & Tuck A.B. (1988) Oncogene transformation and the metastatic phenotype. *Anticancer Res*, 8: 861.
- Chambers A.F., Groom A.C. & MacDonald I.C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2: 563.
- Chen L.C., Kurisu W., Ljung B.M., Goldman E.S., Moore D., 2nd & Smith H.S. (1992) Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 84: 506.
- Christianson T.A., Doherty J.K., Lin Y.J., Ramsey E.E., Holmes R., Keenan E.J. & Clinton G.M. (1998) NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res*, 58: 5123.
- Clark G.M. & McGuire W.L. (1991) Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res*, 51: 944.
- Clark G.M. (1994) Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*, 30: 117.
- Clark G.M. (1996) Prognostic and predictive factors: Diseases of breast. Harris J.R., Lippman M.E, Morrow M., Hellmann S. (ed). Lippincott- Raven Publishers. Philadelphia.
- Clark E.A., Golub T.R., Lander E.S. & Hynes R.O. (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, 406: 532.
- Cobleigh M.A, Vogel C.L, Tripathy D. (1998) Efficacy and safety of Herceptin (humanized antibody) as a single agent in 222 women with Her2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 17: 97a.
- Codony-Servat J., Albanell J., Lopez-Talavera J.C., Arribas J. & Baselga J. (1999) Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res*, 59: 1196.
- Connelly P.A. & Stern D.F. (1990) The epidermal growth factor receptor and the product of the neu protooncogene are members of a receptor tyrosine phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 6054.
- Contesso G., Mouriessse H., Friedman S., Genin J., Sarrazin D. & Rouesse J. (1987) The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol*, 5: 1378.
- Craven R.J., Xu L.H., Weiner T.M., Fridell Y.W., Dent G.A., Srivastava S., Varnum B., Liu E.T. & Cance W.G. (1995) Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer*, 60: 791.

- Craven R.J., Lightfoot H. & Cance W.G. (2003) A decade of tyrosine kinases: from gene discovery to therapeutics. *Surg Oncol*, 12: 39.
- Dalton L.W., Pinder S.E., Elston C.E., Ellis I.O., Page D.L., Dupont W.D. & Blamey R.W. (2000) Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement. *Mod Pathol*, 13: 730.
- Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (2003) Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms der Frau. Mannheim.
- Di Fiore P.P., Pierce J.H., Kraus M.H., Segatto O., King C.R. & Aaronson S.A. (1987) erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, 237: 178.
- Di Giovanna M.P. (1999) Clinical significance of Her-2/neu overexpression: Part I. Rosenberg S.A. (ed.): Principles and practice of oncology updates (vol 13, no 9). Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Dowsett M. (2001) Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 8: 191.
- Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. & Trent J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 21: 10.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 351: 1451.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998). Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 352: 930.
- Easton D.F., Bishop D.T., Ford D. & Crockford G.P. (1993) Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 52: 678.
- Eccles S.A. (2001) The role of c-erbB-2/Her2/neu in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 4: 393.
- Edgerton S.M., Moore D., 2nd, Merkel D. & Thor A.D. (2003) erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 11: 214.
- Elston C.W. & Ellis I.O. (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19: 403.
- Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D., Chuaqui R.F., Zhuang Z., Goldstein S.R., Weiss R.A. & Liotta L.A. (1996) Laser capture microdissection. *Science*, 274: 998.
- Engel J., Schmidt M., Schubert-Fritschle D., Tretter W., Hölzel D. (2000) Jahresbericht 1999 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum München. Zuckschwerdt-Verlag. München, Bern, Wien, New York.

- Fend F. & Raffeld M. (2000) Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol*, 53: 666.
- Fidler I.J. (1973) Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol*, 242: 148.
- Fidler I.J. & Kripke M.L. (1977) Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197: 893.
- Fidler I.J. (1978) Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*, 38: 2651.
- Fidler I.J. & Hart I.R. (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*, 217: 998.
- Fisher B. & Gebhardt M.C. (1978) The evolution of breast cancer surgery: past, present, and future. *Semin Oncol*, 5: 385.
- Fisher B., Bauer M., Wickerham D.L., Redmond C.K., Fisher E.R., Cruz A.B., Foster R., Gardner B., Lerner H., Margolese R. & et al. (1983) Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*, 52: 1551.
- Foisner R. & Gerace L. (1993) Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell*, 73: 1267.
- Foulds L. (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res*, 14: 327.
- Gancberg D., Di Leo A., Cardoso F., Rouas G., Pedrocchi M., Paesmans M., Verhest A., Bernard-Marty C., Piccart M.J. & Larsimont D. (2002) Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol*, 13: 1036.
- Gibson U.E., Heid C.A. & Williams P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6: 995.
- Gilchrist K.W., Kalish L., Gould V.E., Hirschl S., Imbriglia J.E., Levy W.M., Patchefsky A.S., Penner D.W., Pickren J., Roth J.A. & et al. (1985) Interobserver reproducibility of histopathological features in stage II breast cancer. An ECOG study. *Breast Cancer Res Treat*, 5: 3.
- Gillespie J.W., Ahram M., Best C.J., Swalwell J.I., Krizman D.B., Petricoin E.F., Liotta L.A. & Emmert-Buck M.R. (2001) The role of tissue microdissection in cancer research. *Cancer J*, 7: 32.
- Gjerdrum L.M., Sorensen B.S., Kjeldsen E., Sorensen F.B., Nexø E. & Hamilton-Dutoit S. (2004) Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn*, 6: 42.
- Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., Loh M.L., Downing J.R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D. & Lander E.S. (1999) Molecular

classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531.

Gong Y., Booser D.J. & Sneige N. (2005) Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 103: 1763.

Graus-Porta D., Beerli R.R., Daly J.M. & Hynes N.E. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J*, 16: 1647.

Gregoire M. & Lieubeau B. (1995) The role of fibroblasts in tumor behavior. *Cancer Metastasis Rev*, 14: 339.

Haffty B.G., Brown F., Carter D. & Flynn S. (1996) Evaluation of HER-2 neu oncoprotein expression as a prognostic indicator of local recurrence in conservatively treated breast cancer: a case-control study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 35: 751.

Halvorsen T.B. & Seim E. (1989) Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol*, 42: 162.

