

Untersuchung der systemischen Tumorprogression des Mammakarzinoms anhand Her2/neu-transgener Mäuse

Dissertation

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.),

angefertigt am Institut für Immunologie

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Brocker



vorgelegt von
Yves Hüsemann
aus Göttingen

Dissertation eingereicht am: 18.10.2007

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. E. Weiß

Zweiter Berichterstatter: PD Dr. S. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2008

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der entsprechenden Literaturzitate gekennzeichnet.

Die vorliegende Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, den 18.10.2007

Yves Hüsemann

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse flossen in folgende Publikation ein:

Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**: 58-68.

1	Einleitung	7
1.1	Das Mammakarzinom.....	7
1.1.1	Entwicklung der Mamma in der Maus	7
1.1.2	Unterschiede zwischen humaner und muriner Mamma	8
1.1.3	Onkogenese des Mammakarzinoms	10
1.2	Disseminierung von Tumorzellen	11
1.2.1	Zeitpunkt der Disseminierung.....	12
1.3	Mausmodelle zur Untersuchung des Mammakarzinoms.....	13
1.4	Die Biologie des epithelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Methoden.....	23
2.1.1	Arbeiten mit Mäusen.....	23
2.1.2	Verarbeitung der Gewebe- und Organ-Proben	26
2.1.3	Immunzytochemie, -histochemie und -fluoreszenz.....	27
2.1.4	Isolierung einzelner Tumorzellen und Einzelzell-PCR.....	32
2.1.5	Isolierung und Amplifikation von mRNA	35
2.1.6	Spezifische PCR und Genexpressionsanalyse	35
2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.1.8	Metaphasen-Präparation	37
2.1.9	Markierungs-PCR.....	38
2.1.10	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH).....	39
2.2	Material: Enzyme, Chemikalien, Puffer, Geräte, Oligonukleotide.....	41
2.3	Abkürzungen.....	47
3	Ergebnisse	50
3.1	Das Balb-neuT Mausmodell	50
3.1.1	Lokale Tumorprogression in Her2-transgenen Mäusen	50
3.1.2	Systemische Tumorprogression im Balb-neu-T Mausmodell	51
3.1.3	Immunhistochemischer Nachweis von Lungenmetastasen.....	52
3.1.4	Expression mammaspezifischer Gene in Lungenmetastasen.....	53
3.2	Untersuchung des Knochenmarks.....	54
3.2.1	Analyse des Genoms disseminierter Zellen	57
3.3	Subpopulationen von disseminierten Zellen	58
3.3.1	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CK und Her2.....	59

3.3.2	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CK und EpCAM	61
3.4	Zeitpunkt der Disseminierung von Tumorzellen	63
3.4.1	Frühe Disseminierung von CK+ und Her2+ Zellen	64
3.4.2	Entwicklung der lokalen und systemischen Tumorprogression.....	65
3.4.3	Nachweis der frühen Disseminierung in PyMT-Mausmodell	66
3.5	Proliferatives Potential disseminierter Tumorzellen	69
3.5.1	Etablierung der KM-Transplantation.....	69
3.5.2	CK+ und Her2+ Zellen im Knochenmark der Rezipienten.....	71
3.5.3	Proliferation von CK+ Zellen.....	72
3.5.4	Genomische Aberrationen in CK+ und Her2+ Zellen	73
3.6	Orthotope Mamma-Transplantation.....	74
3.6.1	Evaluierung potentieller experimenteller Einflussfaktoren.....	75
3.6.2	Untersuchung der systemischen Erkrankung in Rezipienten	80
3.6.3	Genomische Aberrationen in disseminierten Tumorzellen	86
3.7	Genexpressionsanalysen früh-disseminierter Tumorzellen.....	88
4	Diskussion	90
4.1	Balb-neuT-Modell eignet sich zur Untersuchung des Mammakarzinoms.....	90
4.2	Nachweis der Streuung von Mammakarzinom-Zellen in Balb-neuT-Mäusen.....	91
4.3	Disseminierte Tumorzellen besitzen proliferatives Potential	94
4.4	Subpopulation disseminierter Zellen.....	98
5	Zusammenfassung.....	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Danksagung	108
8	Lebenslauf.....	109
9	Publikationen	110
10	Anhang	111

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

In der westlichen Welt stellt der Brustkrebs das am häufigsten vorkommende Malignom bei Frauen dar. Die Diagnose Brustkrebs ereilt allein in Deutschland jährlich 55.100 Frauen, womit das Mammakarzinom für 26,8% aller Krebsneuerkrankungsfälle bei Frauen verantwortlich ist (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2006). Im Jahr 2005 starben 17.455 Frauen an der Erkrankung bzw. ihren Folgen, was knapp 30% aller krebsbedingten Todesfälle entspricht (Statistisches Bundesamt 2005; RKI 2005). Die Brustkrebsinzidenz steigt in Deutschland seit 1970 stetig an, was unter anderem auch in einer verbesserten Früherkennung (z.B. Mammographie) begründet ist. Diese Früherkennung ermöglicht es wiederum, Vorstufen und gutartige (benigne) Tumore besser zu erkennen und zu behandeln, um das Auswachsen zu bösartigen (malignen) Formen zu verhindern. Damit ist auch die leicht rückläufige Mortalität von Brustkrebspatientinnen seit Mitte der 1990er Jahre zu erklären. Des Weiteren wurden enorme klinische sowie wissenschaftliche Anstrengungen unternommen, um diesen epidemiologisch betrachtet nur geringen Erfolg zu erzielen.

1.1.1 Entwicklung der Mamma in der Maus

Viele Erkenntnisse über die humane Brustkrebsentwicklung beruhen auf Studien in der Maus, da hier die einzelnen Entwicklungsstadien detailliert untersucht werden können. Daher wird im Folgenden die Mamma-Entwicklung in der Maus beschrieben.

Die Milchdrüsen werden bereits früh in der Embryonalentwicklung als Verdickungen des Ektoderms angelegt (Milchleiste) und entwickeln sich bis zur Geburt zu Milchknospen (Abbildung 1A). Die postnatale Weiterentwicklung beruht auf einem komplexen Zusammenspiel von Sexualhormonen und Wachstumsfaktoren während der Pubertät (ab Woche 3). Bis zur 10. Woche bildet sich ein stark verzweigtes Gangsystem (Ductus lactiferi), welches in das angrenzende Mesenchym und Fettgewebe auswächst. Nach der Pubertät findet im Falle einer Schwangerschaft ein weiterer Differenzierungsprozess des Brustepithels statt. Zusätzliche Seitengänge und Alveoli werden angelegt und füllen das Fettgewebe komplett aus, um die Milchversorgung der Nachkommen sicherzustellen. Nach der Laktation bildet sich das zusätzlich angelegte Epithel wieder zurück (Involution) und ermöglicht einen weiteren schwangerschaftsbedingten Differenzierungszyklus. Somit

unterliegt das Brustepithel einem von Sexualhormonen gesteuerten, zyklisch wiederkehrenden Differenzierungsprozess, wodurch sich die Struktur der Brustdrüse im Gegensatz zu anderen Organen ständig verändern kann.

Strukturell bestehen die Brustdrüsen aus zwei Komponenten, dem Epithel und dem umgebenden Stroma, welches aus dem embryonalen Mesoderm gebildet wird. Das Einwachsen der Drüsengänge in das angrenzende Mesenchym und Fettgewebe und die Ausdifferenzierung des Epithels wird von den Endknospen vorangetrieben (*terminal end buds*=TEBs; Abbildung 1B). Diese TEBs enthalten als funktionelle Einheit wahrscheinlich auch pluripotente Stammzellen („Cap“-Zellen). Das differenzierte Gangsystem ist in das Stroma eingebettet und besteht aus zwei epithelialen Zelltypen, die unterschiedliche Funktionen aufweisen. Die luminalen Epithelzellen begrenzen den Hohlraum der Drüsengänge und können Milchproteine an diese abgeben. Die myoepithelialen Zellen grenzen die luminalen Epithelzellen von der Basalmembran ab und können sich außerdem durch einen hohen Aktin-Gehalt kontrahieren, wodurch die Milch durch das Gangsystem geleitet wird.

1.1.2 Unterschiede zwischen humaner und muriner Mamma

Es gibt abgesehen von der unterschiedlichen Anzahl von Brustdrüsenpaaren (fünf in der Maus) noch weitere Unterschiede zwischen der murinen und humanen Mamma. So existiert bei der Maus keine lobuläre Anordnung innerhalb der einzelnen Drüsen. Im Gegensatz zu den TEBs in der murinen Brust, wird die funktionelle Einheit in der menschlichen Brust als terminale ductulo-lobuläre Einheit (TDLE) bezeichnet. Jede dieser Einheiten besteht aus mehreren Verzweigungen und Acini und bildet einen Lobulus. Diese gruppieren sich wie Trauben um einen terminalen Ductus. Jeder intralobuläre terminale Ductus ist von lobulärem Stroma umgeben, welches keine Adipozyten enthält und wiederum von losem Stroma umgeben ist, das in das umgebende Fettgewebe übergeht (Abbildung 2A, B). Das Fettgewebe ist daher im Gegensatz zu der murinen Mamma, in der ein enger Kontakt zwischen Epithelzellen, Fibroblasten und Adipozyten besteht (Abbildung 2C, D), nicht direkt mit dem Epithel assoziiert. Die Interaktion zwischen Epithel und Stroma ist nicht nur essentiell für die Entwicklung der Mamma und sondern auch für die Entstehung des Mammakarzinoms, da epitheliale und stromale Signalwege an der Tumorigenese beteiligt sind.

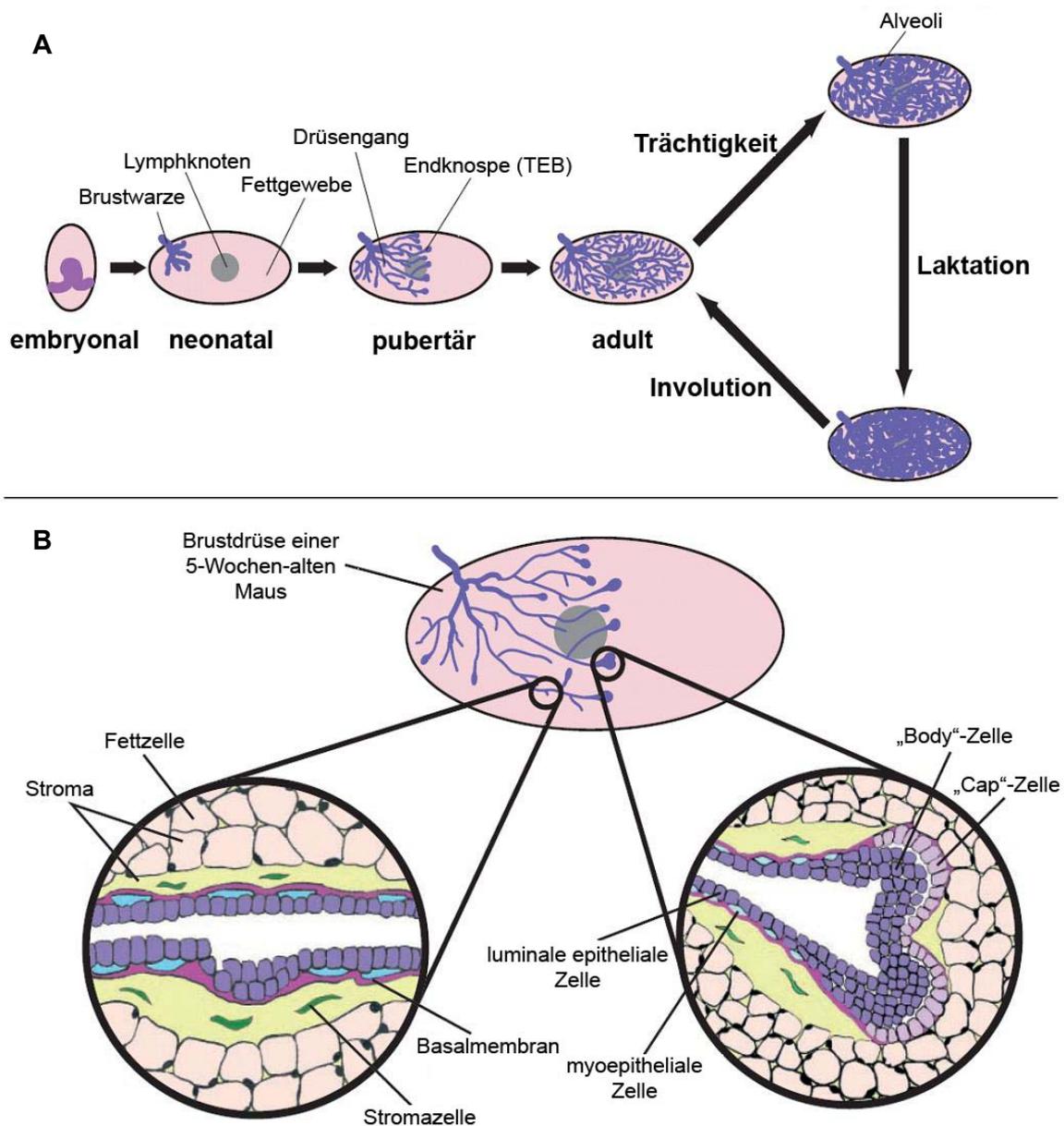


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Mamma-Entwicklung und Zellmorphologie
A) In der Maus wird das umgebende Fettgewebe erst mit Beginn der Pubertät ausgehend von den Endknospen, den sogenannten terminal end buds (TEBs), infiltriert. Bis zur 10. Woche ist das Fettgewebe komplett vom Gangsystem durchzogen. Durch die Schwangerschaft werden neue Seitengänge angelegt, und es kommt zu einer verstärkten epithelialen Proliferation, die bis zur Laktation ihren Höhepunkt erreicht hat. Nach Ende der Stillzeit bildet sich das Gewebe soweit zurück bis es dem Zustand vor der Schwangerschaft entspricht (Involution). **B)** Die invasive Front der TEBs dringt direkt in das Fettgewebe ein. Sie bestehen aus einer einfachen Zellschicht, den so genannten „Cap“-Zellen, die höchstwahrscheinlich die pluripotenten Stammzellen in der Mamma darstellen. Die „Body“-Zellen werden nach innen abgegeben, aus ihnen entsteht nach Zellyse der Hohlräume. Der Ductus wird von einer Basalmembran umgeben, welche das Epithel vom Stroma abgrenzt. Das Epithel besteht aus jeweils einer einfachen Schicht von luminalen Epithelzellen, die an den Hohlraum des Ductus grenzen, und von myoepithelialen Zellen, die wiederum das luminal e Epithel von der Basalmembran abgrenzen (Wiseman and Werb 2002).

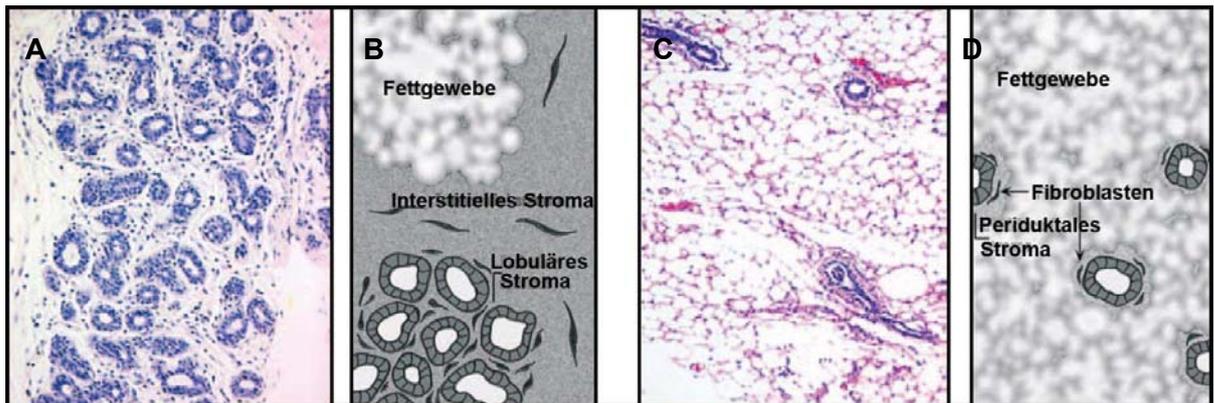


Abbildung 2 Vergleich von humanen und murinen Brustgewebe

Es sind Querschnitte durch humanes und murines Brustgewebe dargestellt. **A, B)** Humanes Brustgewebe: Die einzelnen Drüsengänge bilden zusammen Einheiten und formieren sich zu Lappen, welche wiederum ins Stroma eingebettet sind (HE-Färbung, A). In der schematischen Darstellung ist zu erkennen, dass dadurch das Brustepithel deutlich vom Fettgewebe getrennt wird (B). **C, D)** Murines Brustgewebe: Hier liegen die einzelnen Drüsengänge ohne Struktur lose im Fettgewebe, sodass sie im engen Kontakt zueinander stehen; D ist eine Schemazeichnung zu C (Parmar and Cunha 2004).

1.1.3 Onkogenese des Mammakarzinoms

Für die Karzinogenese im Mammagewebe wird ein mehrstufiges Modell vorgeschlagen, wobei sich das invasive Karzinom über eine Reihe von hyperplastischen und neoplastischen Stadien entwickelt (Lakhani 1999). Die Begründung für die Existenz solcher Vorstufen und die Klassifizierung des Mammakarzinoms beruhen auf Tierversuchen, histo-pathologischen Untersuchungen von Gewebepräparaten und der genetischen Analyse möglicher Vorläuferläsionen in der humanen Brust. Am Anfang stehen Hyperplasien der luminalen Epithelzellen, wodurch sich ein mehrschichtiges Epithel bildet. Man muss hier allerdings zwischen normalen und atypischen Hyperplasien unterscheiden. Normale Hyperplasien (*usual ductal hyperplasia* =UDH) treten relativ häufig auf, korrelieren nicht mit einem erhöhten Krebsrisiko und werden daher nicht als Vorstufe bezeichnet. Werden jedoch atypische duktales Hyperplasien (ADH) in Brustbiopsien diagnostiziert, korreliert dies mit einer 4- bis 5-fach höheren Inzidenz eines invasiven Mammakarzinoms im Vergleich zur normalen Brust (Ryan and Coady 1962; Tavassoli and Norris 1990). Die atypische Hyperplasie ist aus histologischer Sicht eine Übergangsform zum *Carcinoma in situ*, da die uniformen Zellhaufen aufgrund von vergrößerten Zellkernen bereits neoplastische Anzeichen aufweisen. Eine klare Abgrenzung ist daher nach morphologischer Betrachtung nicht möglich (Schnitt, Connolly et al. 1992). Es gibt zwei Arten von *in situ* Karzinomen, die aufgrund ihrer Morphologie unterschieden werden. Zum einen gibt es das duktales *Carcinoma in situ* (DCIS), welches 80% der Fälle ausmacht. Zum anderen gibt es das seltenere lobuläre *Carcinoma in situ*

(LCIS), welches epidemiologisch, molekular und genetisch betrachtet Unterschiede zum DCIS aufweist und prognostisch mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf einhergeht (Lakhani 1999). Beide Formen des *Carcinoma in situ* entstehen jedoch in den tubuloalveolären Lobuli und besitzen definitionsgemäß noch eine intakte Basalmembran. Mit dem Durchbruch durch die Basalmembran, welche das Epithelium vom umgebenden Stroma abgrenzt, liegt ein invasives Mammakarzinom vor. Bei den invasiven Karzinomen existieren ebenfalls unterschiedliche Formen, wobei das duktales Karzinom mit 80% am häufigsten diagnostiziert wird.