Hanahan D. & Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57.

Harris L.N, Trock B., Berris M., Esteva- Lorenzo F., Paik S. (1996) The role of ERBB2 extracellular domain in predicting response to chemotherapy in advanced breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 15: 96

Hart I.R. & Fidler I.J. (1980) Cancer invasion and metastasis. *Q Rev Biol*, 55: 121.

Hart I.R. & Fidler I.J. (1981) The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology of cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 651: 37.

Hayes D.F., Bast R.C., Desch C.E., Fritsche H., Jr., Kemeny N.E., Jessup J.M., Locker G.Y., Macdonald J.S., Mennel R.G., Norton L., Ravdin P., Taube S. & Winn R.J. (1996) Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*, 88: 1456.

Hayes D.F., Isaacs C. & Stearns V. (2001) Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6: 375.

Hedenfalk I., Duggan D., Chen Y., Radmacher M., Bittner M., Simon R., Meltzer P., Gusterson B., Esteller M., Kallioniemi O.P., Wilfond B., Borg A. & Trent J. (2001) Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med*, 344: 539.

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. & Williams P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6: 986.

Heppner G.H., Miller B.E. & Miller F.R. (1983) Tumor subpopulation interactions in neoplasms. *Biochim Biophys Acta*, 695: 215.

- Heppner K.J., Matrisian L.M., Jensen R.A. & Rodgers W.H. (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol*, 149: 273.
- Hilsenbeck S.G., Ravdin P.M., de Moor C.A., Chamness G.C., Osborne C.K. & Clark G.M. (1998) Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 52: 227.
- Hudziak R.M., Schlessinger J. & Ullrich A. (1987) Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 7159.
- Hudziak R.M., Lewis G.D., Winget M., Fendly B.M., Shepard H.M. & Ullrich A. (1989) p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol*, 9: 1165.
- Hung M.C. & Lau Y.K. (1999) Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol*, 26: 51.
- Hunter K., Welch D.R. & Liu E.T. (2003) Genetic background is an important determinant of metastatic potential. *Nat Genet*, 34: 23.
- Hynes R.O. (2003) Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both? *Cell*, 113: 821.
- Ito T., Ito M., Naito S., Ohtsuru A., Nagayama Y., Kanematsu T., Yamashita S. & Sekine I. (1999) Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid*, 9: 563.
- Jacob A.N., Kalapurakal J., Davidson W.R., Kandpal G., Dunson N., Prashar Y. & Kandpal R.P. (1999) A receptor tyrosine kinase, UFO/Axl, and other genes isolated by a modified differential display PCR are overexpressed in metastatic prostatic carcinoma cell line DU145. *Cancer Detect Prev*, 23: 325.
- Jacobs T.W., Prioleau J.E., Stillman I.E. & Schnitt S.J. (1996) Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 88: 1054.
- Jensen B.V., Johansen J.S., Skovsgaard T., Brandt J. & Teisner B. (2002) Extracellular matrix building marked by the N-terminal propeptide of procollagen type I reflect aggressiveness of recurrent breast cancer. *Int J Cancer*, 98: 582.
- Jimenez R.E., Wallis T., Tabasczka P. & Visscher D.W. (2000) Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*, 13: 37.
- Kang Y., Siegel P.M., Shu W., Drobnjak M., Kakonen S.M., Cordon-Cardo C., Guise T.A. & Massague J. (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3: 537.

Kerbel R.S. (1979) Implications of immunological heterogeneity of tumours. *Nature*, 280: 358.

Klapper L.N., Kirschbaum M.H., Sela M. & Yarden Y. (2000) Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res*, 77: 25.

Kripke M.L., Gruys E. & Fidler I.J. (1978) Metastatic heterogeneity of cells from an ultraviolet light-induced murine fibrosarcoma of recent origin. *Cancer Res*, 38: 2962.

Lacroix H., Iglehart J.D., Skinner M.A. & Kraus M.H. (1989) Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. *Oncogene*, 4: 145.

Land H., Parada L.F. & Weinberg R.A. (1983) Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, 222: 771.

Lane H.A., Beuvink I., Motoyama A.B., Daly J.M., Neve R.M. & Hynes N.E. (2000) ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol*, 20: 3210.

Le Doussal V., Tubiana-Hulin M., Friedman S., Hacene K., Spyrtos F. & Brunet M. (1989) Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer*, 64: 1914.

Leitzel K., Teramoto Y., Konrad K., Chinchilli V.M., Volas G., Grossberg H., Harvey H., Demers L. & Lipton A. (1995) Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol*, 13: 1129.

Lendeckel U., Kohl J., Arndt M., Carl-McGrath S., Donat H. & Rocken C. (2005) Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131: 41.

Levi F., Lucchini F., Negri E., Boyle P. & La Vecchia C. (1999) Cancer mortality in Europe, 1990-1994, and an overview of trends from 1955 to 1994. *Eur J Cancer*, 35: 1477.

Lidereau R., Callahan R., Dickson C., Peters G., Escot C. & Ali I.U. (1988) Amplification of the int-2 gene in primary human breast tumors. *Oncogene Res*, 2: 285.

Liotta L.A., Kleinerman J. & Saidel G.M. (1974) Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, 34: 997.

Liotta L.A., Steeg P.S. & Stetler-Stevenson W.G. (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 64: 327.