1.2 Disseminierung von Tumorzellen

Im Laufe der Progression werden Tumorzellen vom primären Tumor in das Gefäßsystem abgegeben und können somit in sekundäre Organe gelangen. Der Nachweis gestreuter Tumorzellen nach der Resektion des Primärtumors im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen ist ein Hinweis auf das Vorliegen einer minimalen residualen Erkrankung (*minimal residual disease*=MRD). Da epitheliale Zellmarker von den mesenchymalen Zellen des Knochenmarks, der Lymphknoten und des Bluts nicht exprimiert werden, ermöglichen immunzytochemische (ICC-) Färbungen gegen solche Antigene den Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen. Mit der Hilfe monoklonaler Antikörper, wie beispielsweise *A45-B/B3*, der gegen gemeinsame Epitope der Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichtet ist, ist eine Identifikation disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark möglich (Pantel, Schlimok et al. 1993). Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) stellt eine Möglichkeit dar, disseminierte Tumorzellen im Lymphknoten nachzuweisen oder solche Zellen anzureichern (Kubuschok, Passlick et al. 1999; Choesmel, Pierga et al. 2004). Umfangreiche Studien haben gezeigt, dass der Nachweis von disseminierten Tumorzellen nicht nur beim Mammakarzinom, sondern bei vielen epithelialen Tumoren mit einer schlechten Prognose korreliert (Braun, Vogl et al. 2005). Aufgrund dieser unabhängigen prognostischen Relevanz wurde der Befund disseminierter Tumorzellen im Knochenmark in die klassische TNM-Klassifizierung für Tumoren aufgenommen (pM_(i)). Interessanterweise konnte auch die Expression von Her2 durch Immunfärbung in disseminierten CK-positiven Zellen festgestellt werden (Braun, Hepp et al. 1999; Solomayer, Becker et al. 2006). Die Relevanz einer Her2-Positivität in CK+ disseminierten Tumorzellen, kommt darin zum Ausdruck, dass sich die Prognose für Patienten gegenüber denen mit CK+ Zellen, die Her2 nicht exprimieren, noch verschlechtert (Braun, Schlimok et al. 2001). Trotz allem bleibt bisher unklar, ob und welche dieser zirkulierenden Tumorzellen eine solide Metastasierung auslösen. Tatsache

ist, dass Brustkrebspatientinnen zumeist nicht am Primärtumor, der in einer Operation total resektiert wird, sondern an der systemischen Ausbreitung und den folgenden Metastasen versterben. Dies hebt die Notwendigkeit der Erforschung der molekulargenetischen Prozesse einer Metastasierung hervor.

1.2.1 Zeitpunkt der Disseminierung

Das gängige Modell beschreibt die Tumorprogression von den frühen Läsionen (ADH) bis zum invasivem Karzinom und schließlich der soliden Metastase als mehrstufigen Prozess (Fearon and Vogelstein 1990; Bernards and Weinberg 2002). Während dieser Entwicklung akkumulieren die Zellen im Primärtumor genetische und epigenetische Veränderungen, die zu einem invasiven Tumor führen. Einige individuelle Tumorzellen erlangen durch weitere Mutationen schließlich die Fähigkeit zu metastasieren. Die Disseminierung von Tumorzellen ist demnach ein spätes Ereignis (Abbildung 3A). Jedoch zeigte die molekulare Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen in Brustkrebspatientinnen durch CGH nicht nur weniger sondern auch unterschiedliche genomische Veränderungen als die entsprechenden Primärtumoren (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). Auch in anderen Karzinomen zeigte sich, dass disseminierte Tumorzellen und der Primärtumor unterschiedliche genomische Aberrationen aufwiesen (Klein, Blankenstein et al. 2002). Selbst in disseminierten Tumorzellen, die keine genomischen Veränderungen aufwiesen (normales CGH-Profil), konnte eine genetische Instabilität festgestellt werden, wobei interessanterweise auch die Amplifikation des Her2-Gens in disseminierten Zellen aus M0-Patienten, d.h. Patienten ohne Fernmetastasen, nachgewiesen wurde (Schardt, Meyer et al. 2005). Diese Zellen geben möglicherweise Aufschluss über frühe genetische Veränderungen, die entscheidend für die lokale und systemische Progression sein könnten. Daraus resultiert ein alternatives Modell der Metastasierung, wonach die Disseminierung von Tumorzellen ein frühes Ereignis in der Tumorprogression ist, und die Entwicklung von Primärtumor und Metastase parallel verläuft (Abbildung 3B).

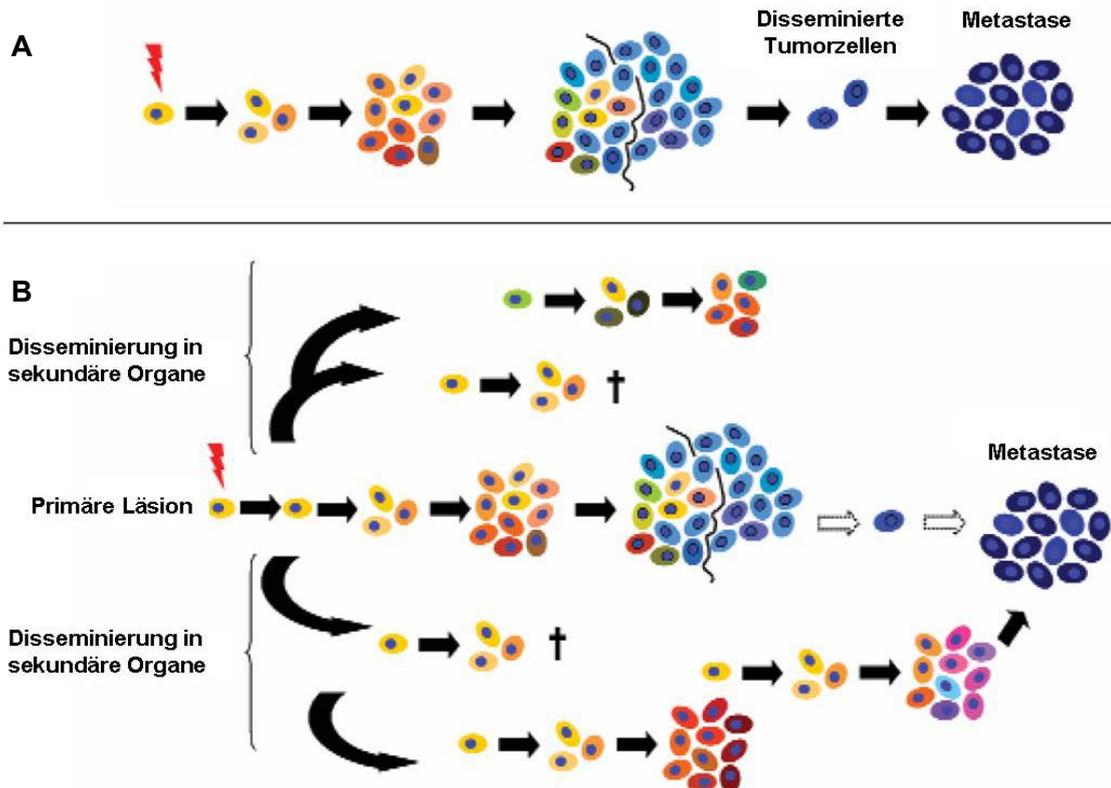


Abbildung 3 Modelle der Metastasierung

A) Nach dem gängigen Modell ist die Metastasierung ein fortlaufender Prozess: Die disseminierten Tumorzellen teilen sich die meisten genomischen Aberrationen mit dem Primärtumor und der soliden Metastase. **B)** Nach dem Modell der parallelen Entwicklung von Metastase und Primärtumor ist die Disseminierung von Tumorzellen ein frühes Ereignis. Die Zellen akkumulieren weitere genetische Aberrationen unabhängig vom und parallel zum Primärtumor, um die Metastasierung auszulösen (Die Farben zeigen den Verwandtschaftsgrad individueller Zellen an; (Klein 2004).

1.3 Mausmodelle zur Untersuchung des Mammakarzinoms

Aufgrund einer zumeist späten Diagnose des Mammakarzinoms in Patientinnen ist die Analyse entscheidender genetischer Veränderungen, die in den Vorstufen auftreten und die Karzinogenese auslösen, schwierig (Ottewill, Coleman et al. 2006). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass neben der Größe und dem klinischem Befund unterschiedliche molekulare Eigenschaften des Tumors einen starken Einfluss auf die Überlebensprognose des Patienten haben können. Mammakarzinome werden beispielsweise nach dem Östrogen-Rezeptor-(ER-)Status eingestuft, da eine fehlende ER-Expression in Patientinnen mit einer schlechteren Prognose korreliert (Grann, Troxel et al. 2005). Zudem wurde gezeigt, dass eine Überexpression des Onkogens Her2 im Tumor, welche auf einer genomischen Amplifikation beruht, mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und folglich mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Slamon, Clark

et al. 1987). Die genetische Instabilität, die eine Folge der Anhäufung genetischer und epigenetischer Veränderungen in Tumorzellen ist, stellt ein entscheidendes Kennzeichen der malignen Tumorprogression dar. Aus den verschiedenen möglichen Eigenschaften für Mammakarzinome resultiert ein heterogenes molekulares und klinisches Bild (Fargiano, Desai et al. 2003). Aufgrund dieser Problematik für die Untersuchung von Brustkrebspatientinnen wurden verschiedene Mausmodelle etabliert. Den größten Anteil nehmen dabei transgene, in denen ein bestimmtes Onkogen überexprimiert wird, und knockout Mausmodelle, in denen ein Tumorsuppressorgen (TSG) deletiert wird (Tabelle 1). Vorteile dieser Modelle sind zum einen, dass die Mäuse aufgrund von Inzuchtstämmen einen identischen genetischen Hintergrund besitzen. Zum anderen ist die genetische Instabilität kontrollierbar, da die erste Mutation durch Intergration eines Onkogens oder Deletion eines TSG initiiert wird. Daraus folgt auch eine zeitlich einheitliche und kontrollierbare Tumorprogression in Mausmodellen. Darüber hinaus lässt sich durch die Überexpression bzw. Deletion der Einfluss einzelner Gene auf die Tumorprogression untersuchen. Die Integration des Onkogens „*polyomavirus middle T*“ (PyMT) unter der Expressionskontrolle des Promotors des Maus-Mammatumorvirus (MMTV) in das murine Genom beispielsweise führt zu einer schnellen und aggressiven Karzinogenese im Mammagewebe der Maus, welche histopathologisch betrachtet der Entwicklung des Mammakarzinoms in der Patientin über die verschiedenen Tumorstadien sehr ähnlich ist (Guy, Cardiff et al. 1992). Jedoch muss beachtet werden, dass die Tumorigenese auf der Integration eines viralen Onkogens in das Mausgenom beruht, und sich somit Erkenntnisse nicht direkt auf die humane Krebsentwicklung übertragen lassen. Im Gegensatz dazu beruht die Karzinogenese im Her2/neu-transgenen Modell auf der Integration einer konstitutiv aktiven Form des Her2-Homologs aus der Ratte (neu). Her2 ist ein bekanntes und gut beschriebenes Onkogen im humanen Mammakarzinom und wird in 20-30% der Patientinnen aufgrund einer Amplifikation überexprimiert (Slamon, Clark et al. 1987). Zudem wurden kombinierte Modelle entwickelt, in denen transgene und knockout Mausmodelle mit p53-defizienten Mäusen gekreuzt wurden. So konnte gezeigt werden, dass eine p53-Defizienz entscheidende Auswirkungen auf Signalwege verschiedener Onkogene hat (McCormack, Weaver et al. 1998). Eine weitere Studie zeigte den synergistischen Effekt einer *Trp53*-Deletion kombiniert mit einer *Brca2*-Defizienz (Jonkers, Meuwissen et al. 2001). Interessanterweise ist eine *Trp53*-Deletion (*TP53*=Bezeichnung des Gens im Menschen) oder –Mutation im Gegensatz zur Her2-Amplifikation in Patienten erst in späten, invasiven Tumorstadien häufiger vorhanden und konnte nur selten in disseminierten Zellen festgestellt werden (Beckmann, Niederacher et al. 1997; Klein, Blankenstein et al. 2002).

Tabelle 1 Mausmodelle für das Mammakarzinom (Cardiff, Moghanaki et al. 2000)

	Onkogen-Manipulation	Herkunft des Onkogens	Promotor	Mausstämme
Wachstumsfaktoren				
TGF α	wt TGF α	Mensch	MMTV	C57BL; DBA
TGF α	wt TGF α	Ratte	WAP	C57BL/6;SjL/J
TGF α x <i>neu</i>	wt TGF α	Mensch TGF α ; Ratte neu	MMTV	C57BL x DBA x FVB
TGF α x <i>c-myc</i>	wt TGF α	Ratte TGF α ; Maus <i>c-myc</i>	WAP	C57BL; SJL
TGF α x Stat5a ^{-/-}	wt TGF α	Ratte	WAP	SvEv129; C57B6
FGF-3 (<i>int-2</i>)	wt FGF-3	Maus	MMTV	FVB/NHd; C57BLxCBA
Rezeptoren				
ErbB2/ <i>neu</i>	aktiviertes c-ErbB-2	Mensch	MMTV	C57BL/6 x CB6
ErbB2/ <i>neu</i>	wt neu	Ratte	MMTV	FVB; Balb/c
ErbB2/ <i>neu</i>	aktiviertes neu	Ratte	MMTV	FVB; CD1; Balb/c
ErbB2/ <i>neu</i>	Knock-in wt neu	Ratte	Endogenes neu	Balb/c/129 x FVB
ErbB2/ <i>neu</i> x TGF α	aktiviertes neu, wt TGF α	Ratte neu, Mensch TGF α	MMTV	C57BL x DBA; FVB
Differenzierung				
<i>Wnt-1</i>	wt <i>Wnt-1</i>	Maus	MMTV	C57BL; SJL; FVB/N
<i>Wnt-1</i> x <i>Int-2</i>	wt <i>Wnt-1</i> , wt <i>Int-2</i>	Maus	MMTV	C57BL; SJL; FVB/N
<i>Wnt-1</i> x ERa ^{-/-}	wt <i>Wnt-1</i>	Maus	MMTV	C57BL; SJL; FVB/N
<i>Wnt-1</i> x VP	wt <i>Wnt-1</i>	Maus <i>Wnt-1</i> , Ratte VP	MMTV	C57BL; SJL; FVB/N; Balb/c
Notch (<i>int-3</i>)	Mutiertes <i>int3</i>	Maus	MMTV	FVB/N
Notch (<i>int-3</i>)	Mutiertes <i>int3</i>	Maus	MMTV	FVB/N
Signaltransduktion				
PyV-mT	wt PyV-mT	Virus	MMTV	FVB/N
PyV-mT	Mutiertes shc	Virus	MMTV	FVB/N
PyV-mT	Mutiertes PI-3'	Virus	MMTV	FVB/N
PyV-mT x Ets2 ^{+/-}	wt PyV-mT	Virus	MMTV	FVB/N; Swiss/Black
PyV-mT x <i>src</i> ^{-/-}	wt PyV-mT	Virus	MMTV	FVB/N
PyV-mT x <i>yes</i> ^{-/-}	wt PyV-mT	Virus	MMTV	FVB/N
Ha- <i>ras</i>	Aktiviertes Ha- <i>ras</i>	Mensch	WAP	C57BL/6xSjL
c-Ha- <i>ras</i>	Aktiviertes Ha- <i>ras</i>	Mensch	WAP	C57BL/6xSjL
v-Ha- <i>ras</i>	v-Ha- <i>ras</i>	n. sp.	MMTV	C3HxC57BL/6; BALB/
N- <i>ras</i>	wt N- <i>ras</i>	n. sp.	MMTV	B6D2; CD-1
Ha- <i>ras</i> x <i>c-myc</i>	Aktiviertes c-Ha- <i>ras</i> , wt <i>myc</i>	Mensch <i>ras</i> , Maus <i>myc</i>	WAP/ <i>ras</i> , MMTV/ <i>myc</i>	CD1; C57BL/6; SjL
v-Ha- <i>ras</i> x <i>c-myc</i>	v-Ha- <i>ras</i> , wt <i>myc</i>	<i>ras</i> (n. sp.), Maus <i>myc</i>	MMTV	CD-1;C57BL/6J
Zellzyklus				
<i>c-myc</i>	<i>c-myc</i>	Maus	MMTV	CD-1;C57BL/6J
<i>c-myc</i>	<i>c-myc</i>	Maus	WAP	C57BL/6 x SjL
<i>c-myc</i>	<i>c-myc</i> , wt TGF α	Maus <i>myc</i> , Mensch TGF α	MMTV	FVB; CD-1 x C57B6/J
<i>c-myc</i>	<i>c-myc</i> , wt TGF α	Maus <i>myc</i> , Ratte TGF α	WAP	C57BL/6; SJL
<i>c-myc</i>	<i>c-myc</i> , aktiviertes Ha- <i>ras</i>	Maus <i>myc</i> , Mensch <i>ras</i>	WAP	C57BL/6 x SjL

n. sp.=nicht spezifiziert; MMTV=Maus-Mammatumorvirus; WAP=*whey acidic protein*;

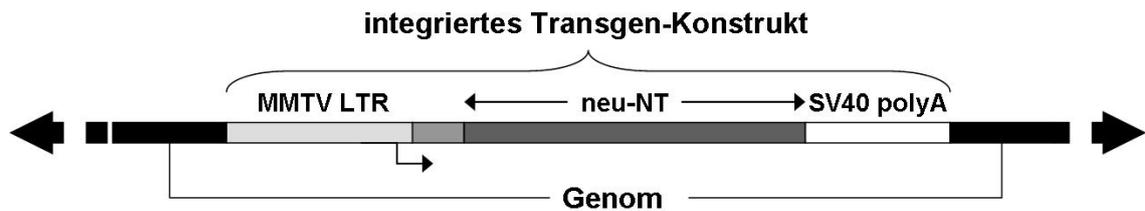


Abbildung 4 Konstrukt des integrierten Transgens

Nach Klonierung in einem Vektor (pBR322) wurde das Konstrukt des Transgens, welches aus dem MMTV-LTR, dem mutierten Her2-Transgen (*neu-NT*) und dem SV40-polyA-Signal besteht, in das murine Genom integriert (Muller, Sinn et al. 1988).

Das Balb-neuT Mausmodell

Es gibt eine Vielzahl von transgenen Mausmodellen, die unter anderem mit Hilfe des MMTV-Promotors entwickelt und etabliert wurden, um Mammakarzinome in den transgenen Mäusen zu erzeugen (Tabelle 1). Das in das Genom der Mäuse integrierte Konstrukt besteht aus der transkriptionell aktiven MMTV-LTR-Region, dem Onkogen (*neu-NT*) und der SV40 polyA-Erkennungssequenz (Abbildung 4). Das Onkogen *neu-NT* stammt aus der Ratte und entspricht dem Homolog des humanen Her2. Dieses Gen enthält eine Punktmutation, so dass anstelle der Aminosäure Valin an der Position 664 Glutaminsäure eingebaut wird, welches zur Induzierung von Neuroblastomen in der Ratte führt. Diese Mutation befindet sich in der Transmembran-Domäne des Rezeptors und hat eine mehr als 100-fach stärkere Kinase-Aktivität zur Folge. Diese Aktivitätssteigerung ist dadurch zu erklären, dass die mutierte Form des Neu-Proteins im Vergleich zur Wildtyp-Variante in einem höheren Maße phosphoryliert ist (Bargmann and Weinberg 1988). Darüber hinaus kommt es zu einer bevorzugten konstitutiven Dimerisierung des mutierten Proteins. Das ursprüngliche Mausmodell mit dem Konstrukt MMTV-*neu-NT* wurde auf dem genetischen Hintergrund des FVB Inzucht-Mausstamms etabliert (Muller, Sinn et al. 1988). Das Transgen-Konstrukt wurde im Folgenden in den genetischen Hintergrund des CD1-Mausstamms integriert (Lucchini, Sacco et al. 1992). Durch Verpaarung dieser CD1-Her2/*neu*-positiven Mäuse mit wt-Balb/c-Mäusen wurde das Her2/*neu*-Transgen in den genetischen Hintergrund der Balb/c-Maus eingebracht (Boggio, Nicoletti et al. 1998). Daraus folgt die Bezeichnung „Balb-neuT“. Es zeigte sich, dass die Progression der Mammakarzinome in den verschiedenen Mausstämmen unterschiedlich schnell verläuft.

1.4 Die Biologie des epithelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2

Der epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor Her2 gehört zur EGFR-Familie, welche

wiederum der Klasse der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) angehört. Häufig verwendete Synonyme für Her2 sind EGFR2, erbB2, neu oder p185. Die RTK sind auf der Oberfläche von Zellen exprimiert und spielen in der Weitergabe von extrazellulären Reizen auf intrazelluläre Signalwege eine entscheidende Rolle. Die extrazelluläre Rezeptor-Domäne nimmt dabei das Signal (z.B. über Wachstumsfaktoren) auf und leitet es über eine Transmembran-Domäne an die intrazelluläre Domäne weiter, welche über eine Kinase-Aktivität verfügt und somit den jeweiligen Signalweg über Phosphorylierung anschaltet. Die EGFR (Her1, Her2, Her3, Her4) bilden nach Bindung der Liganden (z.B. EGF, Neuregulin (NRG)) Homodimere oder Heterodimere (Abbildung 5A), wodurch eine Transphosphorylierung der intrazellulären Kinase-Domäne ausgelöst wird. Erst dann ist die Signal-Weiterleitung möglich (Yarden 2001). Die unterschiedlichen Rezeptoren können verschiedene Liganden binden, um die Dimerisierung einzugehen. Aus der Vielzahl an Bindungspartnern und Dimerisierungsmöglichkeiten resultiert ein vielfältiges Signalnetzwerk, das im Folgenden an dem Beispiel des Heterodimers der Rezeptoren Her2 und Her3 näher erläutert wird. Die Sonderstellung dieser beiden Rezeptoren erschließt sich zum einen aus der Tatsache, dass Her3 keine eigene Kinase-Aktivität besitzt, so dass ein Homodimer dieses Rezeptors nicht zu einer Signal-Weiterleitung führt und demnach inaktiv ist. Her3 benötigt folglich einen Heterodimerisierungspartner um aktiv zu werden. Zum anderen wird davon ausgegangen, dass Her2 keine Liganden-Bindungsstelle besitzt, da bisher noch kein Ligand gefunden wurde, der eine Homodimerisierung auslöst (Tzahar and Yarden 1998; Klapper, Glathe et al. 1999). Her2 kann jedoch ohne Bindung eines Liganden alle möglichen Heterodimere eingehen und aktiv werden, so dass es auch als Co-Rezeptor bezeichnet wird. Interessanterweise führt gerade die Kombination aus Kinase-inaktivem (Her3) und Liganden-losem (Her2) Rezeptor zum aktivsten Dimer-Komplex. Die Bindung des Liganden NRG führt zu der Dimerisierung von Her2 und Her3 (Abbildung 5A), so dass das Signal nach Transphosphorylierung in die Zelle weitergeleitet und dadurch Signalwege stimuliert werden können (Abbildung 5B). Zu diesen gehört der MAPK-Signalweg, der über die Interaktion des Dimers mit Grb2 oder Shc aktiviert wird und über Transkriptionsfaktoren die Zellproliferation auslöst. Des Weiteren wird PI3K aktiviert und damit der Akt-Signalweg ausgelöst, welcher unter anderem durch anti-apoptotische Signale für ein Überleben der Zellen sorgt. Darüber hinaus werden weitere Signalwege wie PLC γ und JAK/STAT aktiviert, die ebenfalls die Zellproliferation auslösen können.

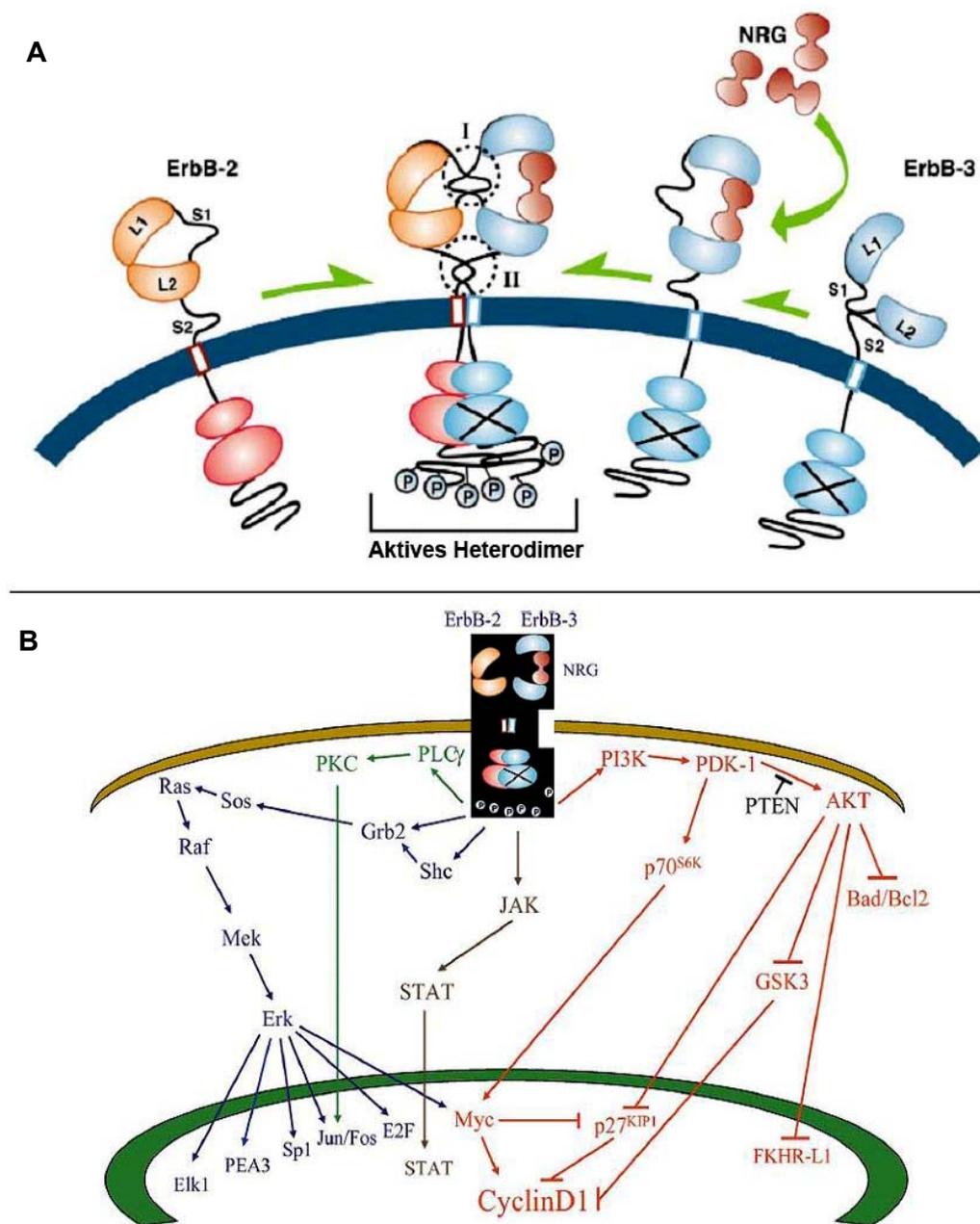


Abbildung 5 Schematische Darstellung von Struktur und Signalnetzwerk der EGFR

A) Die extrazelluläre Domäne wird repräsentiert durch zwei Cystein-reiche (S1 und S2) und zwei Cystein-freie Regionen (L1 und L2). Durch die Interaktion von S1 und S2 inhibiert sich Her3 (ErbB-3, blau) selbst. Die bivalente Bindung des Liganden Neuregulin an L1 und L2 hat eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne zur Folge, wodurch S2 eine Dimerisierung eingehen kann. Im Fall von Her2 (ErbB-2, orange) interagieren L1 und L2 miteinander, so dass kein Ligand gebunden werden kann und S1 zur Dimerisierung frei ist. Dimerisierung von Her2 und Her3 wird hauptsächlich durch die jeweiligen S1-Regionen vermittelt und zusätzlich von der transmembranen und intrazellulären Domäne stabilisiert. Die Dimerisierung hat eine intrazelluläre Transphosphorylierung zur Folge, wodurch das Dimer aktiv wird. Das Kreuz bei Her3 zeigt eine inaktive Kinase-Domäne an. **B)** Die Dimerisierung von Her2 und Her3 führt zu einer Aktivierung entscheidender Signalwege, die eine gesteigerte Zellteilung und -proliferation auslösen. Zu diesen Signalwegen gehören auf der einen Seite ERK/MAPK, PLC γ und JAK/STAT, die über Transkriptionsfaktoren (z.B. Myc) einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus haben. Auf der anderen Seite wird der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert, der anti-apoptotische Signale auslöst und das Überleben der Zellen begünstigt. (Citri, Skaria et al. 2003).

Inaktivierung und Degradation von EGFR

Nach der Bindung des Liganden und Bildung der Dimere werden diese Komplexe relativ schnell durch Endozytose internalisiert (Abbildung 6). Mit dem Abbau und der Regenerierung der Dimere bestehen nun zwei Möglichkeiten der weiteren Prozessierung, die von einer Art Adaptor-Protein (c-Cbl) kontrolliert werden. Die Bindung von c-Cbl, die aufgrund der Phosphorylierung der Tyrosin-Reste an der intrazellulären Domäne des Rezeptors erfolgt, löst die Ubiquitinierung und folglich den Abbau des Rezeptors in einem Proteosom aus. Erfolgt die Bindung von c-Cbl nicht, wird der Rezeptor wieder an die Zelloberfläche gebracht und damit regeneriert. In beiden Fällen werden die gebundenen Liganden in den Endosomen abgebaut. Die verschiedenen EGFR weisen eine unterschiedliche Affinität zu c-Cbl auf, so dass auch die verschiedenen Dimere eine unterschiedlich starke Tendenz zu den beiden Möglichkeiten der Prozessierung zeigen. Auf der einen Seite zeigt Her1 eine starke Bindung zu c-Cbl, so dass Homodimere tendenziell eher degradiert werden. Auf der anderen Seite zeigt Her2 nur eine schwache Affinität zum Adaptor, und Her3 und Her4 können überhaupt nicht gebunden werden (Levkowitz, Klapper et al. 1996). Bei Her3 geht man daher von einer konstitutiven Regenerierung aus (Waterman, Sabanai et al. 1998).

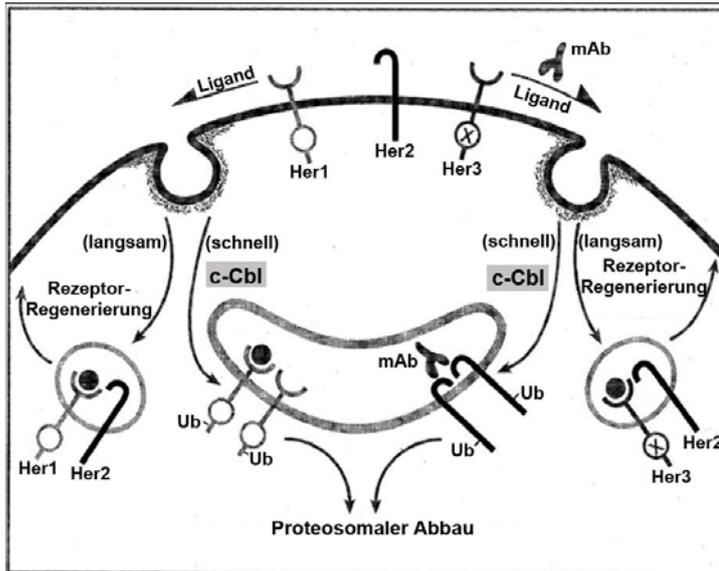


Abbildung 6 Abbau der EGF-Rezeptoren → Schrift größer; mAb weg

Die Rezeptoren werden nach Liganden-Bindung und Dimerisierung als Komplex durch Endozytose internalisiert. Das Adaptor-Molekül c-Cbl kann durch Bindung an der intrazellulären Domäne die Ubiquitinierung und folglich die Degradation des Rezeptors auslösen. Dieser Vorgang läuft relativ schnell ab. Wird c-Cbl jedoch nicht gebunden, werden die Rezeptoren auf langsamen Weg wieder regeneriert. Der Einsatz eines monoklonalen Antikörper (mAb) bindet an Her2 (ErbB-2) und bewirkt eine Homo-Dimerisierung, wodurch eine Endozytose ausgelöst wird, und der Rezeptor abgebaut werden kann (Harari and Yarden 2000).

Die Bedeutung von Her2 für die Tumorigenese

Aufgrund der beschriebenen aktivierten Signalwege spielen die EGFR eine entscheidende Rolle in der malignen Tumorentwicklung (Badache and Goncalves 2006). Dabei nimmt Her2 aufgrund verschiedener Eigenschaften eine besondere Stellung ein. Her2 kann ohne die Bindung von Liganden Heterodimere bilden, wobei es zudem noch der bevorzugte Dimerisierungspartner der anderen EGFR ist (Tzahar, Waterman et al. 1996; Graus-Porta, Beerli et al. 1997). Darüber hinaus besitzt Her2 die aktivste Kinase-Domäne, und Her2-Dimere tendieren eher zur Regenerierung. Dies hat zur Folge, dass die Signal-Weiterleitung verlängert wird. Durch die Überexpression von Her2 auf epithelialen Zellen werden also ständig Signale zur Zellteilung und Proliferation weitergegeben (Abbildung 7). Eine solche Überexpression in Mammakarzinomen korreliert daher mit einem malignen, aggressiven Tumorwachstum und folglich mit einem schlechten Überleben der Patienten (Slamon, Clark et al. 1987). Zudem wird die Überexpression von Her2 mit einer erhöhten Angiogenese, Invasion, Befall der Lymphknoten und Metastasierung assoziiert (Slamon, Godolphin et al. 1989; Ross and Fletcher 1998).

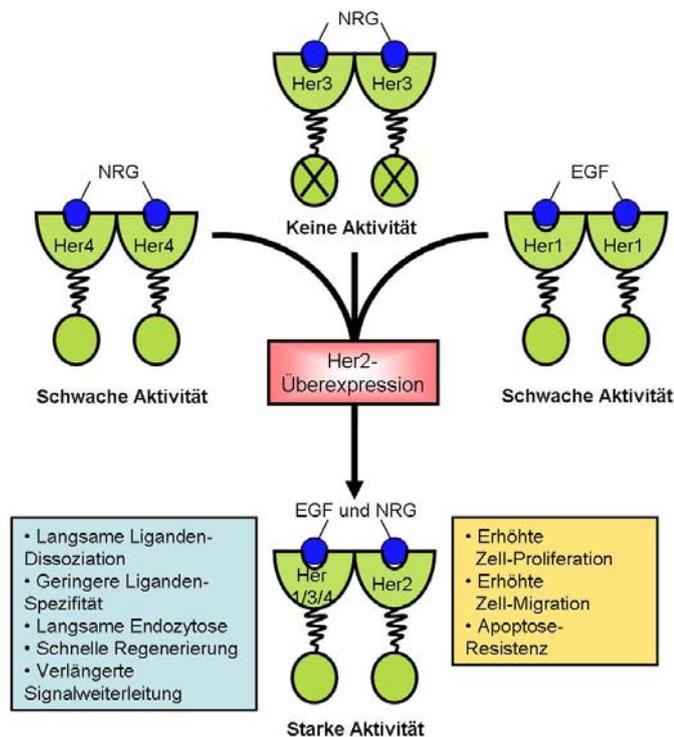


Abbildung 7 Folgen der Überexpression von Her2

Im Normalfall ist die Signalweiterleitung der EGFR durch Bindung der Liganden (EGF oder NRG) relativ schwach. Aufgrund einer Überexpression von Her2, gehen die übrigen EGFR bevorzugt eine Heterodimerisierung mit Her2 ein. Dadurch werden die Dimer-Komplexe langsamer abgebaut, schneller regeneriert und somit eine verlängerte Aktivität erzielt. So werden Proliferation und Migration verstärkt, sowie Apoptose inhibiert (Yarden and Sliwkowski 2001).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Thema dieser Dissertation ist die Analyse der systemischen Tumorprogression des Mammakarzinoms anhand eines Mausmodells. Die Auswahl fiel dabei auf das Balb-neuT-Modell, da Her2 nicht nur ein bekanntes Onkogen ist und einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Überleben von Brustkrebspatienten darstellt, sondern auch in disseminierten Tumorzellen einer frühen Amplifikation unterliegt. Zudem hat das Balb-neuT-Modell die praktischen Vorteile, dass neben der kontrollierbaren Tumorprogression aufgrund der Überexpression von Her2 auch die gestreuten Tumorzellen somit nachweisbar sind. Mit Hilfe dieses Modells soll ein besseres Verständnis über die Relevanz von disseminierten Tumorzellen in Bezug auf das Auswachsen solider Fernmetastasen erzielt werden. Darüber hinaus soll über die gesamte Entwicklung des Mammakarzinoms, von atypischer Hyperplasie bis zum invasiven Karzinom, der Disseminierungs- bzw. Metastasierungsstatus untersucht werden, um Aufschlüsse über den Zeitpunkt einer systemischen Ausbreitung zu erhalten. Die systemische Streuung

sollte abgesehen von der Expression des Her2/neu-Transgens über weitere klinisch etablierte epitheliale Zellmarker untersucht werden, da bisher wenige Kenntnisse über disseminierte Tumorzellen in Mausmodellen existieren. Eine weiterführende molekulare und funktionelle Analyse dieser ektopen Tumorzellen sollte Aufschlüsse über ihre Eigenschaften, insbesondere das metastastische Potential, liefern. Schließlich ist es Ziel dieser Arbeit ein Modell zu entwickeln, welches die Situation in der Patientin angemessen simuliert. Dieses Modell soll neue Erkenntnisse über die minimale residuale Erkrankung nach Resektion des Primärtumors einbringen, welche zu einer Metastasierung und schließlich zum Versterben führt.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Arbeiten mit Mäusen

Alle Arbeiten an Mäusen wurden im Mausstall des Instituts für Immunologie durchgeführt. Der Antrag zu Tierversuchsvorhaben mit Balb/c- und Balb-neuT-Mäusen wurde von der Regierung Oberbayern genehmigt (Az. 209.1/211-2531-108/04).