- Liotta L.A., Stetler- Stevensson W.G. (1993) Principles of molecular cell biology of cancer: Cancer metastasis. De Vita S.M. & Rosenberg S.A (eds.), Cancer: Principles and practice of oncology. 4th ed.. Lippincott Cooperation. Philadelphia.
- Liotta L.A. & Kohn E.C. (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411: 375.
- Mack L., Kerkvliet N., Doig G. & O'Malley F.P. (1997) Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma in situ of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erb B2, bcl-2, and ki-67. *Hum Pathol*, 28: 974.
- Mark M.R., Chen J., Hammonds R.G., Sadick M. & Godowsk P.J. (1996) Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem*, 271: 9785.
- Masood S. & Bui M.M. (2000) Assessment of Her-2/neu overexpression in primary breast cancers and their metastatic lesions: an immunohistochemical study. *Ann Clin Lab Sci*, 30: 259.
- Matsumura K., Kallioniemi A., Kallioniemi O., Chen L., Smith H.S., Pinkel D., Gray J. & Waldman F.M. (1992) Deletion of chromosome 17p loci in breast cancer cells detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*, 52: 3474.
- McGuire W.L., Tandon A.K., Allred D.C., Chamness G.C. & Clark G.M. (1990) How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1006.
- McGuire W.L. (1991) Breast cancer prognostic factors. Evaluation Guidelines. *J Nat Cancer Inst*, 83: 154
- McGuire W.L. & Clark G.M. (1992) Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 326: 1756.
- Melamed M.R. (1992) Cytology. *J Cell Biochem Suppl*, 16I: 73.
- Menard S., Tagliabue E., Campiglio M. & Pupa S.M. (2000) Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol*, 182: 150.
- Menard S., Valagussa P., Pilotti S., Gianni L., Biganzoli E., Boracchi P., Tomasic G., Casalini P., Marubini E., Colnaghi M.I., Cascinelli N. & Bonadonna G. (2001) Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol*, 19: 329.
- Meng S., Tripathy D., Frenkel E.P., Shete S., Naftalis E.Z., Huth J.F., Beitsch P.D., Leitch M., Hoover S., Euhus D., Haley B., Morrison L., Fleming T.P., Herlyn D., Terstappen L.W., Fehm T., Tucker T.F., Lane N., Wang J. & Uhr J.W. (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, 10: 8152.
- Meng S., Tripathy D., Shete S., Ashfaq R., Haley B., Perkins S., Beitsch P., Khan A., Euhus D., Osborne C., Frenkel E., Hoover S., Leitch M., Clifford E., Vitetta E., Morrison L., Herlyn

- D., Terstappen L.W., Fleming T., Fehm T., Tucker T., Lane N., Wang J. & Uhr J. (2004) HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 9393.
- Meric F., Lee W.P., Sahin A., Zhang H., Kung H.J. & Hung M.C. (2002) Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 8: 361.
- Mettlin C. (1999) Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin*, 49: 138.
- Miles D.W., Harris W.H., Gillett C.E., Smith P. & Barnes D.M. (1999) Effect of c-erbB(2) and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer*, 84: 354.
- Mommers E.C., van Diest P.J., Leonhart A.M., Meijer C.J. & Baak J.P. (1998) Expression of proliferation and apoptosis-related proteins in usual ductal hyperplasia of the breast. *Hum Pathol*, 29: 1539.
- Moreno A., Lloveras B., Figueras A., Escobedo A., Ramon J.M., Sierra A. & Fabra A. (1997) Ductal carcinoma in situ of the breast: correlation between histologic classifications and biologic markers. *Mod Pathol*, 10: 1088.
- Mullberg J., Althoff K., Jostock T. & Rose-John S. (2000) The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw*, 11: 27.
- Mullis K.B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262: 56.
- Muss H.B. (2001) Role of adjuvant endocrine therapy in early-stage breast cancer. *Semin Oncol*, 28: 313.
- Neville A.M., Bettelheim R., Gelber R.D., Save-Soderbergh J., Davis B.W., Reed R., Torhorst J., Golouh R., Peterson H.F., Price K.N. & et al. (1992) Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 10: 696.
- Nicolson G.L. & Poste G. (1982) Tumor cell diversity and host responses in cancer metastasis--part I--properties of metastatic cells. *Curr Probl Cancer*, 7: 1.
- Nicolson G.L. (1991) Quantitative variations in gene expression: possible role in cellular diversification and tumor progression. *J Cell Biochem*, 46: 277.
- Niehans G.A., Singleton T.P., Dykoski D. & Kiang D.T. (1993) Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites. *J Natl Cancer Inst*, 85: 1230.
- Nixon A.J., Neuberg D., Hayes D.F., Gelman R., Connolly J.L., Schnitt S., Abner A., Recht A., Vicini F. & Harris J.R. (1994) Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol*, 12: 888.
- Nowell P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23.

O'Bryan J.P., Frye R.A., Cogswell P.C., Neubauer A., Kitch B., Prokop C., Espinosa R., 3rd, Le Beau M.M., Earp H.S. & Liu E.T. (1991) axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, 11: 5016.

Ohtani H. (1998) Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol Int*, 48: 1.

Page D.L., Dupont W.D., Jensen R.A. & Simpson J.F. (1998) When and to what end do pathologists agree? *J Natl Cancer Inst*, 90: 88.

Paik S., Shak S., Tang G., Kim C., Baker J., Cronin M., Baehner F.L., Walker M.G., Watson D., Park T., Hiller W., Fisher E.R., Wickerham D.L., Bryant J. & Wolmark N. (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 351: 2817.

Pandis N., Teixeira M.R., Gerdes A.M., Limon J., Bardi G., Andersen J.A., Idvall I., Mandahl N., Mitelman F. & Heim S. (1995) Chromosome abnormalities in bilateral breast carcinomas. Cytogenetic evaluation of the clonal origin of multiple primary tumors. *Cancer*, 76: 250.

Park C.C., Bissell M.J. & Barcellos-Hoff M.H. (2000) The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today*, 6: 324.

Pawlowski V., Revillion F., Hornez L. & Peyrat J.P. (2000) A real-time one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction method to quantify c-erbB-2 expression in human breast cancer. *Cancer Detect Prev*, 24: 212.

Pawson T. & Schlessingert J. (1993) SH2 and SH3 domains. *Curr Biol*, 3: 434.

Pegram M.D., Lipton A., Hayes D.F., Weber B.L., Baselga J.M., Tripathy D., Baly D., Baughman S.A., Twaddell T., Glaspy J.A. & Slamon D.J. (1998) Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol*, 16: 2659.

Perkin- Elmer Cooperation (1998). Abi Prism 7700 Sequence Detection System: Relative quantitation of gene expression. User Bulletin 2. Norwalk, CT: Perkin-Elmer Corporation.

Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lonning P.E., Borresen-Dale A.L., Brown P.O. & Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747.

Pollack J.R., Perou C.M., Alizadeh A.A., Eisen M.B., Pergamenschikov A., Williams C.F., Jeffrey S.S., Botstein D. & Brown P.O. (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 23: 41.