2.1.1.1 Zucht des Balb-neu-T-Mausmodell

Wt-Balb/c-Weibchen werden mit männlichen Balb/c-Mäusen verpaart, die das Her2/neu-Transgen hemizygot tragen. Für die anschließende Genotypisierung wird den Nachkommen die Schwanzspitze abgeschnitten. Um an die DNA zu gelangen werden 250 µl eines Lysis-Puffers den Schwanzspitzen zugegeben. Für den Lysis-Puffer werden die Lösungen A und B für die Genotypisierung 1:1 gemischt und mit Proteinase K (Endkonzentration: 0,12 mg/ml) versetzt (die Zusammensetzung aller Lösungen und Puffer sind in 2.2 angegeben). Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 56°C. Am nächsten Tag wird die Proteinase K 10-15 min bei 95°C inaktiviert. Zur Genotypisierung der Mäuse wird nun eine Kontroll-PCR für das Transgen durchgeführt (s. 2.1.6). Dazu wird das Primerpaar MTV/BRL und ein zusätzliches Primerpaar, welches an der endogenen Sequenz von Her2 bindet, zur Kontrolle verwendet (Her2 GG 3'/5' oder Her2 AT 3'/5'; alle Primersequenzen sind unter 2.1.6 aufgeführt). Nach Auswertung der PCR mit einer Gelelektrophorese auf einem 1,5%-Agarose-Gel (s. 2.1.7) lässt sich bestimmen, welche Mäuse das Transgen tragen oder nicht.

2.1.1.2 Tötung und Dissektion der Mäuse

Die Mäuse werden mittels CO₂-Begasung erstickt oder durch Genickbruch getötet. Danach folgt die komplette Entfernung des Brustgewebes. Die 10 Brustdrüsen werden dabei einzeln entnommen. Des Weiteren werden Lunge, Leber, Gehirn, Milz und die Knochen beider Hinterläufe (Femora und Tibiae) seziiert. Alle Gewebe- und Organ-Proben werden bis zur jeweiligen Weiterverarbeitung (s. 2.1.2) in PBS bzw. RPMI-Medium bei

4°C maximal 4 Std. gelagert.

2.1.1.3 Orthotope Transplantation von Brustgewebe

Gewebeentnahme

Die Transplantation wurde in Anlehnung an das Protokoll von DeOme et al. durchgeführt (Deome et al. 1959). Zuerst muss das zu transplantierende Brustgewebe aus der Spender-Maus (transgen oder wt) entfernt werden. Dazu wird die Spender-Maus getötet, die vierte Brustdrüse (rechts oder links) entnommen und ein Gewebestück von maximal 2x2x2 mm zurechtgeschnitten. Bis zur Transplantation wird das Gewebestück in PBS auf Eis gelagert (max. 90-120 min.). Für mögliche spätere Analysen werden auch hier alle weiteren Organe sowie das Knochenmark entnommen.

Durchführung der Transplantation

Im Folgenden wird die Empfänger-Maus (wt-Balb/c) für die Transplantation vorbereitet, die maximal 21-24 Tage alt sein dürfen, da bis zu diesem Zeitpunkt das Brustepithel bis maximal zum Lymphknoten ins Fettgewebe eingewachsen ist. Dazu wird sie zunächst gewogen, um anschließend das Narkotikum entsprechend dosieren zu können (10 µl/g KGW). Die Gebrauchslösung des Narkosemittels setzt sich folgendermaßen zusammen:

Ketavet (Wirkstoff: (Phencyclidin/Ketamin)	0,5 ml
Rompun (Xylazin)	0,25 ml
PBS	5 ml

Gebr.-Lsg.: 1 mg Rompun/10 mg Ketavet pro ml

Die Injektion erfolgt intraperitoneal. Nach dem Eintreten der vollständigen Narkose bleiben zirka 45 min Zeit für den anschließenden operativen Eingriff. Die narkotisierte Maus wird nun rasiert, um Körperhaare von der Wunde fernzuhalten, und dann auf einer temperierten Oberfläche (Heizdecke) fixiert (Leukoplast), um einer Unterkühlung vorzubeugen. Mit Augensalbe (Liposilk) werden die Augen vor dem Austrocknen bewahrt. Die oberste Hautschicht wird nun mit einem halben „Y“-Schnitt aufgeschnitten. Im nächsten Schritt wird die vierte Brustdrüse (rechts oder links) von endogenem Brustepithel befreit (von der Brustwarze bis zum Lymphknoten). Die Drüsengänge haben zu diesem Zeitpunkt das Fettgewebe noch nicht vollständig infiltriert (s.o.), wodurch sich das Brustepithel vollständig entfernen lässt. Große Gefäße in der Umgebung des Eingriffs werden mit einem Elektro-Kauter (Fine Science Tools) verödet, um ein Ausbluten durch versehentliche Verletzung der Gefäße zu verhindern. Anschließend wird in dem sauberen

Fettgewebe der Empfänger-Maus eine Tasche präpariert, in die das 2x2 mm große Transplantat hineingelegt wird. Abschließend wird die Wunde bzw. der Y-Schnitt mit 3-4 Stichen zugenäht. Bis zum Aufwachen verbleibt die Maus auf der Heizdecke oder unter einer Wärmelampe. Aufgrund des Eingriffs werden die transplantierten Empfänger-Mäuse in den ersten drei Tagen nach der OP dreimal täglich mit einem Tropfen Novalgin (Schmerzmittel) behandelt, gut beobachtet und das Wohlbefinden überprüft.

2.1.1.4 Operation des transplantierten Brustgewebes

Zum gewünschten Zeitpunkt kann das Transplantat bzw. der Tumor aus den Empfänger-Mäusen wieder entnommen werden. Auch bei diesem operativen Eingriff muss die Maus vollständig narkotisiert werden. Dazu wird das Narkotikum (Ketavet/Rompun) in gleicher Konzentration und Dosierung der Gebrauchslösung (s. 2.1.1.3; 10 µl/g KGW) intraperitoneal verabreicht. Nach Eintreten der Narkose und Rasur des Bauchfells wird die Maus auf einer beheizten Oberfläche fixiert (Leukoplast) und die oberste Hautschicht aufgeschnitten. Anschließend werden das Transplantat und die entsprechende komplette vierte Brustdrüse entnommen. Nach Versorgung der Wunde, verbleibt die Maus bis zum Aufwachen auf der beheizten Decke, wird die ersten Tage 3 x täglich mit Novalgin nachbehandelt und bis zum Versuchsende beobachtet.

2.1.1.5 Knochenmark-Transplantation

Für die Transplantation wurden ausgewachsene (11.-12. Woche) wt-Balb/c-Mäuse verwendet, die am Tag -2 mit einer Dosierung von 550 rad zum ersten Mal in der bestrahlt wurden (Bestrahlungsanlage: Gamma Cell 40 – low dose rate laboratory irradiator). Daraufhin werden die Mäuse bis zum Versuchsende (Tötung/Dissektion) in speziellen Filterkäfigen gehalten, um das Infektionsrisiko zu minimieren. Am Tag 0 erfolgte die zweite Bestrahlung der Rezipienten mit derselben Intensität (550 rad). Diese zweimalige Bestrahlung ist für die Maus letal.

Ebenfalls am Tag 0 werden die Spender-Mäuse (Her2/neu-transgen und wt-Balb/c als Kontrolle) getötet, die Organe und das Knochenmark aus den Femora und Tibiae beider Hinterläufe entnommen. Dazu werden die Knochen mit einer Kanüle (26G) und PBS ausgespült. Für weitere Untersuchungen an den Spender-Mäusen, werden die Organe später aufgearbeitet (s. 2.1.2). Die Suspension aus Knochenmarkzellen hingegen wird

umgehend zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch einen Filter (20 µm) gefiltert. Nach der Zellzählung werden aus einer Spendermaus jeweils möglichst 10×10^6 Knochenmarkzellen in drei bestrahlte Empfänger-Mäuse intravenös (Schwanzvene) injiziert. Für die Injektion werden 26G-Kanülen verwendet. Nach Injektion bzw. Transplantation von Knochenmarkzellen werden die Mäuse in Filterkäfigen gehalten und bis Versuchsende beobachtet.

2.1.2 Verarbeitung der Gewebe- und Organ-Proben

2.1.2.1 Paraffin-Einbettung

Die seziierten Gewebe-Proben (in PBS gelagert) werden in einer 4% PFA (Paraformaldehyd)-Lösung für mindestens acht Stunden fixiert. Daraufhin werden die Proben mehrmals in PBS gewaschen. Es folgt eine Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 60 min 70%, 85% und 100% Ethanol). Anschließend wird das fixierte und dehydrierte Gewebe zweimal 30 min in 100% Xylol gewaschen. Das Waschen mit Xylol dient hierbei nicht nur der Entfernung des Alkohols aus dem Gewebe, sondern erleichtert auch das Eindringen des Paraffins während des nachfolgenden Einbettens. Nach drei Inkubationsschritten mit Paraffin (Parablast embedding media) werden die Gewebe-Proben schließlich eingebettet. Die Lagerung erfolgt bei RT.

2.1.2.2 Gefrierkonservierung

Eine weitere Möglichkeit, Gewebe-Proben (aus RPMI-Medium) zu konservieren, besteht darin, das Gewebe nach der Sektion in flüssigem Stickstoff schockzugefrieren. Das gefrorene Gewebe kann dann bei -80°C gelagert werden.

2.1.2.3 Knochenmarkaufarbeitung

Das Knochenmark der entnommenen Knochen, jeweils beide Femora und Tibiae, wird mit einer Kanüle (26G) und PBS ausgespült. Diese Suspension aus Knochenmarkzellen wird in einem 15-ml-Falcon-Zentrifugenröhrchen bis zu 10 ml mit Hank's Salzlösung aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 170 g), um grobe Verunreinigungen wie Fett und Thrombozyten

zu entfernen. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpräzipitat mit 7 ml PBS resuspendiert. In einem Falcon-Röhrchen werden 7 ml einer 60% Percoll-Lösung mit der Zellsuspension vorsichtig überschichtet und zentrifugiert (10 min, 1000 g). Aufgrund dieser Dichtegradienten-Zentrifugation werden die mononukleären Zellen von den Erythrozyten getrennt und sammeln sich in der Interphase an. Diese Interphase wird in ein neues Röhrchen überführt. Zur Reinigung von Percollresten werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (10 min, 500 g). Nach Abnahme des Überstandes wird das Zellpräzipitat in 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Je nach weiterer Verwendung werden die Zellen in Suspension (PBS) belassen, auf die beiden Auftragsflächen von Adhäsionsobjektträger gegeben (250.000 Zellen pro Auftragsfläche) oder durch Zytospin auf herkömmliche Objektträger zentrifugiert (jeweils 250.000 Zellen). Die Knochenmark-Präparate auf Objektträgern werden über Nacht getrocknet und dann bei -20°C gelagert. Zellsuspensionen werden sofort weiter verarbeitet bzw. gefärbt (s. 2.1.3.4).

2.1.3 Immunzytochemie, -histochemie und -fluoreszenz

2.1.3.1 Verwendete Antikörper

Antigen/ Spezifität	Spezies	Konjugation	aus Spezies	Ig Isotyp	verwendete Konzentration/ Verdünnung	Bezeichnung im Text
c-erbB-2 (HER-2, neu)	Maus, Ratte, Mensch		Kaninchen	IgG	5 µg/ml	DLN-12082
EpCAM	Maus	Biotin	Ratte	IgG	6,7 µg/ml	G8.8-Bio
IgG	Kaninchen	Biotin	Ziege	IgG	5,5 µg/ml	D-111-065-144
IgG	Meer- schweinchen	Biotin	Ziege	IgG	1,6 µg/ml	D-106-065-003
IgG	Meer- schweinchen	Cy3	Ziege	IgG	15 µg/ml	D-106-165-003
IgG	Ziege	Biotin	Pferd	IgG	5 µg/ml	BA-9500
Neu (HER-2)	Maus, Ratte, Mensch		Ziege	IgG	0,4 µg/ml	Sc-284-G
Zytokeratin 8/18	Maus, Ratte, Mensch		Meer- schweinchen	IgG	1:200	GP11

Ig= Immunglobulin

2.1.3.2 Her2-Färbung auf Adäsions-Objektträgern

Die Knochenmarkzellen (KM-Zellen) auf den Adhäsionsobjektträgern werden mit TBS-Puffer (pH 7,6) rehydriert und die unspezifischen Bindungen auf den KM-Zellen zunächst

über 20 min durch das dem Puffer zugegebene Maus-Serum (5%) blockiert. Daraufhin werden die Zellen mit dem primären polyklonalen anti-Her2-Antikörper (DLN-12082) aus dem Kaninchen über 45 min inkubiert. Anschließend wird das Präparat mit dem sekundären Biotin-konjugierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (D-111-065-144) 25 min inkubiert. Im folgenden Schritt wird der Sekundärantikörper über einen Avidin-Biotin-Komplex (AB) mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt (30 min) (AB/AP-System, DAKO). Schließlich erfolgt die enzymatische Entwicklung des Substrats BCIP/NBT durch die alkalische Phosphatase zu einer blau-schwarzen Färbung über 10 min (Entwicklungssystem für AP-Konjugate; BioRad), welche in 1% PFA-Lösung fixiert wird (10 min). Nach jedem einzelnen Schritt wird jeweils dreimal 3 min mit TBS gewaschen. Als Positiv-Kontrolle wurde bei jeder Färbung ein Präparat der murinen Mammakarzinom-Zelllinie AG12 TUBO mitgefärbt. Zusätzlich wurde bei jeder Färbung als Negativkontrolle ein Präparat der genannten Zelllinie sowie des zu untersuchenden Knochenmarks mit Kaninchen-Serum anstelle des Primärantikörpers mitgeführt. Es wurde zur Auswertung der Färbung ein Adhäsionsobjektträger (500.000 Zellen) unterm Mikroskop nach positiv-gefärbten Zellen durchsucht und die absolute Anzahl bestimmt.

2.1.3.3 CK-Färbung auf Adhäsionsobjektträgern

Die immunzytochemische Färbung gegen die Zytokeratine 8 und 18 erfolgte nach demselben Protokoll, wie es in 2.1.3.2 beschrieben wurde. Primär wurden die Zellen mit dem anti-CK8/18-Antikörper (GP11) aus Meerschweinchen inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit dem sekundären biotinylierten anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper (D-106-065-003) inkubiert.

2.1.3.4 EpCAM-Färbung lebender Zellen in Suspension

Für die Immunfluoreszenz-Färbung gegen EpCAM werden die Knochenmarkszellen nach Aufarbeitung in Suspension belassen. Eine Fraktion von 500.000 dieser mononuklearen Zellen wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 10 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wird das Zellpräzipitat in 100 µl PBS mit 5% Maus-Serum resuspendiert und 15 min schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation wird das Zellpräzipitat in 100 µl der primären Antikörper-Lösung aufgenommen: biotinylierter anti-EpCAM-Antikörper (G8.8-Bio) aus der Ratte in 5% Maus-Serum-PBS-Lösung. Der Antikörper bindet an der extrazellulären Domäne von EpCAM. Nach einer Inkubation von 15 min bei

4°C auf einem Schüttelgerät wird die Zell-Suspension zentrifugiert. Zur Visualisierung des gebundenen Antikörpers wird nun 100 µl Streptavidin-Cy3-Lsg. (D-016-160-084 in 5% Maus-Serum-PBS-Lsg.) hinzugegeben und für 15 min. im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Schließlich werden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und bis zur Auswertung unterm Fluoreszenz-Mikroskop im Cy3-Filter werden die Zellen bei 4°C und im Dunkeln gelagert. Hier erfolgt keine Fixierung mit 1% PFA, da die positiv-gefärbten Zellen im Normalfall am selben Tag zur RNA-Aufarbeitung (2.1.5) isoliert werden. Zwischen allen Versuchs- und Inkubationsschritten wurde für 10 min mit 500 g zentrifugiert, das Zellpräzipitat mit 500 µl PBS gewaschen und nochmals für 10 min und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Zur Optimierung dieses Protokolls und als Positiv-Kontrolle wurde die Ag12-TUBO-Zelllinie bei jedem Versuchsansatz mitgeführt.

2.1.3.5 CK-/ EpCAM-Doppelfärbung auf Objektträgern

Die Knochenmarkzellen auf den Zytospin-OT werden zunächst mit TBS-Puffer (pH 7,6) rehydriert und die unspezifischen Bindungen auf den mononuklearen Zellen mit dem enthaltenen Maus-Serum (10%) über 20 min blockiert. Anschließend erfolgt die Inkubation (30 min) mit dem primären polyklonalen anti-CK8/18-Antikörper (GP11). Durch die Inkubation (20 min; im Dunkeln) mit dem sekundären Cy3-konjugierten anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper (D-106-165-003) wird der primäre Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Daher erfolgen die folgenden Versuchsschritte im Dunkeln. Im nächsten Schritt werden mit 10% Maus-Serum die freien Fc-Gruppen blockiert (20 min). Im Folgenden werden die Zytospin-OTs mit dem primären Biotin-konjugierten anti-EpCAM-Antikörper (G8.8-Bio) für 30 min inkubiert. Über die Biotin-Konjugation wird der zweite primäre Antikörper nun mit alkalischer Phosphatase gekoppelt (30 min) (AB/AP-System, DAKO). Durch die alkalische Phosphatase wird das Substrat des ELF-Entwicklungssystems (ELF-97, Invitrogen) umgesetzt. So kann auch der zweite Primär-Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden, dessen Emission auf einer anderen Wellenlänge als Cy3 liegt und im DAPI-Filter sichtbar ist. Als Positivkontrolle diente hierbei ein Präparat der murinen Mammakarzinom-Zelllinie Ag12 TUBO. Zwischen jedem einzelnen Inkubations- bzw. Blockierungsschritt wird dreimal 3 min mit TBS gewaschen. Bis zur Auswertung der Färbung unter einem Fluoreszenzmikroskop werden die OTs in TBS bei 4°C im Dunkeln gelagert. Es wurden jeweils zwei Präparate pro Maus (2 x 250.000 Zellen) ausgewertet.

2.1.3.6 CK-/ Her2-Doppelfärbung auf Objektträgern

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CK8/18 und Her-2 erfolgt nach demselben Protokoll wie 2.1.3.5. Die Knochenmarkszellen auf den Zytospin-OT werden zunächst mit TBS-Puffer (pH 7,6) rehydriert und die unspezifischen Bindungen auf den mononuklearen Zellen mit dem enthaltenen Maus-Serum (10%) über 20 min blockiert. Anschließend erfolgt die Inkubation (30 min) mit dem primären polyklonalen anti-CK8/18-Antikörper (GP11). Durch die Inkubation (20 min; im Dunkeln) mit dem sekundären Cy3-konjugierten anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper (D-106-165-003) wird der primäre Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Daher erfolgen die folgenden Versuchsschritte im Dunkeln. Im nächsten Schritt werden mit 10% Maus-Serum die freien Fc-Gruppen blockiert (20 min). Im Folgenden werden die Zytospin-OTs mit dem primären anti-Her2-Antikörper (DLN-12082) für 30 min inkubiert. Nun erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Biotin-konjugierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (D-111-065-144) über 25 min. Auch erfolgt die Kopplung mit alkalischer Phosphatase durch das AB/AP-System. Durch die alkalische Phosphatase wird das Substrat des ELF-Entwicklungssystems (ELF-97, Invitrogen) umgesetzt. So kann auch der zweite Primär-Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden, dessen Emission auf einer anderen Wellenlänge als Cy3 liegt und im DAPI-Filter sichtbar ist. Als Positivkontrolle diente hierbei ein Präparat der murinen Mammakarzinom-Zelllinie Ag12 TUBO. Zwischen jedem einzelnen Inkubations- bzw. Blockierungsschritt wird dreimal 3 min mit TBS gewaschen. Bis zur Auswertung der Färbung unter einem Fluoreszenzmikroskop werden die OTs in TBS bei 4°C im Dunkeln gelagert. Es wurden jeweils zwei Präparate pro Maus (2 x 250.000 Zellen) ausgewertet.