Poste G. & Fidler I.J. (1980) The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283: 139.

Poste G., Doll J., Hart I.R. & Fidler I.J. (1980) In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res*, 40: 1636.

Poste G. & Greig R. (1982) On the genesis and regulation of cellular heterogeneity in malignant tumors. *Invasion Metastasis*, 2: 137.

Prenzel N., Fischer O.M., Streit S., Hart S. & Ullrich A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*, 8: 11.

Press M.F., Jones L.A., Godolphin W., Edwards C.L. & Slamon D.J. (1990) HER-2/neu oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancers. *Prog Clin Biol Res*, 354A: 209.

Press M.F., Hung G., Godolphin W. & Slamon D.J. (1994) Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*, 54: 2771.

Press M.F., Bernstein L., Thomas P.A., Meisner L.F., Zhou J.Y., Ma Y., Hung G., Robinson R.A., Harris C., El-Naggar A., Slamon D.J., Phillips R.N., Ross J.S., Wolman S.R. & Flom K.J. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*, 15: 2894.

Psychrembel Klinisches Wörterbuch (1998) bearbeitet von der Wörterbuch-Redaktion des Verlages unter der Leitung von Helmuth Hildebrandt. 258., neu bearbeitete Auflage. De Gruyter Verlag. Berlin.

Quaranta V. & Giannelli G. (2003) Cancer invasion: watch your neighbourhood! *Tumori*, 89: 343.

Quiet C.A., Ferguson D.J., Weichselbaum R.R. & Hellman S. (1995) Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 13: 1144.

Ramaswamy S., Ross K.N., Lander E.S. & Golub T.R. (2003) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, 33: 49.

Rasmussen H.B., Teisner B., Andersen J.A., Yde-Andersen E. & Leigh I. (1992) Foetal antigen 2 (FA2) in relation to wound healing and fibroblast proliferation. *Br J Dermatol*, 126: 148.

Remmele W (ed) (2001) Pathologie. Band 4. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.

Revillion F., Bonnetterre J. & Peyrat J.P. (1998) ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer*, 34: 791.

Riede U.N., Schäfer H.E. (1995) Allgemeine und Spezielle Pathologie. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.

Rio C., Buxbaum J.D., Peschon J.J. & Corfas G. (2000) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem*, 275: 10379.

Robert- Koch- Institut (2000) RKI Krebskrankheiten. Berlin. <http://www.rki.de>.

Roehrl M.H., Becker K.F., Becker I. & Hofler H. (1997) Efficiency of single-cell polymerase chain reaction from stained histologic slides and integrity of DNA in archival tissue. *Diagn Mol Pathol*, 6: 292.

Ronnov-Jessen L., Petersen O.W., Koteliansky V.E. & Bissell M.J. (1995) The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 95: 859.

Rosen P.P., Groshen S., Saigo P.E., Kinne D.W. & Hellman S. (1989) Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol*, 7: 1239.

Rosen P.P., Groshen S., Kinne D.W. & Norton L. (1993) Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 11: 2090.

Ross J.S. & Fletcher J.A. (1998) The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*, 16: 413.

Ross J.S. & Gray G.S. (2003) Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. *Clin Leadersh Manag Rev*, 17: 333.

Ross J.S., Fletcher J.A., Linette G.P., Stec J., Clark E., Ayers M., Symmans W.F., Puztai L. & Bloom K.J. (2003) The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist*, 8: 307.

Saez R.A., McGuire W.L. & Clark G.M. (1989) Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol*, 5: 102.

Sarup J.C., Johnson R.M., King K.L., Fendly B.M., Lipari M.T., Napier M.A., Ullrich A. & Shepard H.M. (1991) Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul*, 1: 72.

Schechter A.L., Stern D.F., Vaidyanathan L., Decker S.J., Drebin J.A., Greene M.I. & Weinberg R.A. (1984) The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 312: 513.

Schlondorff J. & Blobel C.P. (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci*, 112 (Pt 21): 3603.

Schmid P., Wischnewsky M.B., Sezer O., Bohm R. & Possinger K. (2002) Prediction of response to hormonal treatment in metastatic breast cancer. *Oncology*, 63: 309.

- Seemayer T.A., Schurch W. & Lagace R. (1981) Myofibroblasts in human pathology. *Hum Pathol*, 12: 491.
- Sekido Y., Umemura S., Takekoshi S., Suzuki Y., Tokuda Y., Tajima T. & Osamura R.Y. (2003) Heterogeneous gene alterations in primary breast cancer contribute to discordance between primary and asynchronous metastatic/recurrent sites: HER2 gene amplification and p53 mutation. *Int J Oncol*, 22: 1225.
- Sgroi D.C., Teng S., Robinson G., LeVangie R., Hudson J.R., Jr. & Elkahloun A.G. (1999) In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res*, 59: 5656.
- Shimizu C., Fukutomi T., Tsuda H., Akashi-Tanaka S., Watanabe T., Nanasawa T. & Sugihara K. (2000) c-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues. *J Surg Oncol*, 73: 17.
- Simon R., Nocito A., Hubscher T., Bucher C., Torhorst J., Schraml P., Bubendorf L., Mihatsch M.M., Moch H., Wilber K., Schotzau A., Kononen J. & Sauter G. (2001) Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93: 1141.
- Simone N.L., Bonner R.F., Gillespie J.W., Emmert-Buck M.R. & Liotta L.A. (1998) Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet*, 14: 272.
- Simpson J.F. & Page D.L. (1994) Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *Am J Clin Pathol*, 102: S3.
- Singleton T.P. & Strickler J.G. (1992) Clinical and pathologic significance of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncogene. *Pathol Annu*, 27 Pt 1: 165.
- Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A. & et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244: 707.
- Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J. & Norton L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344: 783.
- Sleeman J.P. (2000) The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res*, 157: 55.
- Sliwkowski M.X., Lofgren J.A., Lewis G.D., Hotaling T.E., Fendly B.M. & Fox J.A. (1999) Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol*, 26: 60.
- Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Eystein Lonning P. & Borresen-Dale A.L. (2001) Gene expression patterns of breast

carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10869.