2.1.3.7 Gewebeschnitte, Hämatoxylin-/Eosin-Färbung und Mikrodissektion

Mit Hilfe eines Mikrotoms bzw. Kryotoms werden Schnitte (5 µm) von in Paraffin eingebetteten bzw. gefrorenen Gewebeproben angefertigt. Diese werden entweder auf Objektträger gezogen, die für die spätere Lasermikrodissektion mit einer Polyethylenmembran (1,35 µm) beschichtet sind, auf Superfrost-Objektträger für spätere immunhistochemische Färbungen oder auf herkömmliche Glasobjektträger für histologische Untersuchungen gebracht und anschließend getrocknet.

Die Paraffinschnitte werden zweimal 10 min in 100% Xylol entparaffiniert. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 min 100%, 90%, 70%

Ethanol) und dann mit bidestilliertem Wasser rehydriert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Mayer's Hämatoxylinlösung (0,1%) für 2-3 min. Anschließend wurden die Schnitte zur Bläuung 15-30 min in Leitungswasser gestellt. Die Färbung des Zytoplasmas erfolgte mit angesäuertem Eosin (0,1%; + ein paar Tropfen Eisessig) für 2 min. Diese Gegenfärbung wurde für Referenzschnitte und histologische Untersuchungen angestellt. Bei Präparaten für die Lasermikrodissektion entfällt die Eosin-Färbung, da sie sich negativ in der primären PCR auswirkt. Anschließend werden die Präparate 1 min in dH₂O gestellt, und es folgt eine aufsteigende Alkoholreihe (je 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol). Vor dem Einbetten in dem Einschlussmittel (Eukitt) werden die Präparate nochmals 10 min mit 100% Xylol behandelt. Die H/E-Färbung von Schnitten aus gefrorenem Gewebe-Material erfolgt analog zu den Paraffinschnitten, wobei jedoch das Entparaffinieren und die absteigende Alkoholreihe am Anfang entfallen.

Die histologischen Untersuchungen an den Organen der Mäuse wurden zum Teil von einem Pathologen (Prof. Piero Musiani; Aging Research Centre, G. d' Annunzio University Foundation, Chieti, Italy) durchgeführt, der auch die weiteren histologischen Analysen bestätigt hat (Abbildung 8, Abbildung 20, Abbildung 26, Abbildung 27 und Abbildung 29).

Die Folien-beschichteten Präparate für die Lasermikrodissektion (LMD), die nur mit Mayer's Hämatoxylin gefärbt wurden, werden bei 42°C über Nacht getrocknet. Auf den H/E-gefärbten Referenzschnitten (Folgeschnitte) werden Tumorareale oder Metastasen gesucht. Die gewünschten Areale können so einfacher auf den Folien-Präparaten wiedererkannt und markiert werden. Durch das PALM-Laser-Microbeam-System werden die entsprechenden Areale mikrodissektiert und anschließend mit einem Laserimpuls in einen Tropfen PCR-Öl am PCR-Gefäßdeckel katapultiert. Eine Gesamtgröße des gelaserten Areals von 150.000 µm² bei Gefrierschnitten bzw. 250.000 µm² bei Paraffinschnitten liefert optimale Ergebnisse in der folgenden PCR (Stoecklein, Erbersdobler et al. 2002). Nach Zentrifugation auf den Grund des Reaktionsgefäßes erfolgen der Aufschluss des gelaserten Gewebematerials mit Proteinase K und die globale Amplifikation der mRNA analog zum Abschnitt 2.1.5.

2.1.3.8 Immunhistochemische Färbung gegen Her2 auf Gewebeschnitten

Für die immunhistochemische Färbung gegen Her2 wurden Gefrierschnitte auf Superfrost-Objektträgern verwendet. Es wurden für diese Färbung zwei unterschiedliche Entwicklungssysteme verwendet, wodurch sich die Protokolle ein wenig unterscheiden.

Nach der ersten Methode erfolgt zuerst die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 10% Maus-Serum in TBS (pH 7,6) über 20 min. Die Blockierungslösung wird verworfen und es folgt eine weitere Blockierung des endogenen Avidins mit Biotin ebenfalls für 20 min. Im Folgenden wird der primäre anti-Her2-Antikörper (sc-284-G) aus der Ziege für 30 min auf die Präparate gegeben. Nun wird mit dem sekundären Biotin-konjugierten anti-Ziege-IgG-Antikörper (BA-9500) für 25 min inkubiert. Über das AB/AP-System wird alkalische Phosphatase angehängt (; 25 min), welche das Substrat des Entwicklungssystems BCIP/NBT im nächsten Schritt umsetzt und nach 10 min zu einer blau-schwarzen Färbung führt. Abschließend werden die gefärbten Präparate für die mikroskopische Auswertung mit Glyceringelatine eingedeckelt. Zwischen jedem Versuchsschritt wird 3 x 3 min mit TBS gewaschen.

Bei Verwendung des anderen Entwicklungssystems wird anfangs 10 min mit 10% H₂O₂ und 10% Maus-Serum blockiert. Der nächste Unterschied betrifft den Avidin-Biotin-Komplex. In diesem Protokoll wird der sekundäre Antikörper mit Peroxidase gekoppelt (AB/HRP-System, DAKO). Abschließend erfolgt der enzymatische Umsatz des DAB-Farbstoffs (DAB-Entwicklungssystem, DAKO), so dass eine Bindung des Antikörpers durch eine bräunliche Färbung zu erkennen ist.

2.1.4 Isolierung einzelner Tumorzellen und Einzelzell-PCR

2.1.4.1 Isolierung von Adhäsions-Objektträgern

Die gefärbten Zellen werden durch Mikromanipulation von den Objektträgern isoliert. Dazu werden die Haft-Objektträger aus den verschiedenen Färbungen vorher mit PBS + 0,5% Igepal überschichtet und in ein Invert-Mikroskop eingespannt. Die einzelnen Zellen werden mit Hilfe einer Glaskapillare vorsichtig von der Oberfläche der Adhäsionsobjektträger gelöst und aufgesaugt. Die isolierten Zellen werden nun mit der Glaskapillare in ein Feld (Pickfeld) eines 8-Feld-Objektträgers überführt, das vorher mit BSA (Bovines Serum Albumin) und dann ebenfalls mit PBS + 0,5% Igepal überschichtet wurde, so dass die Zellen sich gut lösen können. Anschließend erfolgt die Aufnahme der einzelnen gefärbten Zelle in 1 µl PBS (0,5% Igepal) und der Transfer in ein 200-µl-Reaktionsgefäß.

2.1.4.2 Isolierung aus Suspension

Die gegen EpCAM gefärbte Zellsuspension wird auf vier mit BSA-überschichtete Felder eines 8-Feld-Objektträgers verteilt, so dass eine Zelldichte von ca. 150.000 Zellen/cm² erreicht wird. Nach dem Sedimentieren der Zellen (15-30 min) werden die Felder nach fluoreszierenden Zellen durchsucht. Positive Zellen werden ebenfalls durch Mikromanipulation auf das mit BSA und PBS überschichtete Pickfeld transferiert und in den Lysis-Puffer aufgenommen (s. Abschnitt 2.1.5).

2.1.4.3 Zellaufschluss durch Proteinase-K-Verdau

Die aufgenommene Zelle (1 µl) vom Adhäsionsobjektträger, wird in ein 200-µl-Reaktionsgefäß überführt, in das 2 µl einer Proteinase-K-Lösung vorgelegt wurden.

Proteinase-K-Lösung:

OnePhorAll plus Puffer	0,2 µl
Igepal 10%	0,13 µl
Tween 10%	0,13 µl
Proteinase K (10mg/ml)	0,26 µl
H ₂ O	1,28 µl
Isolierte Zelle	1 µl
Gesamtvolumen	3 µl

Über 10 Stunden werden die zellulären Proteine bei 42°C in der PCR-Maschine verdaut. Nach dem Verdau wird die Proteinase K 10 min bei 80°C inaktiviert.

2.1.4.4 Einzelzell-PCR

Durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *Mse* I (Schnittstelle T!TAA) wird das Genom einer Einzelzelle fragmentiert und gleichzeitig TA-Überhänge generiert. Der mit Proteinase K vorbehandelten Zelle werden dazu folgende Reagenzien zugeführt und anschließend bei 37°C über 3 Stunden inkubiert und verdaut.

Mse I-Verdau:

OnePhorAll plus Puffer	0,2 µl
<i>Mse</i> I (50 U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	1,6 µl
Proteinase-K-Reaktionsansatz	3 µl
Gesamtvolumen	5 µl

Danach erfolgt die Inaktivierung von *Mse* I bei 65°C (10 min). Im folgenden Schritt wird ein Adapter aus den zwei Oligonukleotiden LIB1 und dd*Mse*11 (Sequenzen sind in 2.2 unter Oligonukleotide und Primer angegeben; HPLC gereinigt) an die durch den Verdau generierten TA-Überhänge an den 5`-Enden ligiert. Die Basenpaarung des Adapters wird dabei durch ein langsames Abkühlen in der PCR-Maschine nach einem programmierten Gradienten (65°C bis 15°C für je 1 min pro Temperaturschritt) vor der Ligation erzielt. Im Reaktionsansatz befinden sich:

Adapter-Ansatz:

OnePhorAll plus Puffer	0,5 µl
LIB1 Primer (100 mM)	0,5 µl
dd <i>Mse</i> 11 Primer (100 mM)	0,5 µl
H ₂ O	1,5 µl
Gesamtvolumen der Adapter-Lösung	3 µl

Zu dem mit *Mse* I verdauten Genom der Einzelzelle (5 µl) werden der vorbehandelte Adapter (3 µl), sowie 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) und 1 µl ATP (10 mM) gegeben. Daraus ergibt sich ein Ligationsansatz von insgesamt 10 µl. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 15°C. Nach der Inkubation über Nacht wird der fragmentierten und an den Adapter ligierten DNA folgender PCR-Ansatz zugeführt:

Ansatz für primäre PCR:

Expand-Long-Template Puffer	3 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Expand-Long-Template Enzyme Mix (3,5 U)	1 µl
H ₂ O	35 µl
Ligationsprodukt (fragmentierte DNA)	10 µl
Gesamtvolumen	51 µl

Um eine Auffüllreaktion der 3`-rezessiven Enden der Fragmente zu erreichen, wird das Reaktionsgemisch zunächst für 3 min bei 68°C inkubiert. Es entstehen dadurch

komplementäre LIB1-Primerbindungsstellen.

Das Programm in der PCR-Maschine (MJ-Research) lautet:

	1 Zyklus	15 Zyklen	8 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus
94°C		40 s	40 s	40 s	
57°C – 65°C		57°C 30 s	57°C 30 s + 1°C/Zyklus	65°C 30 s	
68°C	3 min	1 min 30 s + 1s/Zyklus	1 min 45 s + 1s/Zyklus	1 min 53 s + 1s/Zyklus	3 min 40 s

Das PCR-Produkt (primäre Amplifikat) ist bei -20°C stabil und dient als Ausgangsmaterial für die weiteren Experimente.

2.1.5 Isolierung und Amplifikation von mRNA

Es wird nach Hartmann, C.H. verfahren (Hartmann 2006).

2.1.5.1 Aufarbeitung der genomischen DNA parallel zur mRNA

Es wird ebenfalls nach Hartmann, C.H. verfahren (Hartmann 2006).

2.1.6 Spezifische PCR und Genexpressionsanalyse

Mit Hilfe von spezifischen PCR wird die Qualität der primär amplifizierten genomischen DNA bestimmt und die Genexpressionsanalyse aus der in cDNA umgeschriebenen mRNA durchgeführt. Zudem wird die Genotypisierung der Mäuse anhand von spezifischen PCR durchgeführt. Als Matrize wurde daher entweder das primäre Amplifikat der Einzelzell-PCR (2.1.4.4), eine 1:10 Verdünnung der cDNA (2.1.5) oder das Produkt des PK-Verdau der Schwanzspitzen (2.1.1.1) verwendet.

Ansatz der Kontroll-PCR:

10 x PCR-Puffer	1 µl
Primer 5' (100 mM)	0,5 µl
Primer 3' (100 mM)	0,5 µl
BSA (20mg/ml)	0,25 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
H ₂ O	7,25 µl
Matrize	0,5 µl

Primer für genspezifische PCR, genomische DNA / Mse I-Fragmente:

Gen	5'-Primer	3'-Primer
Transgen (MMTV-Her2/neu)	GTA ACA CAG GCA GAT GTA GG	ATC GGT GAT GTC GGC GAT AT
Her2 (Her2 GG)	GAG ACG CTC AAC CTC AA TTG	GGC ACT TGT TGG TCT GTA G
Her2 (Her2 AT)	CAG ATT GTC TCA CCA GGT G	CTC ATT GCT ATT CCA AAT GCC

Primer für genspezifische PCR, cDNA :

Gen	5'-Primer	3'-Primer
alpha-Casein	CAG TAC CTT ACT CCC AAA GCT	ATG GAG GGT CCA CTC ACA TC
Lactalbumin	GAA TGC CTC TTC CCT AAG GC	GTC ACT AAG CAA GGG TTT GC
CD24	CTC CAG CAG ATT CAA TAG CG	GCA ACC ACA AGT CCA ATG TG
CD31	ATC GGC AAA CTG GTC AAG AG	ATG TTG CTG GGT CAT TGG AG
CD44	GAA AAA GCT GGT GAT CAA CGG	ATG TCC ACA CTC TGC AGA TTC
CD45	CTT GGC CTG AGC CTG TAT CT	CTC AGC AGT CCC ATT TCT TTG
Sca-1 (Ly6a)	AGC TCA GTC CTC CTG CAG A	TTT CAC ACA CTA CTC CCA CC
beta-Aktin	GTG ACA GCA TTG CTT CTG TG	TCT CAA GTC AGT GTA CAG GC

Das Programm in der PCR-Maschine (MJ-Research) lautet für DNA als Matrize:

	1 Zyklus	15 Zyklen	25 Zyklen	1 Zyklus
94°C	5 min	15 s	15 s	
58°C	30 sec	30 s	30 s	
72°C	2 min	20 s	30 s	2 min

Das Programm in der PCR-Maschine (MJ-Research) lautet für cDNA als Matrize:

	1 Zyklus	15 Zyklen	35 Zyklen	1 Zyklus
94°C	4 min	30 s	30 s	
58°C	30 s	30 s	30 s	
72°C	1 min	1 min	30 s	2 min

Die Annealingtemperatur kann zwischen den unterschiedlichen Primerpaaren variieren.

Kontrollen für die Expression der verschiedenen Gene:

Gen	cDNA aus
beta-Aktin	Mammagewebe
Lactalbumin	Mammagewebe
alpha-Casein	Mammagewebe
CD24	Mammagewebe
CD44	Mammagewebe
CD31	CD31+ Zelle (Immunfluoreszenz) aus der Lunge
CD45	CD45+ Zelle (Immunfluoreszenz) aus der Lunge
Sca-1	Mammagewebe

2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Amplifikate der spezifischen PCR (auf cDNA oder genomische DNA) werden durch Gelelektrophorese mit einer Konzentration von 1,5% Agarose in TBE-Puffer aufgetrennt. Jede Probe wird mit 1 µl Sybr-Gold (Stocklösung 1:1600 verdünnt) und 2 µl Ladepuffer gemischt und in die einzelnen Geltaschen geladen. In dem Gelelektrophorese-System werden die Amplifikate aus der PCR bei 160 V über 45 min aufgetrennt. Nach Visualisierung der aufgetragenen DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm, werden die Gele fotografiert.

2.1.8 Metaphasen-Präparation

2.1.8.1 Lymphozytenkulturen zur Gewinnung von Metaphasenchromosomen

Zur Gewinnung des Ausgangsmaterials für die Metaphasen-Objektträger wird einer ausgewachsenen weiblichen Balb/c-Maus (wt) die Milz entnommen. Die Milz wird durch den Filter (20 µm) zerdrückt. Durch das Spülen mit 3 ml reinem RPMI-Medium erhält man ein Lymphozytengemisch. Von dem vorher präpariertem Lymphozyten-Kulturmedium werden jeweils 22 ml in den Kulturflaschen vorgelegt. Dazu kommen jeweils 0,5 ml Lymphozytengemischs. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 48 h. Um die Zellteilung der Lymphozyten zu arretieren, werden nach der Inkubation jeweils 0,25 ml Colcemid (Konzentration der Stocklösung 10 µg/ml) pro Zellkulturflasche zugegeben und weitere 20 min inkubiert. Anschließend werden die Zellkulturen jeweils in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das Zellpräzipitat wird im Restmedium resuspendiert. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit 10 ml hypotoner Lösung (75 mM KCl) für 20-25 min bei 37°C behandelt. Dadurch erreicht man ein Aufquellen der Lymphozyten. Nach Ende der Inkubation werden die

Zellen erneut abzentrifugiert (10 min, 1000 rpm). Vom Überstand werden 9 ml verworfen. Das Zellpräzipitat wird vorsichtig in dem Rest (1 ml) resuspendiert und in ein 15- ml-Falcon-Röhrchen überführt. Abschließend wird die Zellsuspension dreimal in 5 ml Fixativ-Lösung bei -20°C gewaschen und zentrifugiert, um Reste von lysierten Erythrozyten zu entfernen. Die auf diesem Wege erhaltenen Zellsuspensionen können über mehrere Monate in 2-3 ml Fixativ-Lösung bei -20°C gelagert werden.

2.1.8.2 Präparation der Metaphasechromosomen

Zur Herstellung der für die CGH notwendigen Metaphasen-Objektträger müssen Glasobjektträger über Nacht in einer Küvette mit 100% unvergälltem Ethanol entfettet und gereinigt werden. Vor dem Auftropfen werden die Glasobjektträger für 10 min in destilliertem Wasser bei -20°C abgekühlt. Nun können die in Methanol-Eisessig fixierten Lymphozyten mit Transferpipetten aus einem Abstand von zirka 50 cm (Höhe wird angepasst) auf die Objektträger getropft werden. Die folgende Inkubation der Objektträger auf einer Heizplatte mit feuchten Tüchern verdampft das restliche Fixativ.

2.1.9 Markierungs-PCR

Die Produkte der primären PCR werden in Anwesenheit von Desoxynukleotid-Derivaten (Digoxigenin-11-dUTP zur Markierung der Proben-DNA und Biotin-16-dUTP zur Markierung der Referenz-DNA) reamplifiziert, die einen Teil der Thymidinbasen ersetzen. Durch diese Markierung können im Folgenden die Reamplifikate über Fluoreszenz-Detektionssysteme nach Hybridisierung auf den Metaphasen nachgewiesen werden (siehe CGH).

Der Reamplifikationsansatz besteht aus:

4 µl	Expand-Long-Template-Puffer 1
8 µl	LIB1 10 µM
1,5 µl	7/8 dNTP-Lösung (8,75 mM dTTP, je 10 mM dATP, dCTP und dGTP)
1,75 µl	1 mM Biotin-dUTP (Referenz) oder 1 mM Digoxigenin-dUTP (Probe)
1 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
24,25 µl	H ₂ O
0,5 µl	Produkt aus primärer PCR als Matrize

Die MJ-Research PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

	1 Zyklus	10 Zyklen
94°C	1 min	30 s
60°C	30 s	30 s
72°C	2 min	2 min + 20 s/Zyklus

Der LIB1-Primer wird nach der Reamplifikation durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym Tru I abgetrennt (Schnittstelle TITAA, Isoschizomer von Mse I). Durch diesen Schritt sollen mögliche störende Einflüsse des Adapters bei der CGH ausgeschlossen werden. Der Restriktionsverdau des Reamplifikats (41 µl) läuft über 3 h bei 65°C unter Zugabe von 2 µl Puffer R⁺ und 1 µl Tru I (50 U/µl).