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

Stark A., Hulka B.S., Joens S., Novotny D., Thor A.D., Wold L.E., Schell M.J., Melton L.J., 3rd, Liu E.T. & Conway K. (2000) HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer. *J Clin Oncol*, 18: 267.

Statistisches Bundesamt (1998) Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4: Todesursachenstatistik in Deutschland. Metzler- Poeschel- Verlag, Stuttgart.

Statistisches Landesamt Saarland (1998) Krebsregister für das Saarland. Sonderheft 191/1998. Saarbrücken.

Steinert P.M. & Roop D.R. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem*, 57: 593.

Sternlicht M.D., Lochter A., Sympson C.J., Huey B., Rougier J.P., Gray J.W., Pinkel D., Bissell M.J. & Werb Z. (1999) The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*, 98: 137.

Suzuki N., Withers H.R. & Koehler M.W. (1978) Heterogeneity and variability of artificial lung colony-forming ability among clones from mouse fibrosarcoma. *Cancer Res*, 38: 3349.

Symmans W.F., Liu J., Knowles D.M. & Inghirami G. (1995) Breast cancer heterogeneity: evaluation of clonality in primary and metastatic lesions. *Hum Pathol*, 26: 210.

Talmadge J.E., Wolman S.R. & Fidler I.J. (1982) Evidence for the clonal origin of spontaneous metastases. *Science*, 217: 361.

Talmadge J.E. & Zbar B. (1987) Clonality of pulmonary metastases from the bladder 6 subline of the B16 melanoma studied by southern hybridization. *J Natl Cancer Inst*, 78: 315.

Tan M., Yao J., Yu D. (1997) Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res*, 57: 1199-1205

Tanaka K., Nagayama Y., Nakano T., Takamura N., Namba H., Fukada S., Kuma K., Yamashita S. & Niwa M. (1998) Expression profile of receptor-type protein tyrosine kinase genes in the human thyroid. *Endocrinology*, 139: 852.

Tavassoli F.A, Devilee P. (2003) Tumors of the breast and other female genital organs. IARC: WHO classification of tumors. Genf.

The Consensus Conference Committee (1997). Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma in situ. *Cancer*, 80: 1798.

- Trock B.J., Leonessa F. & Clarke R. (1997) Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst*, 89: 917.
- Trock B.J., Yamauchi H., Brotzman M., Stearn V. (2000) C-erbB-2 as a prognostic factor in breast cancer: A meta-analysis. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 19: 97a.
- Tsou A.P., Wu K.M., Tsen T.Y., Chi C.W., Chiu J.H., Lui W.Y., Hu C.P., Chang C., Chou C.K. & Tsai S.F. (1998) Parallel hybridization analysis of multiple protein kinase genes: identification of gene expression patterns characteristic of human hepatocellular carcinoma. *Genomics*, 50: 331.
- Tubbs R.R., Pettay J.D., Roche P.C., Stoler M.H., Jenkins R.B. & Grogan T.M. (2001) Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol*, 19: 2714.
- Tumorzentrum München (2001) Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. Herausgeber: Tumorzentrum München. München.
- Tzahar E., Waterman H., Chen X., Levkowitz G., Karunagaran D., Lavi S., Ratzkin B.J. & Yarden Y. (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 16: 5276.
- Ullrich A. & Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61: 203.
- van 't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Bernards R. & Friend S.H. (2003) Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 5: 57.
- van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J., Dai H., Hart A.A., Voskuil D.W., Schreiber G.J., Peterse J.L., Roberts C., Marton M.J., Parrish M., Atsma D., Witteveen A., Glas A., Delahaye L., van der Velde T., Bartelink H., Rodenhuis S., Rutgers E.T., Friend S.H. & Bernards R. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 347: 1999.
- Vincent-Salomon A., Jouve M., Genin P., Freneaux P., Sigal-Zafrani B., Caly M., Beuzebec P., Pouillart P. & Sastre-Garau X. (2002) HER2 status in patients with breast carcinoma is not modified selectively by preoperative chemotherapy and is stable during the metastatic process. *Cancer*, 94: 2169.
- Vogel C., Cobleigh M.A., Tripathy D., Gutheil J.C., Harris L.N., Fehrenbacher L., Slamon D.J., Murphy M., Novotny W.F., Burchmore M., Shak S. & Stewart S.J. (2001) First-line, single-agent Herceptin(R) (trastuzumab) in metastatic breast cancer. a preliminary report. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 1: 25.
- Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D., Gutheil J.C., Harris L.N., Fehrenbacher L., Slamon D.J., Murphy M., Novotny W.F., Burchmore M., Shak S., Stewart S.J. & Press M. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 20: 719.

Walch A., Specht K., Bink K., Zitzelsberger H., Braselmann H., Bauer M., Aubele M., Stein H., Siewert J.R., Hofler H. & Werner M. (2001) Her-2/neu gene amplification, elevated mRNA expression, and protein overexpression in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Lab Invest*, 81: 791.

Wang W., Wyckoff J.B., Wang Y., Bottinger E.P., Segall J.E. & Condeelis J.S. (2003) Gene expression analysis on small numbers of invasive cells collected by chemotaxis from primary mammary tumors of the mouse. *BMC Biotechnol*, 3: 13.

Weigelt B., Glas A.M., Wessels L.F., Witteveen A.T., Peterse J.L. & van't Veer L.J. (2003) Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 15901.

Weiss L. (1980) Metastasis: differences between cancer cells in primary and secondary tumors. *Pathobiol Annu*, 10: 51.

Wernert N. (1997) The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch*, 430: 433.

WHO (1981) International histological classification of breast tumors: Histological typing of breast tumors. 2nd ed.. Genf.

Wittekind C., Wagner G. (1997) TNM- Klassifikation maligner Tumoren. 5. Auflage. Springer- Verlag, Heidelberg.

Wolfner M.F. & Wilson K.L. (2001) The nuclear envelope: emerging roles in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 58: 1737.

Wolfsberg T.G., Primakoff P., Myles D.G. & White J.M. (1995) ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol*, 131: 275.

Woodhouse E.C., Chuaqui R.F. & Liotta L.A. (1997) General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80: 1529.

[www.http:// medlib. utah.edu](http://medlib.utah.edu)

[www.http://tnm.uicc.org](http://tnm.uicc.org)

Xu R., Perle M.A., Inghirami G., Chan W., Delgado Y. & Feiner H. (2002) Amplification of Her-2/neu gene in Her-2/neu-overexpressing and -nonexpressing breast carcinomas and their synchronous benign, premalignant, and metastatic lesions detected by FISH in archival material. *Mod Pathol*, 15: 116.

Yamauchi H., O'Neill A., Gelman R., Carney W., Tenney D.Y., Hosch S. & Hayes D.F. (1997) Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol*, 15: 2518.

Yamauchi H., Stearns V. & Hayes D.F. (2001) When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol*, 19: 2334.

Yarden Y. & Sliwkowski M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 127.

Yokota J. (2000) Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21: 497.

Yu D., Wang S.S., Dulski K.M., Tsai C.M., Nicolson G.L. & Hung M.C. (1994) c-erbB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res*, 54: 3260.

Yu D. & Hung M.C. (2000) Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene*, 19: 6115.

Zujewski J. & Liu E.T. (1998) The 1998 St. Gallen's Consensus Conference: an assessment. *J Natl Cancer Inst*, 90: 1587.

7. Anhang

7.1 St. Gallen Consensus - Kriterien: 7. internationale Konferenz zur adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms (2001) (Tumorzentrum München, 2001)

Nach den St. Gallen Konsensus Kriterien werden zur individuellen Risikoabschätzung die „klassischen Prognosefaktoren herangezogen:

Primärtumorgröße; Lymphknotenstatus; histologischer Tumortyp; Hormonrezeptor-Status; histologisches Grading; Patientenalter < 35 Jahren

Risikogruppe	Rezeptor- positiv		Rezeptor- negativ	
	Prämenopausal	Postmenopausal	Prämenopausal	Postmenopausal
N0; niedriges Risiko T< 1cm u.G1 ER/PR + u. > 35 Jahre	TAM oder keine Therapie	TAM oder keine Therapie	_____	
Alle anderen Konstellationen > 35 Jahre (N0; N+)	Ovarsuppression +(-) TAM oder CT+TAM	N0: TAM oder CT+TAM N+: CT+TAM	CT	CT
< 35 Jahre (N0; N+)	CT+ obligate endokrine Therapie		CT	_____

TAM= Tamoxifen; CT= Polychemotherapie

7.2 pTNM- Klassifikation des Mammakarzinoms (aus Wittekind C, 1997)

pTNM-Klassifikation Mammakarzinom	
pT- Primärtumor	
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ: duktales Ca (DCIS) oder lobuläres Ca in situ (LCIS) oder M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
pT 1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	T1mic Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	T1a 0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung
	T1b mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
	T1c mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
pT 2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT 3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT 4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
	T4a mit Ausdehnung auf die Brustwand
	T4b mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
	T4c Kriterien 4a und 4b gemeinsam
	T4d entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
pN- Regionale Lymphknoten*	
pNX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1mi	Micrometastasen (größer als 0,2mm, aber nicht größer als 2mm)
pN1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
	pN1a nur Mikrometastasen (keine größer als 0,2cm)
	pN1b Metastasen in Lymphknoten, zumindest eine größer als 0,2cm
	i Metastasen in 1-3 Lymphknoten, eine größer als 0,2cm; aber alle kleiner als 2cm
	ii Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten; eine größer als 0,2 cm, aber kleiner als 2cm
	iii Ausdehnung der Metastasen über die Lymphknotenkapsel hinaus (alle kleiner als 2cm in größter Ausdehnung)
	iv Metastasen in Lymphknoten 2 cm oder mehr in größter Ausdehnung
pN2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
pN3	Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
PM- Fernmetastasen	
pM X	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM 0	keine Fernmetastasen
pM 1	Fernmetastasen

- Axilläre Lymphknoten (ipsilateral): Interpektorale Lymphknoten und Lymphknoten entlang der V.axillaris
 Level I (untere Axilla): Lymphknoten lateral des M. pectoralis minor
 Level II (mittlere Axilla): Lymphknoten zwischen dem medialen und lateralen Rand des M. pectoralis minor den interpektoralen Lymphknoten;
 Level III (obere Axilla): apikale Lymphknoten und medial des M. pectoralis minor gelegene Lymphknoten (außer subklavikuläre und infraklavikuläre)
- Infraklavikuläre (subklavikuläre) (ipsilateral)

3. Lymphknoten parasternal entlang der A. mammaria interna in der Fascia endothoracica (ipsilateral)
4. Supraklavikuläre Lymphknoten (ipsilateral)

7.3 Klinische Stadiumeinteilung nach UICC (www. <http://tnm.uicc.org>):

Stadium		TNM-Klassifizierung	
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1 N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0 N1 N2	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

7.4 Evaluationskriterien neuer biologischer Tumormarker (nach McGuire WL, 1991, Hayes DF et al., 2001):

1. Erstellung einer biologischen Hypothese
2. Einfacher Nachweis für den Faktor
3. Korrelation mit etablierten Faktoren
4. Optimierung der Schwellenwerte für die Untersuchung an Niedrig- und Hochrisikogruppen
5. Testen der Faktorenunabhängigkeit und Gewichtung der Faktoren mithilfe univariater und multivariater Analyseverfahren
6. Validierung der Ergebnisse in einem anderen Patientenkollektiv durch andere Untersucher
7. Klinisch prospektive Studien
8. Überführung in die klinische Praxis

7.5 Lösungen und Reagenzien:

- PK-Puffer: 50 mM Tris/ HCL (pH 8,0)
(Lyse- Puffer) 0,5 mM EDTA (pH 8,0)
10 % Sodiumdodecylsulfat

-DEPC-Aqua dest.: 1000 µl DEPC ad 1Liter Aqua dest.
(Autoklavierung für 24 Stunden unter dem Abzug)

Mikrodissektion:

- Ethanol (98 %) für Analysezwecke Merck, Darmstadt
- Xylol für Analysezwecke Merck, Darmstadt
- Ampuwa- H₂O für Injektionszwecke Böhringer, Ingelheim
- Instant Hämatoxylin A/B (53,6 g; 46,8 g) Shandon, Pittsburgh, USA
- RNase Erase ICN Biomedicals Inc.,Ohio, USA