2.1.10 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die markierten Reamplifikate von Test-DNA (primäre PCR-Produkte der einzelnen Tumorzellen) und Referenz-DNA (Pool aus drei bis fünf PCR-Produkten von normalen diploiden Zellen) werden in folgendem Ansatz über Nacht bei -20°C gefällt:

40 µl	PCR-Produkt der Test-DNA
40 µl	PCR-Produkt der Referenz-DNA
80 µl	Mouse C ₀ t-1 DNA 1 µg/µl
10 µl	Heringsperm-DNA 10 µg/µl
17 µl	NaAc 3 M pH 5,2
400 µl	EtOH 100%

Am nächsten Tag wird die präzipitierte DNA in einer Tischzentrifuge 45 min bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Präzipitat in 700 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut für 10 min zentrifugiert und schließlich luftgetrocknet. Nach vollständiger Trocknung wird die DNA bei 42°C für 45 min mit 6 µl 100% Formamid gelöst. Daraufhin werden 6 µl Dextransulfat-Lösung hinzugegeben und erneut unter Schütteln 45 min bei 42°C im Heizblock inkubiert. Anschließend erfolgt die Denaturierung der DNA-Probe für 6 min in einem Heizblock bei 78°C. Im Folgenden wird die C₀t-1 DNA mit der Test- bzw. Referenz-DNA bei 37°C für 30 min inkubiert, um mit repetitiven Sequenzen zu hybridisieren und eine unspezifische Bindung der Proben auf den Metaphasen zu verhindern.

In der gleichen Zeit, während der Behandlung der DNA-Probe, muss ein geeigneter Metaphasen-Objektträger von Zytoplasmaresten und RNA befreit und die darauf

befindliche DNA denaturiert werden. Dazu wird der Objektträger nach Equilibrierung in 2 x SSC zunächst für zirka 1 h bei 37°C mit 200 µl RNase A-Lösung (100 µg/ml in 2 x SSC) inkubiert. Durch dreimaliges Waschen für je 5 min in 2 x SSC wird die RNase A entfernt. In einem Wasserbad werden 100 ml 10 mM HCl auf 37°C erwärmt. Bei Erreichen der Temperatur werden 30 µl Pepsin-Lösung (Stocklösung 100 mg/ml) zugegeben. Der Metaphasen-Objektträger wird je nach Ausmaß der Zytoplasmareste 4 bis 5 min in der Pepsin-HCl-Lösung bei 37°C inkubiert. Der Pepsin-Verdau der Metaphasen wird durch zweimaliges Waschen in PBS gestoppt. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 85%, 100% EtOH bei 4°C) wird der Objektträger dehydriert. Parallel werden 100 ml Formamid-Lösung (70 ml Formamid 100%, 10 ml 20x SSC, 20 ml H₂O) in einem Wasserbad auf 70°C erhitzt. In dieser Lösung wird der Objektträger für 1 min 30 sec bis 2 min (muss den Metaphasen angepasst werden) denaturiert. Eine erneute Dehydrierung durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe wird der Objektträger getrocknet bevor die zu hybridisierende, vorbehandelte DNA-Probe aufgetragen wird. Das Hybridisierungsfeld wird durch ein kleines Deckgläschen abgedeckt und großzügig mit Montagekleber (Fixogum) verschlossen. Schließlich hybridisiert die Probe auf den Metaphasen über 2 bis 3 Nächte bei 37°C in einem Wasserbad. Dabei darf das Fixogum nicht gelöst werden, da sonst unter Umständen die DNA-Probe gewaschen werden könnte.

Das Deckgläschen wird nach der Hybridisierung zusammen mit dem Fixogum vorsichtig vom Objektträger gelöst. Durch viermaliges Waschen mit 4 x SSC (0,2% Tween 20) unter Schütteln wird die zähflüssige Dextransulfat-Lösung entfernt. Anschließend folgt ein noch stringenteres dreimaliges Waschen in SSC bei 60°C für je 5 min. Nach der Equilibrierung mit PBS (0,2% Tween 20) werden mögliche Proteinbindungsstellen auf dem Glas für 45 min mit 1 ml Superblock 3%-Lösung bei 37°C abgesättigt. Der Objektträger wird kurz mit PBS (0,2% Tween 20) abgespült bevor er mit einem Gemisch aus 20 µl Anti-Digoxigenin-FITC, 2 µl Avidin-Cy3.5 und 180 µl Superblock 1%-Lösung für 45 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundene Fluorochrome werden durch dreimaliges Waschen mit 4 x SSC (0,2% Tween 20) bei 42°C wieder entfernt. Abschließend wird die Chromosomenbänderung durch eine zweiminütige DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Der Objektträger wird kurz mit dH₂O gespült, um bei der Trocknung die Bildung von Salzkristallen zu verhindern, und schließlich unter Vectashield H-1.000 eingedeckelt.

Die Auswertung der CGH erfolgt durch ein Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera und entsprechender Software. Mit Hilfe des Programms Leica-QFISH werden pro Hybridisierung 8 bis 15 geeignete, vollständige Metaphasen mit den Fluoreszenzfiltern DAPI, FITC und Cy3.5 fotografiert und in digitalisierten Bilderserien abgespeichert. Die

einzelnen Chromosomen einer jeden Metaphase können mit Hilfe des Computerprogramms Leica-QCGH in ein Chromosomenschema sortiert werden. Die Software vergleicht daraufhin nach Normalisierung die entlang jedes Chromosoms integrierte Intensität der beiden Fluoreszenzkanäle (FITC für Test-DNA und Cy3.5 für Referenz-DNA). Nach Auswertung aller geeigneten Metaphasen wird deren durchschnittliches Verhältnis grafisch in einem entsprechenden CGH-Profil dargestellt. Bei einem Fluoreszenzintensitätsverhältnis von FITC zu Cy3.5 über 1,25 liegt ein Gewinn, bei einem Verhältnis unter 0,75 ein Verlust des entsprechenden Chromosomenabschnitts in der Test-DNA vor.

2.2 Material: Enzyme, Chemikalien, Puffer, Geräte, Oligonukleotide

Antikörper

BA-9500 (anti-Ziege-IgG; Biotin)	Vector Laboratories, USA
D-106-065-003 (anti-Ziege-IgG; Biotin)	Dianova, Hamburg
D-106-165-003 (anti-Ziege-IgG; Cy3)	Dianova, Hamburg
D-111-065-144 (anti-Kaninchen-IgG; Biotin)	Dianova, Hamburg
DLN-12082 (anti-c-erbB-2/-HER-2/-neu)	Dianova, Hamburg
G8.8-Bio (anti-EpCAM; Biotin)	Micromet, München
GP11 (anti-Zytokeratin 8/18, Maus/Mensch)	Progen, Heidelberg
Sc-284-G (anti-Neu/-HER-2)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Enzyme und Entwicklungssysteme

AB/AP-System	DAKO, Hamburg
AB/HRP-System	DAKO, Hamburg
<i>Aci</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-DIG-Fluorescein	Roche, Mannheim
Avidin-Cy3.5	Rockland, Gilbertsville, USA
BCIP/NBT	BioRad, München
<i>BsmA</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
DAB	DAKO, Hamburg
ELF-97	Invitrogen, Karlsruhe

Expand Long Template Enzyme Mix	Roche, Mannheim
<i>Hae</i> III	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Mbo</i> I	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Mse</i> I 50 U/μl	New England Biolabs, Frankfurt
Panscript Taq-Polymerase	PAN Biotech, Aidenbach
Pepsin	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
<i>Sau</i> 96 I	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Sfa</i> N I	New England Biolabs, Frankfurt
Streptavidin-Cy3 (D-016-160-084)	Dianova, Hamburg
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim
<i>Tru</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Chemikalien

Agarose GTG Seakem	Biozym, Hess. Oldendorf
ATP	Roche, Mannheim
BCIP/NBT (AP Color Reagent)	BioRad, München
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA Fraktion V	Paesel + Lorej, Hanau
BSA für PCR	Roche, Mannheim
Colcemid	Sigma, Deisenhofen
DAB	DAKO, Hamburg
DAPI	Roche, Mannheim
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Biosciences, Freiburg
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
Digoxigenin-11-dUTP	Roche, Mannheim
DNA-Größenmarker (1kb Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Eosin	Sigma, Deisenhofen

Ethanol unvergällt	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Eukitt (Einschlussmittel)	O. Kindler GmbH, Freiburg
Expand-Long-Template Puffer 1	Roche, Mannheim
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Fixogum (Montagekleber)	Marabu, Tamm
Formamid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Hämatoxylinlösung (Mayer's)	Sigma, Deisenhofen
Hering-Sperma-DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Kaninchen-Serum	DAKO, Hamburg
Ketavet (Anästhetikum)	Pfizer, Karlsruhe
Liposic (Augensalbe)	Dr. Mann Pharma, Berlin
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Maus-Serum	DAKO, Hamburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Mouse C ₀ t-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
NEB Puffer 2	New England Biolabs, Frankfurt
NEB Puffer 3	New England Biolabs, Frankfurt
NEB Puffer 4	New England Biolabs, Frankfurt
Novalgine	Sanofi-Aventis, Frankfurt
OPA Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Parablast embedding media (Paraffin)	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCR-Öl	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Sigma, Deisenhofen

Percoll	Amersham Biosciences, Freiburg
Phytohämagglutinin M-Form	Invitrogen, Karlsruhe
Puffer R	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rompun (Analgetikum)	Bayer, Leverkusen
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend)	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
SYBR Gold (10.000 x Konzentrat)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Sigma, Deisenhofen
Vectashield	Linearis, Hamburg
Wasser (LiChrosolv für Chromatographie)	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

Puffer und Lösungen

10 x PCR-Puffer:	Tris (100 mM), MgCl ₂ (10 mM), KCl (500 mM), dNTP's (1 mM); pH 8,5
PBS:	Na ₂ HPO ₄ (8,5 mM), KH ₂ PO ₄ (2 mM), NaCl (150 mM); pH 7,4
SSC:	NaCitrat (15 mM), NaCl (150 mM); pH 7,4
TBE:	Tris (89 mM), Borat (89 mM), EDTA (2 mM); pH 8,3
TBS:	Tris (50mM), NaCl (150 mM); pH 7,6
Lösung A (Genotypisierung):	KCl (100 mM), Tris/HCl (10 mM), MgCl ₂ (2,5 mM)
Lösung B (Genotypisierung):	Tris/HCl (10 mM), MgCl ₂ (2,5 mM), TWEEN 20 (1%), Igepal (1%)
Lymphozyten-Kulturmedium:	500 ml RPMI-Medium ohne L-Glutamin; 62,5 ml FCS, 750 µl Concanavalin A (5 µg/µl), 625 µl LPS (1:1000), 750 µl 0,5% β-Mercaptoethanol
Dextransulfat-Lösung:	Dextransulfat 30% in 4x SSC
Superblock 3%-Lösung:	Tween 0,2%, BSA Fraktion V 3%, FCS 5% in PBS pH 7,5
Superblock 1%-Lösung:	Tween 0,2%, BSA Fraktion V 1%, FCS 5% in PBS pH 7,5
Ladepuffer:	6,25 g Ficoll, 375 µl Laufpuffer-Stamm-Lsg. in 25 mlTBE

Laufpuffer-Stammlösung:	10 mg Bromphenolblau, 10 mg Xylencyanol in 1 ml H ₂ O
Fixativ-Lösung:	75% Methanol, 25% Eisessig
DAPI-Färbe-Lösung:	0,2% Tween 20, 10 µg DAPI in 1 ml 4 x SSC)
PFA-Lösung:	1% bzw. 4% Paraformaldehyd in PBS

Oligonukleotide und Primer

Alle Oligonukleotide und Primer wurden von der Firma Metabion in München synthetisiert.

β-Aktin 5'	GTG ACA GCA TTG CTT CTG TG
β-Aktin 3'	TCT CAA GTC AGT GTA CAG GC
alpha-Casein 5'	CAG TAC CTT ACT CCC AAA GCT
alpha-Casein 3'	ATG GAG GGT CCA CTC ACA TC
CD24 5'	CTC CAG CAG ATT CAA TAG CG
CD24 3'	GCA ACC ACA AGT CCA ATG TG
CD31 5'	ATC GGC AAA CTG GTC AAG AG
CD31 3'	ATG TTG CTG GGT CAT TGG AG
CD44 5'	GAA AAA GCT GGT GAT CAA CGG
CD44 3'	ATG TCC ACA CTC TGC AGA TTC
CD45 5'	CTT GGC CTG AGC CTG TAT CT
CD45 3'	CTC AGC AGT CCC ATT TCT TTG
ddMse11 (Adapter)	TAA CTG ACA G-ddC
Her2 AT 5'	CAG ATT GTC TCA CCA GGT G
Her2 AT 3'	CTC ATT GCT ATT CCA AAT GCC
Her2 GG 5'	GAG ACG CTC AAC CTC AA TTG
Her2 GG 3'	GGC ACT TGT TGG TCT GTA G
Lactalbumin 5'	GAA TGC CTC TTC CCT AAG GC
Lactalbumin 3'	GTC ACT AAG CAA GGG TTT GC
LIB1 (Adapter)	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
Sca-1 (Ly6a) 5'	AGC TCA GTC CTC CTG CAG A
Sca-1 (Ly6a) 3'	TTT CAC ACA CTA CTC CCA CC
Transgen 5' (MTV)	GTA ACA CAG GCA GAT GTA GG
Transgen 3' (BRL)	ATC GGT GAT GTC GGC GAT AT

Geräte

Brutschrank	Heraeus 6000
CCD-Kamera	Photometrix
Elektro-Kauter	Fine Science Tools, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMXA-RF8
Gamma Cell 40 (Bestrahlungsanlage)	Atomic Energy of Canada limited, Kanata, Kanada
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Heizplatte	Bachofer
Horizontal Gelelektrophorese	Invitrogen
Invertmikroskop	Leica DM IRB
Kryotom	Leica Jung Frigocut 2800 E
Kühlzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417 R
Lasermikrodissektionsmikroskop	P.A.L.M., Bernried
Medimaschine	DAKO, Hamburg
Mikromanipulator	Microinjector 5242, Eppendorf
Mikrotom	Leica RM 2025
MJResearch (PCR-Maschine)	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Spannungsquelle (Agarose-Gel)	EPS 200, Pharmacia Biotech
Thermoprinter	Sony
UV-Schirm	INTAS
Videokamera (Agarose-Gel)	INTAS
Wasserbad	Lauda MT2
Zentrifuge (Knochenmark)	Eppendorf Centrifuge 5810 R
Zytospin	Hettich Rotofix 32

OP-Besteck für die chirurgischen Eingriffe an der Maus wurde von der Firma Heiland bezogen.

Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger	Micromet
Deckgläschen	Langenbrinck
Filter (20 µm)	Schleicher und Schuell

Glas-Küvetten	Roth
Kanülen (26G)	Braun
Kulturflaschen (Cellstar)	Greiner
Nahtmaterial	Ethicon
Objektträger (Mattrand)	Langenbrinck
Petrischale	Greiner
Pipetten	Gilson
Polyethylenmembranen	P.A.L.M. Microlaser Technologies
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Thermo-Fast 96, Abgene
Transferpipetten	Sarsted

2.3 Abkürzungen

Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten und chemische Elemente gemäß ihrer Bezeichnung im Periodensystem abgekürzt. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde nach dem Duden verfahren. Aufgrund der Einheitlichkeit wird durchweg die murine Schreibweise für Proteine bei der Bezeichnung von Her2 verwendet, auch wenn sich im Text auf das codierende Gen bzw. auf das humane Protein/Gen bezogen wird.

AB	Albumin
ADH	atypische duktale Hyperplasie
AK	Antikörper
BCIP	5-Bromo-4-chloroindol-3-ol Dihydrogenphosphatester Mono-p-toluidiniumsalz
BSA	Bovines Serum Albumin
CCD	Charge-coupled Device (Kamera)
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
CK	Zytokeratin
Cy3.5	Cyanin Dye 3.5
DAPI	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DCIS	duktales <i>in situ</i> Karzinom

ddH ₂ O	Aqua dest
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
g	Beschleunigung
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICC	Immunzytochemie
IgG	Immunglobulin G (Isotypkontrolle)
IHC	Immunhistochemie
i.v.	intravenös
KGW	Körpergewicht
KM	Knochenmark
LCIS	lobuläres <i>in situ</i> Karzinom
LK	Lymphknoten
LMD	Lasermikrodissektion
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LOH	loss of heterozygosity
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	long terminal repeat
MMTV	Maus-Mammatumovirus
Mr	Molekulargewicht
MRD	minimal residuale Krebserkrankung
n.d.	keine Daten vorhanden
OP	Operation
OPA Plus	One Phor All Plus
OT	Objektträger
PBS	Phosphatbuffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
RKI	Robert Koch Institut
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen

SSC	Salins-Sodiumcitrat
SV40	Simianes Virus 40
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Trisbuffer Saline
TDLE	terminale ductulo-lobuläre Einheit
TEB	terminal end bud
Tris	Trishydroxymethyl
TSG	Tumorsuppressorgen
UDH	normale duktale Hyperplasie
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp

3 Ergebnisse

3.1 Das Balb-neuT Mausmodell

In dieser Arbeit wurde mit einem etablierten Mausmodell (Balb-neuT) gearbeitet. Das Her2/neu-Transgen (Muller, Sinn et al. 1988), inklusive MMTV-LTR und SV40 polyA-Erkennungssequenz, ist in den genetischen Hintergrund des Balb/c-Stamms integriert worden (Boggio, Nicoletti et al. 1998). Aufgrund der Expressionskontrolle durch den MMTV-Promotor wird das aktivierte Her2/neu-Transgen mit Beginn der Mamma-Entwicklung und Pubertät (ab Woche 4) infolge der Ausschüttung von Steroid-Hormonen exprimiert. Die Expression des Transgens führt zu einer Tumorprogression in allen 10 Brustdrüsen.

3.1.1 Lokale Tumorprogression in Her2-transgenen Mäusen

Zunächst wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Geigl die lokale Tumorprogression im Balb-neuT-Mausmodell untersucht. Mit Beginn der Pubertät (3-4 Wochen postnatal), also zeitgleich mit der Antwort auf die Ausschüttung der Steroidhormone Östrogen und Progesteron, startet die Expression des integrierten konstitutiv aktiven Her2/neu-Gens. Ab Woche 7-9 sind Verdickungen an den Enden der Drüsengänge, den so genannten TEBs (*terminal end buds*), erkennbar. Bei der histologischen Analyse von Gewebeschnitten waren zu diesem Zeitpunkt einzelne ADH in den Brustdrüsen aufzufinden (Abbildung 8A), was sich an dem mehrschichtigen Epithel der Drüsengänge erkennen ließ. Das Lumen dieser Gänge verengt sich im Verlauf bis es schließlich ganz von neoplastischen Zellen ausgefüllt ist. Die Progression dieser neoplastischen Drüsen zum *in situ* Karzinom tritt zwischen der 14. bis 18. Woche auf. Invasive Karzinome sind ab Woche 23 zu erkennen (Abbildung 8B). Die Mäuse wurden bei einem Tumordurchmesser von ca. 2 cm getötet, wobei die Mäuse ein Alter von ca. 30 Wochen erreichten. In den wt-Balb/c Mäusen sind zu gleichen Zeitpunkten die Brustdrüsen histologisch untersucht worden. Dabei konnten ausschließlich Drüsen mit einschichtigem Epithel ohne Anzeichen von Hyperplasie oder Neoplasie nachgewiesen werden (Abbildung 8C). Neben der morphologisch-histologischen Analyse des Brustgewebes wurde der durchschnittliche maximale Tumordurchmesser mit einer Schieblehre gemessen (Abbildung 8D). Dazu wurden jeweils alle 10 Brustdrüsen von insgesamt 53 Mäusen, die sich auf die jeweiligen Altersgruppen verteilen, untersucht. Auch hier zeigt sich die kontinuierliche lokale Tumorprogression.