RNA- Extraktion:

- Proteinase K (50 mg/ml) Roche, Basel, Schweiz
- Natrium-acetat-trihydrat Merck, Darmstadt
(Einwiegen von Feststoff 2 M in H₂O; gelöst in Essigsäure (pH: 4,5))
- saures Phenol 3,75: 1 (H₂O); (v/v) Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
- Chloroform für Analysezwecke Merck, Darmstadt
- Glykogen (10mg/ml) für molekularbiologische Zwecke Roche, Mannheim
- Isopropanol für Analysezwecke Merck, Darmstadt
- Ethanol für Analysezwecke Merck, Darmstadt

Reverse Transkription und RT- PCR:

- Superscript™ II RNase H Reverse Transcriptase PE Applied Biosystems, Foster City, USA

[Reverse Transcriptase in Storage Puffer (20 mM Tris- HCL (ph 7,5), 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1mM DTT; 0,01% NP- 40; 50 % Glycerol; First- Strand- Puffer (250mM TRIS- HCl (ph: 8,3); 375 mM KCl; 15 mM MgCl]

- Random Primer p (dn) 6 (1µg/ml) Roche, Mannheim

- RnaseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ µl) Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, USA

- Ultrapure dNTP Set Ammersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg/ Germany

- Primer- Probe- Set: Assays-on- demand:
(Probe, Forward amplification primer, Reverse amplification primer)

<i>Adam 17: Bestell- Nr. Hs 00234224</i>	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>AXL: Bestell- Nr. Hs 00242357</i>	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>LMNB1: Bestell- Nr. Hs 00194369</i>	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>Her-2/neu: Bestell- Nr. Hs 00170433</i>	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>CollA1: Bestell- Nr. Hs 00164004</i>	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>CollA2: Bestell- Nr. Hs 00164099</i>	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>

- TaqMan™ 2 X PCR MasterMix PE Applied Biosystems, Foster City,USA

[10X PCR Puffer (200 mM Tris- HCL, 500 mM Kcl);Taq DNA Polymerase (5 U/µl)]

7.6 Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch geordnet)

Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin and Metalloprotease (engl.)
Aqua dest.	Destiliertes Wasser
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct-Wert	Threshold-Zyklus (engl.)
DCIS	Duktales in situ Karzinom

DFS	Rezidivfreie Überlebenszeit (disease- free survival)
ECM	Extrazelluläre Matrix
ER	Östrogenrezeptor
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G 1-3	histologisches Grading nach Bloom-Richardson
HE- Färbung	Hämalaun-Eosin Färbung
IHC	Immunhistochemie
5- JÜR	5- Jahresüberlebensrate
LIN	Lobuläres in situ Karzinom
LCM	Laser Capture Mikrodissektion (engl.)
LK (B)	Lymphknoten
LMM	Laser Microbeam Mikrodissektion (engl.)
LOE	Level of evidence (engl.)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Neg.	Negativ
NIH	National institute of health (engl.)
NTC	No template control (engl.)
OS	Gesamtüberlebenszeit (overall survival)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PK	Proteinase K
PR	Progesteronrezeptor
PT (A)	Primärtumor
pTNM	pathologische Tumorklassifikation (T= Primärtumor; N= Nodalstatus;M= Fernmetastasierung)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (engl.)
RT	Reverse Transkription

RT- PCR	Real-time Polymerase Ketten Reaktion
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-BOX binding protein (engl.)
UICC	Union internationale Contre le Cancer (frz.)
Verd.	verdünnt
WHO	World Health Organisation (engl.)

7.7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Abbildung

- I.1: Altersspezifische Inzidenz (Stadtgebiet München) des Mammakarzinoms
- I.2: Altersspezifische Mortalitätsraten in Deutschland
- I.3: Invasiv- duktales Mammakarzinom (Übersichtsvergrößerung) (HE- Färbung)
- I.4: Invasiv- duktales Mammakarzinom (starke Vergrößerung) (HE- Färbung)
- I.5: Invasiv- lobuläres Mammakarzinom (mittlere Vergrößerung) (HE- Färbung)
- I.6: Invasiv- lobuläres Mammakarzinom (starke Vergrößerung) (HE- Färbung)
- I.7: Klonale Selektionstheorie
- I.8: Metastasierungsmodell (Van de Vijver ML et al.,2002; Van't Veer LJ et al.,2003)
- I.9: Tumorprogressionsmodell unter Berücksichtigung des „Microenvironment“
- II.1 (a): Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion
- II.1 (b): Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion
- II.2 Vorgehensweise bei der Entparaffinierung
- II.3: Arbeitsschritte nach Durchführung der Mikrodissektion
- II.4: Ablauf der RT- PCR
- II.5: Darstellung des Ablaufs einer PCR Reaktion in 3 Phasen
- II.6 (a): Prinzip der RT- PCR

II.6 (b): Prinzip der RT- PCR

II.6 (c): Prinzip der RT- PCR

II.7: Darstellung einer PCR Amplifikationskurve

II.8: Darstellung einer Standardkurve (ADAM 17)

III.1 (a): Präperat vor Laser Capture Mikrodissektion

III.1 (b): Präperat nach Laser Capture Mikrodissektion

III.2 (a): Expressionsniveau ADAM 17 in den Primärtumoren

III.2 (b): Expressionsniveau AXL in den Primärtumoren

III.2 (c): Expressionsniveau LMNB 1 in den Primärtumoren

III.2 (d): Expressionsniveau Her- 2/neu in den Primärtumoren

III.2 (e): Expressionsniveau COL1A1 in den Primärtumoren

III.2 (f): Expressionsniveau COL1A2 in den Primärtumoren

III.3 (a): Unbereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für ADAM 17 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen

III.3 (b): Bereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für ADAM 17 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen

III.3 (c): Expressionsänderung ADAM 17 in den Lymphknotenmetastasen

III.4 (a): Unbereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für AXL in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen;

III.4 (b): Bereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für AXL in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen;

III.4 (c): Expressionsänderung AXL in den Lymphknotenmetastasen

III.5 (a): Unbereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für LMNB1 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen;

III.5 (b): Bereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für LMNB1 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen

III.5 (c): Expressionsänderung LMNB1 in den Lymphknotenmetastasen

III.6 (a): Unbereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für Her- 2/neu in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen