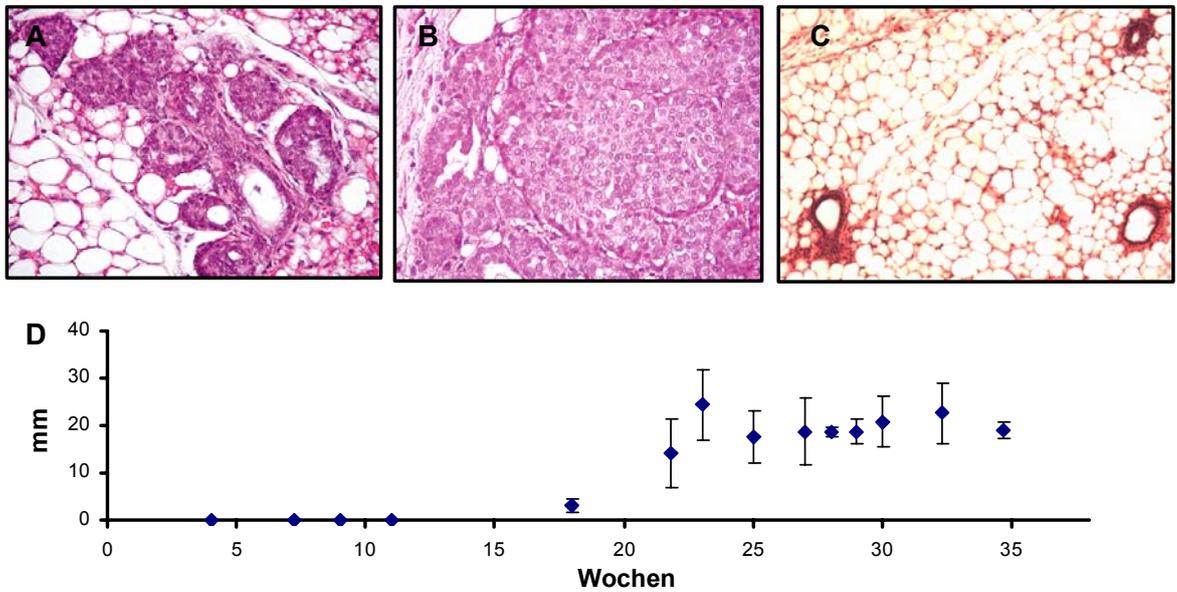


Abbildung 8 Lokale Tumorprogression im Balb-neuT-Mausmodell

A-B) H/E-Färbung von 5- μ m-Paraffinschnitten der Brustdrüsen von transgenen Mäusen. **A)** Die ADH ist aufgrund des mehrschichtigen Epithels in Brustdrüsen aus der 9. Woche zu erkennen (x200). **B)** In den Brustdrüsen der 27. Woche sind kompakte invasive Tumore zu erkennen, die keine Drüsenstruktur mehr aufweisen (x200). **C)** Die Drüsengänge in der Mamma einer wt-Balb/c-Maus aus der 23. Woche sind von einem einschichtigen Epithel umgeben (x100). **D)** Zeitlicher Verlauf des maximalen Tumor-Durchmessers. (Die unterschiedlichen Farben in den Abbildungen A-C resultieren aus der Betrachtung mit unterschiedlichen Mikroskopen bzw. Kameras).

3.1.2 Systemische Tumorprogression im Balb-neu-T Mausmodell

Zur Untersuchung einer systemischen Streuung des Primärtumors im Mausmodell wurde das Lungengewebe und Knochenmark den transgenen Tieren entnommen, da diese Organe häufig von einer Metastasierung in Brustkrebspatientinnen betroffen sind. Nach der anschließenden Aufarbeitung der Proben wurden verschiedene Methoden verwendet, um eine systemische Erkrankung zu untersuchen (Abbildung 9).

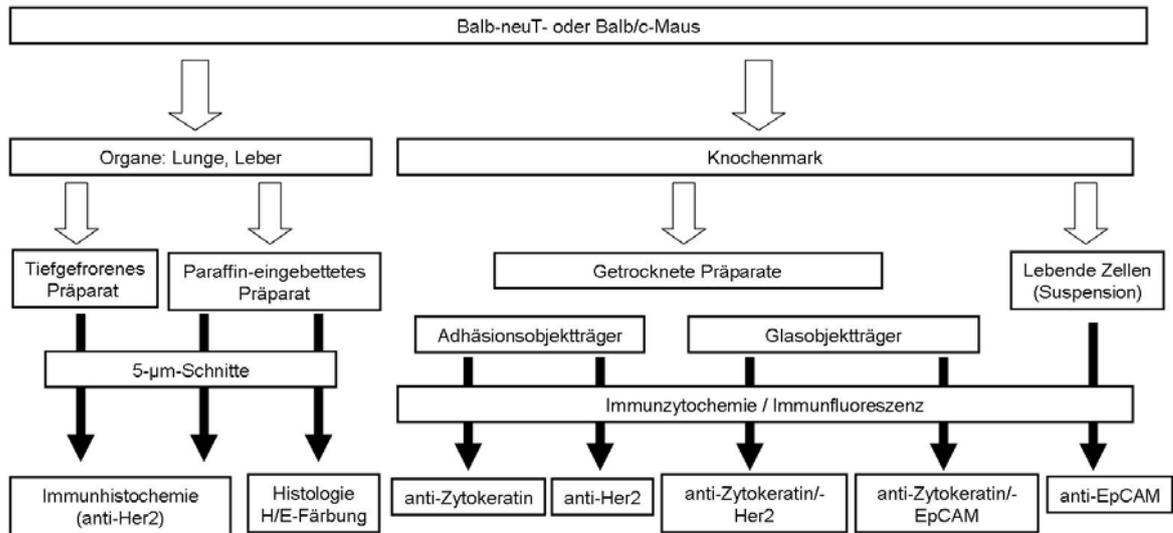


Abbildung 9 Übersicht zur Untersuchung der systemischen Erkrankung

Den dissezierten Mäusen wurden die Lunge und das Knochenmark entnommen. Die unterschiedliche Aufarbeitung des Gewebes/Knochenmarks ermöglicht klassische Histologie (H/E-Färbung) und Immunfärbungen.

3.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von Lungenmetastasen

In der Lunge von Her2-transgenen Mäusen sind ab einem Alter von 27 Wochen Metastasen bereits makroskopisch zu erkennen. Durch die histologische Untersuchung (H/E-Färbung) von Gewebeschnitten wurden Knoten und Tumoren in den Lungen der transgenen Mäuse gefunden (Abbildung 10A). Da das normale umliegende Lungenepithel Her2 nicht exprimiert, konnte anhand einer immunhistochemische Färbung gegen Her2 (Antikörper: sc-284-G) festgestellt werden, dass es sich um metastasierte Tumorzellen aus den Brustdrüsen handelt (Abbildung 10B). Um nun zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt die Metastasierung in der Lunge sichtbar wird, erfolgte die immunhistochemische Analyse der Lungen von transgenen Mäusen zu den Zeitpunkten, an denen die lokale Tumorprogression evaluiert wurde. Dazu wurden Gewebeschnitte in 50 µm Abständen auf Glasobjektträger angefertigt. So wurden vereinzelt Her2+ Zellen und Aggregate in transgenen Mäusen (Woche 9) bereits zu einem Zeitpunkt gefunden, zu dem sich keiner der zehn möglichen Primärtumoren in einem invasivem Stadium befand (Abbildung 10C). Zur Kontrolle wurden Gewebeschnitte der Lunge aus wt-Balb/c Mäusen ebenfalls gegen Her2 gefärbt, wobei in keinem Fall der Antikörper gebunden wurde.

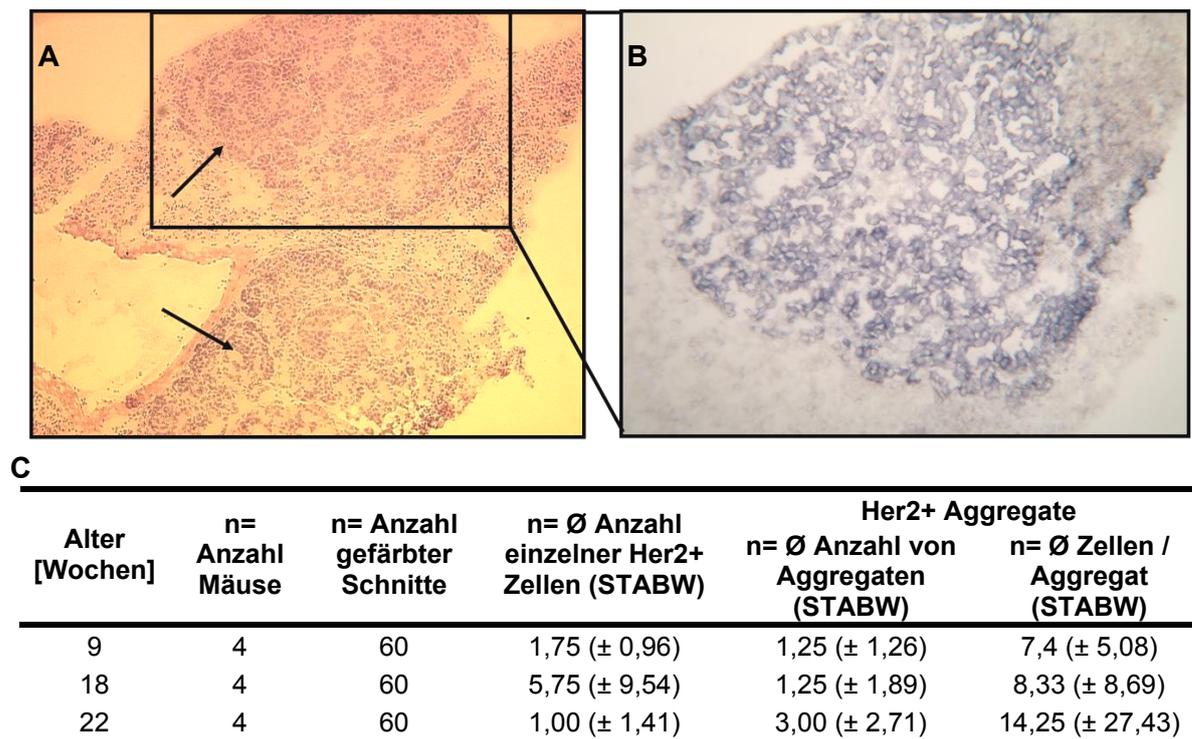


Abbildung 10 Her2+ Fernmetastasen

A) H/E-gefärbter Kryoschnitt der Lunge einer transgenen Maus (Woche 25). Die Tumoren (Pfeile) sind aufgrund einer kompakten, drüsenartigen Struktur vom übrigen Lungenepithel zu unterscheiden (x100). **B)** Immunhistochemisch gegen Her2 gefärbter Folgeschnitt von **A** zeigt eine starke Färbung des Tumors im Gegensatz zum ungefärbten umliegenden Lungenepithel (x200). **C)** Ergebnis der Auszählung Her2+ Zellen und Aggregate in der Lunge transgener Mäuse (Daten in Zusammenarbeit mit Dr. Geigl ermittelt).

3.1.4 Expression mammaspezifischer Gene in Lungenmetastasen

Bisher konnten in den Lungen der Balb-neuT-Mäuse Knoten und Tumoren festgestellt werden, die aufgrund der Her2-Positivität wahrscheinlich ihren Ursprung in den primären Mammakarzinomen haben. Diese Annahme sollte im Folgenden durch Expressionsanalyse von mammaspezifischen Genen bestätigt werden. Dazu wurde die mRNA aus mikrodisektierten Areale der Lungentumore nach Hämatoxylin-Färbung isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde die Qualität der cDNA-Proben mit einem Primerpaar kontrolliert, welches auf dem Haushalts-Gen beta-actin bindet. Für die weiteren Analysen wurden ausschließlich Proben verwendet, die eine positive Bande für β -Aktin (214 bp) in der Agarose-Gelelektrophorese aufwiesen (Abbildung 11). Daraufhin wurden spezifische PCR auf den cDNA-Proben der mikrodisektierten Arealen mit Primern angesetzt, die auf der Transkript-Sequenz der mammaspezifischen Gene Lactalbumin und alpha-Casein binden. Für die Positiv-Kontrolle wurden cDNA-Proben aus normalem Mammagewebe herangezogen. Insgesamt wurden so acht verschiedene

Lungentumore untersucht, die aus transgenen Mäusen der 27. und 28. Woche stammen. Parallel wurden als Kontrolle zwei Proben aus dem umliegenden Her2-negativen Lungenepithel des betroffenen Gewebes transgener Mäuse analysiert. Die Proben aus den Lungentumoren zeigten zu 100% (8/8) die positive Bande für die Lactalbumin-spezifische PCR (167 bp) und zu 63% (5/8) für die Casein-alpha-spezifische PCR (143 bp) (Abbildung 11).

Daraus folgt, dass in den untersuchten Tumoren zu 100% eine Expression von mindestens einem der untersuchten mammaspezifischen Gene und zu 63% beider Gene vorlag. Die Kontrollen aus normalem Lungenepithel der Her2-transgenen (N1, N2) wiesen in keinem Fall eine Expression dieser Gene auf. Die Spezifität der Primer für das jeweilige Gen wurde durch Restriktionsverdau kontrolliert und bestätigt (s. Anhang). Es konnte daher bestätigt werden, dass die beobachteten Lungentumoren ihren Ursprung in primären Mammakarzinomen haben und folglich Fernmetastasen sind.

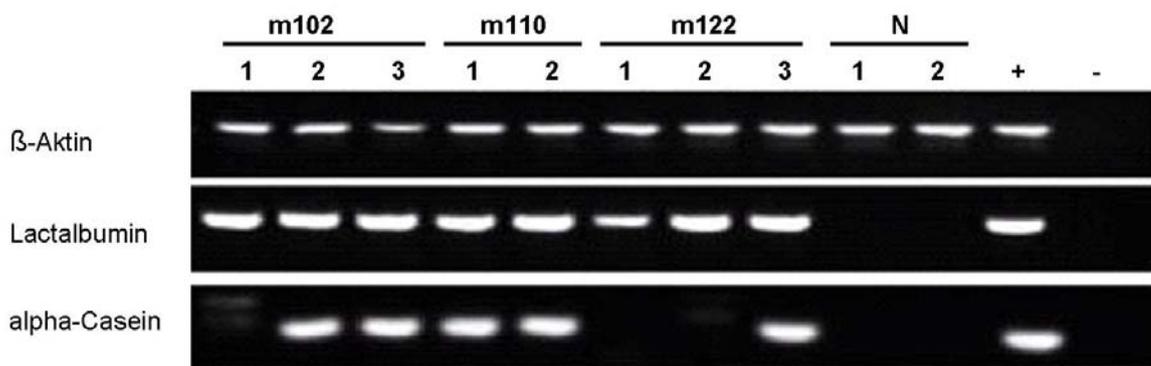


Abbildung 11 Expression mammaspezifischer Gene in Lungenmetastasen

Die Beschriftung der Proben 1, 2 und 3 bezieht sich auf unterschiedliche Metastasen der entsprechenden transgenen Maus. „N“ steht für normales Lungengewebe, dass aus transgenen Mäusen stammt. Die Positiv-Kontrolle „+“ entstammt normalem Epithel-Gewebe aus der Mamma. Bei der Negativ-Kontrolle „-“ wurde der reine PCR-Ansatz ohne DNA-Zugabe aufgetragen.

3.2 Untersuchung des Knochenmarks

Bisher konnte gezeigt werden, dass in dem Her2/neu-transgenen Mausmodell die Progression der Primärtumore über die einzelnen Vorstufen bis zu soliden Metastasen in der Lunge ähnlich zur Entwicklung des Mammakarzinoms im Patienten verläuft. Um zu untersuchen, ob im Mausmodell ebenfalls disseminierte epitheliale Zellen zu finden sind, wurde den Mäusen das Knochenmark entnommen. Durch Immunzytochemie und Immunfluoreszenz sollte die Expression epithelialer Marker (Her2, CK und EpCAM) in den angereicherten mononuklearen Zellen untersucht werden.

Immunzytochemischer Nachweis disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark

Zunächst wurden die Knochenmark-Präparate Her2/neu-transgener Mäuse durch einfache immunzytochemische Färbung untersucht, ob im Knochenmark Zellen nachweisbar sind, die den epithelialen Marker Her2 exprimieren, welcher in dem verwendeten Mausmodell durch den MMTV-Promotor überexprimiert wird. Im Knochenmark von 97% (30/31) der untersuchten transgenen Mäuse wurden Zellen gefunden, die eine intensive Färbung und somit die Bindung des gegen Her2 gerichteten Antikörpers (DLN-12082) aufwiesen (Abbildung 12A; Tabelle 2). In 20% (5/25) der Kontrollmäuse (wt-Balb/c) waren zwar ebenfalls vereinzelt positive Zellen aufzufinden, jedoch ist der Unterschied zu den transgenen Mäusen deutlich signifikant. Außerdem wurde in den Kontrollmäusen im Gegensatz zu den transgenen Mäusen maximal eine Zelle gefunden (Tabelle 2).

Durch eine weitere einfache immunzytochemische Färbung sollte untersucht werden, ob Zellen im Knochenmark nachweisbar sind, die mit CK8/18 einen weiteren epithelialen Marker exprimieren. Dieser epitheliale Zellmarker ist im Übrigen für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen in Krebspatientinnen etabliert. In den transgenen Mäusen konnte in 97% (32/33) der Knochenmarkproben eine Bindung des gegen CK gerichteten Antikörpers (GP11) auf einzelnen Zellen beobachtet werden (Abbildung 12B, Tabelle 2). Darüber hinaus wurden in 18% (6/33) der Balb-neuT-Mäuse CK+ Zellaggregate gefunden, die in der Zellzahl variierten (Abbildung 12C). Wie bei der Her2-Färbung wurden in 20% (5/25) der wt-Balb/c-Mäuse maximal eine positiv gefärbte Zellen im Knochenmark gefunden. Jedoch ist der Unterschied auch hier zwischen den Balb-neuT- und Kontrollmäusen höchst signifikant (Tabelle 2).

Es wurden insgesamt 42 Her2/neu-transgene Mäuse untersucht, so dass bei einem Teil der Mäuse (n=22) Ergebnisse für beide ICC-Färbungen vorliegen. Hier konnten in 95% der Fälle sowohl CK+ als auch Her2+ Zellen festgestellt werden. In nur einer Maus konnten keine Zelle gefunden werden, die einen der untersuchten epithelialen Marker exprimiert.