- III.6 (b): Bereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für Her- 2/neu in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen
- III.6 (c): Expressionsänderung Her- 2/neu in den Lymphknotenmetastasen
- III.7 (a): Unbereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für COL1A1 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen
- III.7 (b): Bereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für COL1A1 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen
- III.7 (c): Expressionsänderung COL1A1 in den Lymphknotenmetastasen
- III.8 (a): Unbereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für COL1A2 in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen
- III.8 (b): Bereinigtes Boxplotdiagramm der Werteverteilung für COL1A2 in Primärtumor und Lymphknotenmetastasen
- III.8 (c): Expressionsänderung COL1A2 in den Lymphknotenmetastasen
- III.9: Gegenläufige Regulation COL1A1- Her- 2/neu im Rahmen der Lymphknotenmetastasierung
- III.10 (a): Zusammenschau der 6 untersuchten Gene in den Primärtumoren
- III.10 (b): Zusammenschau der 6 untersuchten Gene in den Lymphknotenmetastasen
- III.11: Übersicht Studienfälle mit höherer Expression mehrerer Gene

Tabellen

- I.1: Betroffene Gene bei familiär assoziierten Tumorsyndromen mit Mammakarzinom
- I.2: Übersicht Risikofaktoren Mammakarzinom
- I.3: Modifizierte pathomorphologische Einteilung der Mammakarzinome gemäß WHO
- I.4: Beziehung zwischen der Anzahl der befallenen Lymphknoten und der 5- JÜR bei Patientinnen mit Mammakarzinom
- I.5: Klassifikation der Evidenzstufen zur Evaluierung neuer Prognosefaktoren
- I.6: Übersicht über die c-erbB-Onkogenfamilie
- I.7: Proto-Onkogene der Tyrosinkinase
- I.8: Übersicht Prognosefaktoren
- I.9: Gensignatur zur Unterscheidung primärer und metastatischer Adenokarzinome

- II.1: Pipettierschema auf der 96-well-Reaktionsplatte
- II.2: Beispiel für Wertetabelle zur Berechnung der Standardkurven
- III.1: Klinisch- pathologische Daten
- III.2: Prozentuale Verteilung der histomorphologischen, klinischen und tumor-
biologischen Faktoren der untersuchten Studienfälle
- III.3: Ct-Werte Primärtumore
- III.4: Expressionswerte Primärtumore dargestellt als Mittelwertverhältnisse zu TBP
- III.5: Statistik ADAM17
- III.6: Statistik AXL
- III.7: Statistik LMNB1
- III.8: Statistik Her- 2/neu
- III.9: Statistik COL1A1
- III.10: Statistik COL1A2
- III.11: Übersicht über Expressionsniveau der untersuchten Gene in den Primärtumoren
aller Studienfälle
- III.12: Ct- Werte Lymphknoten
- III.13: Expressionswerte Lymphknotenmetastasen dargestellt als Mittelwertverhältnisse
zu TBP
- III.14: Wilcoxon-Paaranalyse ADAM17
- III.15: Wilcoxon-Paaranalyse AXL
- III.16: Wilcoxon-Paaranalyse LMNB1
- III.17: Wilcoxon-Paaranalyse Her- 2/neu
- III.18: Wilcoxon- Paaranalyse COL1A1
- III.19: Wilcoxon-Paaranalyse COL1A2
- III.20: Statistische Maßzahlen aller 6 Gene im Überblick (Primärtumore)
- III.21: Statistische Maßzahlen aller 6 Gene im Überblick (Lymphknotenmetastasen)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Andreas Georg Scherr
Geburtsdatum: 04.01 1978
Geburtsort: Regensburg
Familienstand: ledig

Ausbildung

1984-1997	Grundschule und Gymnasium in Pfaffenhofen/Ilm
1997	Abitur
08/1997- 8/1998	Grundwehrdienst (Luftwaffensanitätsstaffel Flarak 23 /Manching)
10/1998- 8/2000	Vorklinisches Studium der Medizin an der Universität Regensburg
8/2000	Physikum
10/2000- 9/2005	Studium an der Technischen Universität München
11/2004	3. Staatsexamen (Gesamtnote:1,49)
11/2004	Approbation als Arzt

Praktisches Jahr

10/2003-2/2004	PJ-Tertial in Chirurgie (Städtisches Klinikum Bogenhausen, München)
02/2004-05/2004	PJ- Wahltertial in Neurologie (Klinikum Rechts der Isar, München)
05/2004-10/2004	PJ-Tertial in Innerer Medizin (Universitätsspital Basel, Schweiz)

Weiterbildung

seit 10/05 Assistenzarzt am Klinikum Passau für Innere Medizin
(Gastroenterologie, Hepatologie, Nephrologie, Diabetologie, Ernährungsmedizin)

Sonstiges

1993-1997	Ehrenamtliche Tätigkeiten in Sportvereinen
10/1997-03/1998	Sanitätsausbildung (SAN I u. SAN II der Deutschen Luftwaffe) und Teilnahme am zivilen Rettungsdienst

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank:

Meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr.med. Falko Fend**, für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit und für seine engagierte wissenschaftliche Betreuung, insbesondere für die Verbesserungsvorschläge bei der Niederschrift und für die gute Zusammenarbeit. Ohne seine fachliche und menschliche Kompetenz wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Meiner akademischen Betreuung **Frau Dr.med. Katja Specht**, die trotz räumlicher Entfernung sehr ausdauernd und zuverlässig das Projekt begleitete und mit ihrem wissenschaftlichem Engagement half, manche krisenhafte Situation des praktischen und theoretischen Teils dieser Arbeit zu überwinden.

Mein Dank gilt auch

Frau MTA Jahn, die mir insbesondere zu Beginn der Arbeit mit praktischen Tipps und Anregungen zur Seite stand.

Frau MTA Ulrike Reich, ohne die der molekulargenetische Teil nicht so schnell zustande gekommen wäre. Auch stand sie allzeit sehr freundlich für die Beantwortung von Fragen zur Verfügung.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern Barbara und Raimund Scherr für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihren unerschütterlichen Beistand während des gesamten Studiums bedanken.