Abbildung 12 Positiv-gefärbte disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark

A) Immunzytochemisch gegen Her2 (AK: DLN-12082) gefärbte Einzelzelle aus dem Knochenmark einer transgenen Maus in der 18. Woche. (x400). **B-C)** Immunzytochemisch gegen CK8/18 (AK: GP11) gefärbte Knochenmark-Proben aus transgenen Mäusen, in denen positiv-gefärbte Einzelzellen (**B**; 9. Woche; x400) und Zellaggregate (**C**; 22. Woche; x400) nachweisbar sind. Disseminierte epitheliale Zellen sind aufgrund der intensiven Blauschwarzfärbung von den umliegenden ungefärbten Zellen zu unterscheiden.

Tabelle 2 Übersicht der immunzytochemisch analysierten Knochenmark-Proben

	CK+ Fälle	Fisher-Exact Test	Median (min-max)	Her2+ Fälle	Fisher-Exact Test	Median (min-max)
Transgene Mäuse	32/33 (97%)	p<0,0001	7 (0-66)	30/31 (97%)	p<0,0001	5 (0-12)
Wildtyp-Mäuse	5/25 (20%)		0 (0-1)	5/25 (20%)		0 (0-1)

Nachweis disseminierter epithelialer Zellen durch Immunfluoreszenz

Neben Her2 und CK8/18 wurden Knochenmark-Präparate transgener Mäuse untersucht, ob disseminierte epitheliale Zellen auch durch die Expression von EpCAM als weiteren epithelialen Marker nachweisbar sind. Aufgrund der extrazellulären Bindung des biotinylierten primären Antikörpers (G8.8) an EpCAM wurden die angereicherten mononuklearen Zellen in Suspension belassen und über Streptavidin mit Cy3 markiert. Zur Optimierung des Färbeprotokolls und als spätere Positiv-Kontrolle wurden Präparate der murinen Mammakarzinom-Zelllinie Ag12-TUBO verwendet (Abbildung 13C). Im Gegensatz zu den wt-Balb/c-Mäusen konnten so im Knochenmark aller untersuchten Her2/neu-transgenen Mäusen EpCAM+ Zellen festgestellt werden (Abbildung 13B, C; Tabelle 3)

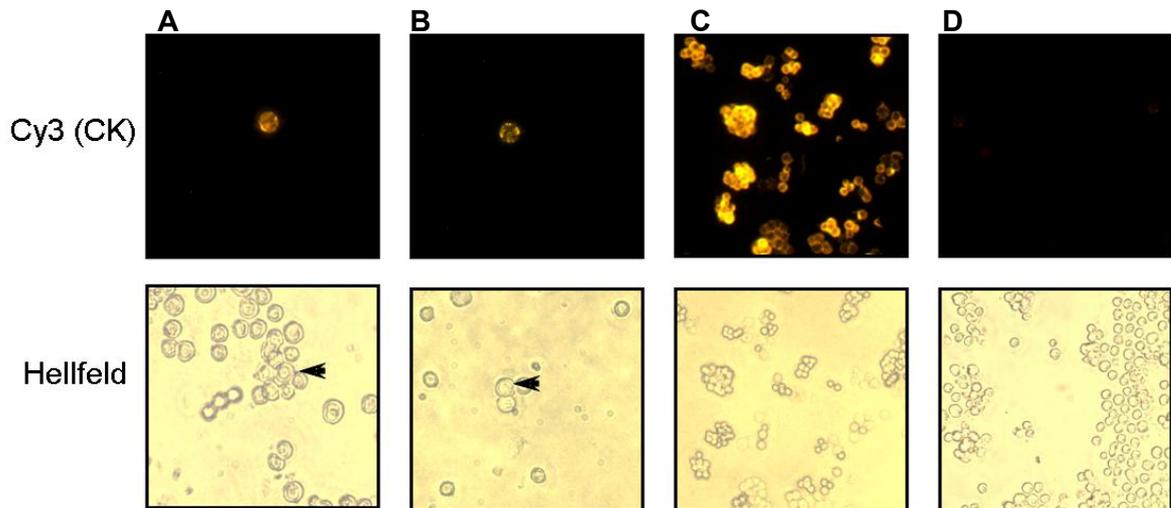


Abbildung 13 EpCAM-Färbung von Knochenmarkszellen

Immunfluoreszenz-Färbung von Knochenmark-Proben transgener und wt-Mäuse. Die Bindung des primären Biotin-konjugierten Antikörpers gegen EpCAM (G8.8-Bio) ist über Kopplung mit Streptavidin-Cy3 auf einzelnen disseminierten Zellen im Knochenmark von transgenen Mäusen aus der 24. Woche (A) und 9. Woche (B) neben den ungefärbten Normalzellen zu erkennen (x400); (C) Als Positiv-Kontrolle wurde in allen Versuchsansätzen die Zelllinie AG12-TUBO mitgeführt (x100); (D) In dem Knochenmark von wt-Balb/c-Mäusen waren keine gefärbten Zellen zu finden (x100).

Tabelle 3 Immunfluoreszenz-Färbung von Knochenmarkszellen gegen EpCAM

	EpCAM+ Knochenmark-Proben
Balb-neuT	7/7 (100%)
Wt-Balb/c	0/4 (0%)

3.2.1 Analyse des Genoms disseminierter Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Zellen, die positiv für epitheliale Marker (CK, Her2 oder EpCAM) sind, im Knochenmark von Balb-neuT-Mäusen nachweisbar sind. Jedoch beweist dies nicht ihren malignen Ursprung. Die gefärbten epithelialen Zellen wurden durch Mikromanipulation isoliert und ihr Genom global amplifiziert. So war es möglich durch CGH-Analysen die Zellen auf genomische Aberrationen zu untersuchen. Aus diesen Untersuchungen resultierten in 95% der untersuchten einzelnen Zellen (n=42), die entweder CK+, Her2+ oder EpCAM+ waren, aberrante Profile (Tabelle 4). Beispielsweise konnten Gewinne und Verluste genomischen Materials auf den Chromosomen 2, 3 und X bzw. Chromosom 12 festgestellt werden (Abbildung 14). Die Analyse der Kontrollen, ungefärbte Zellen bzw. Zellen aus dem Knochenmark von wt-Balb/c-Mäusen, hingegen zeigte keine genomischen Veränderungen. Daher handelt es

sich bei den mit epithelialen Markern nachgewiesenen Zellen im Knochenmark transgener Mäuse aufgrund ihrer genomischen Instabilität um disseminierte Tumorzellen.

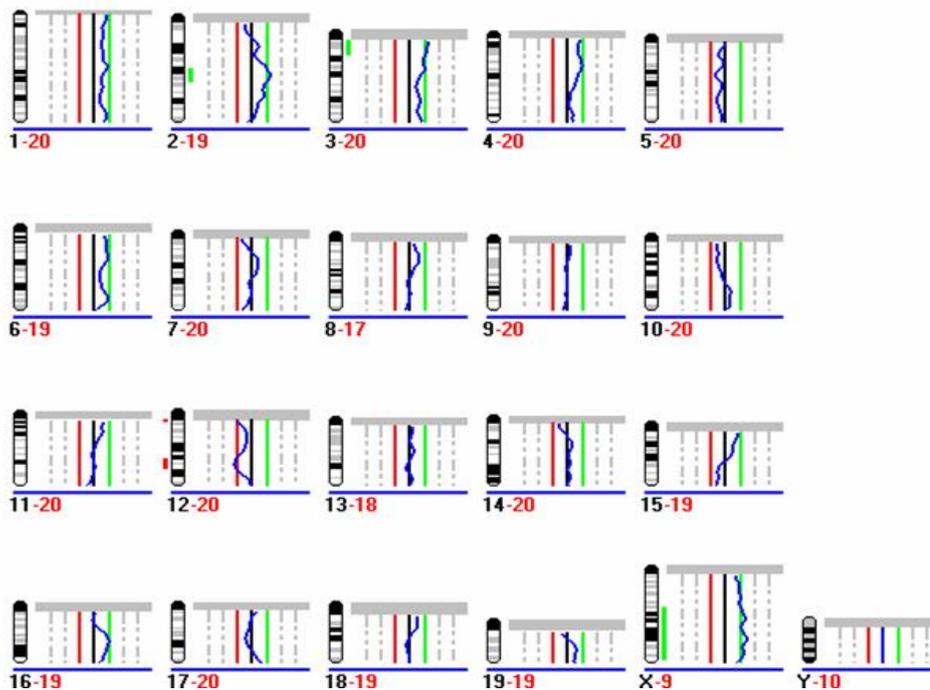


Abbildung 14 CGH-Profil einer einzelnen disseminierten Zelle

Es ist das CGH-Profil einer einzelnen disseminierten EpCAM+ Tumorzelle dargestellt. Bei Überschreitung der jeweiligen Signifikanz-Grenze wird neben dem Chromosom die entsprechende Region in Grün als Zugewinn bzw. in Rot als Verlust genomischen Materials angezeigt. Es liegen hier Y-Chromosome vor, da zur Herstellung der Metaphasen als Matrize Milz-Zellen einer männlichen Maus verwendet wurden.

Tabelle 4 Übersicht der CGH-Analysen

	CK+ Zellen	Her2+ Zellen	EpCAM+ Zellen	Zellen insgesamt
Aberrantes Profil	18/18	16/16	6/8	40/42 (95%)

3.3 Subpopulationen von disseminierten Zellen

Die vorangegangenen Abschnitte haben gezeigt, dass disseminierte Tumorzellen durch Immun-Färbungen gegen die epithelialen Marker EpCAM, CK und Her2 im Knochenmark transgener Mäuse nachgewiesen werden können. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die verwendeten Marker auf denselben Zellen exprimiert werden, oder ob es Subpopulationen von disseminierten Zellen gibt. Für diese Untersuchung wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen etabliert.

3.3.1 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CK und Her2

Zunächst wurde über eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der Knochenmark-Proben untersucht, ob die epithelialen Marker CK und Her2 auf denselben disseminierten Zellen exprimiert werden, wobei dieselben Antikörper aus den einfachen ICC-Färbungen verwendet wurden. Für die Optimierung des Protokolls und als Positiv-Kontrolle wurde die Zelllinie Ag12-TUBO verwendet (Abbildung 15A). Bei dieser Immunfluoreszenz-Färbung gegen CK und Her2 wurde das Knochenmark von insgesamt sieben transgenen Mäusen untersucht und es hat sich herausgestellt, dass alle Möglichkeiten der Markerkombinationen auftreten können. In 3/7 Fällen (43%) wurden doppelt-positive Aggregate gefunden (Abbildung 15B), wohingegen einzelne Zellen, die beide Marker exprimieren, nicht festgestellt werden konnten. Außerdem zeigte sich, dass es Zellen gibt, die nur einen primären Antikörper, anti-CK oder anti-Her2, binden (Abbildung 15C, D). In allen untersuchten Knochenmark-Proben wurden jedoch Zellen gefunden, die mindestens einen der beiden epithelialen Marker exprimieren (Tabelle 5). Insgesamt konnten in den sieben untersuchten transgenen Mäusen 35 Zellen nachgewiesen werden, die mindestens einen epithelialen Marker exprimieren, wobei sich die Zellen zu unterschiedlichen Teilen auf die möglichen Subpopulationen verteilen. Interessanterweise exprimierten insgesamt über 70% der disseminierten Zellen CK. Lediglich 48,6% (17/35) der Zellen zeigten eine Her2-Expression. Von den CK+ Zellen exprimierten nur 28% auch Her2. In Kontrollmäusen (n=4) konnten im Übrigen keine Zellen gefunden werden, die eine Bindung weder des einen noch des anderen primären Antikörpers aufwiesen (Abbildung 15).

Tabelle 5 Ergebnis der CK-/Her2-Doppelfärbung

Maus-ID	Alter [Wochen]	n= untersuchte Zellen x10 ⁶	n= CK+/Her2- Zellen			n= Her2+/CK- Zellen			n= CK+/Her2+ Zellen			Gesamt
			EZ	Agg.	Σ	EZ	Agg.	Σ	EZ	Agg.	Σ	
m1625	11	0,5	3	0	3	4	0	4	0	1(2)	2	9
m1626	10	0,5	2	1(2)	4	1	0	1	0	0	0	5
m1637	12	0,5	1	0	1	2	0	2	0	1(3)	3	6
m1643	12	0,5	2	1(2)	4	1	0	1	0	0	0	5
m1559	24	0,5	1	0	1	0	0	0	0	1(2)	2	3
m1560	24	0,5	1	0	1	1	0	1	0	0	0	2
m494	27	0,25	4	0	4	1	0	1	0	0	0	5
Zellen insgesamt			14	2(2,2)	18	10	0	10	0	3(2,3,2)	7	35
Zellen insgesamt in Prozent				51,4			28,6			20		100

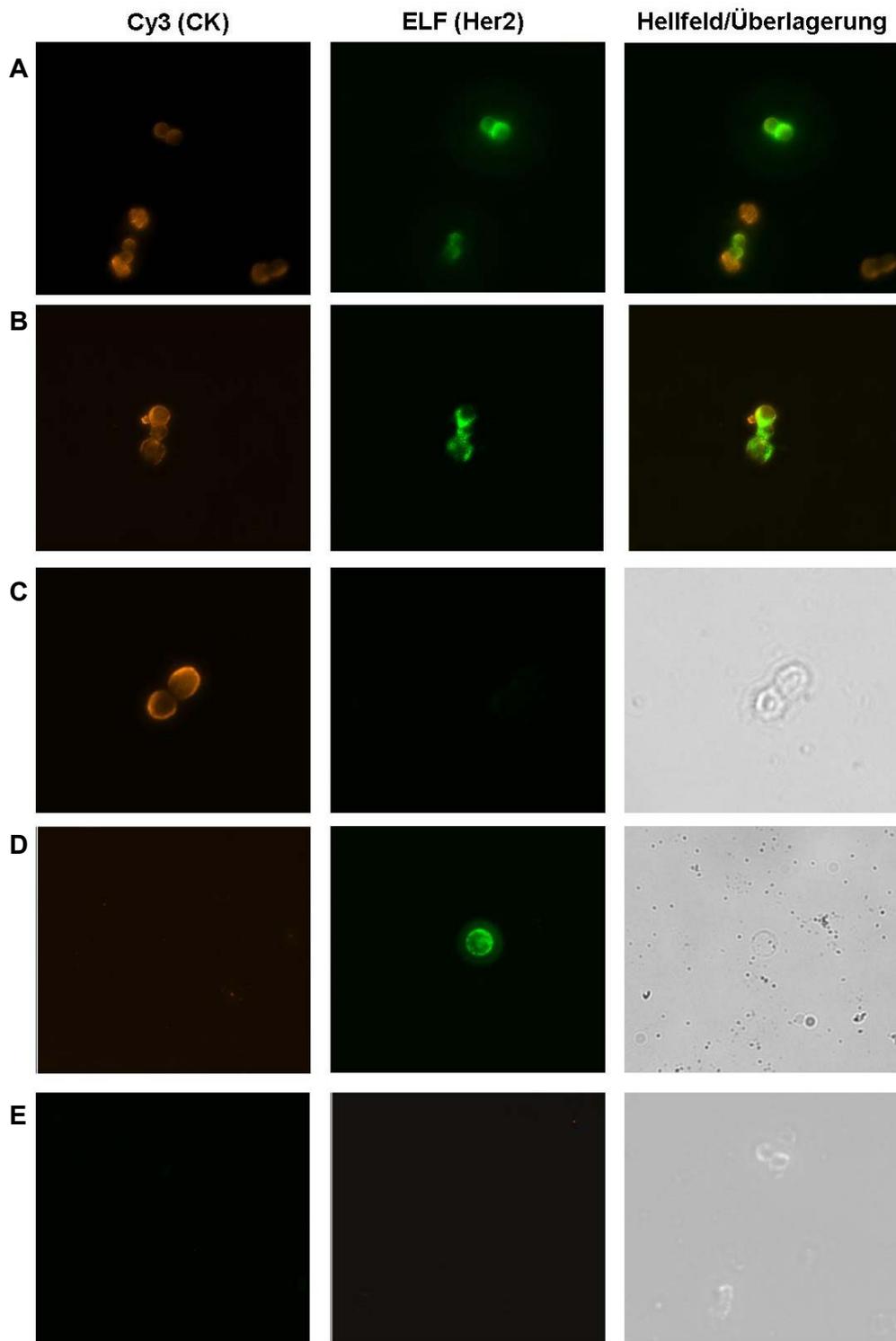


Abbildung 15 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen Her2 und Zytokeratin

Ag12-Zellen und Knochenmarkzellen aus einer Balb-neuT-Maus wurden gegen CK und Her2 gefärbt. Die Bindung der Antikörper wird sichtbar durch den Fluoreszenz-Farbstoff Cy3 (CK) und aufgrund des ELF-Entwicklungssystems (Her2; Emission im DAPI-Filter sichtbar). **A**) In der Positiv-Kontrolle ist zu erkennen, dass die Ag12-Zellen beide primären Antikörper binden. **B-D**) Im Knochenmark von Balb-neuT-Mäusen konnten sowohl Zellen gefunden werden, die beide Marker (**B**) exprimieren, als auch Zellen, die jeweils nur einen der beiden primären Antikörper, anti-CK (**C**; AK: GP11) bzw. anti-Her2 (**D**; AK: DLN-12082) binden. **E**) In der IgG-Isotyp-Kontrolle von Ag12-Zellen ist keines der beiden Signale zu erkennen (x400).

3.3.2 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CK und EpCAM

Zur Untersuchung, ob die beschriebenen CK+ Zellen in den Knochenmark-Proben Her2/neu-transgener Mäuse ebenfalls EpCAM exprimieren, wurde auch hier eine Doppelfärbung für beide epitheliale Marker etabliert. Für die Optimierung des Protokolls und als Positiv-Kontrolle wurde ebenfalls die Zelllinie Ag12-TUBO verwendet (Abbildung 16A). Es konnten auch bei dieser Immunfluoreszenz-Doppelfärbung alle möglichen Markerkombinationen beobachtet werden (CK+/EpCAM-, CK-/EpCAM+, CK+/EpCAM+; Abbildung 16B-D). In 57% (4/7) der untersuchten transgenen Mäuse wurden disseminierte Zellen gefunden, die beide epithelialen Marker (CK und EpCAM) exprimieren. In allen Mäusen jedoch wurde ein Fluoreszenz-Signal für mindestens einen der untersuchten Marker festgestellt (Tabelle 6). Die prozentuale Verteilung der insgesamt 58 nachgewiesenen disseminierten Zellen auf die unterschiedlichen Subpopulationen ist dem Ergebnis der CK-/Her2-Doppelfärbung sehr ähnlich, so dass auch hier über 70% (45/58) der Zellen eine CK-Expression aufwiesen, von denen nur 33% (15/45) zugleich EpCAM exprimieren. Es konnten bei dieser Doppelfärbung ebenfalls weder CK+ noch EpCAM+ Zellen im Knochenmark von wt-Balb/c-Mäusen (n=4) gefunden werden.

Die Übertragung der Resultate beider Doppelfärbungen in ein Schema veranschaulicht die ähnliche Verteilung auf die Subpopulationen (Abbildung 17).

Tabelle 6 Ergebnisse der CK-/EpCAM-Doppelfärbung

Maus-ID	n= untersuchte Zellen x10 ⁶	n= CK+/EpCAM- Zellen			n= EpCAM+/CK- Zellen			n= CK+/EpCAM+ Zellen			Gesamt
		EZ	Agg.	Σ	EZ	Agg.	Σ	EZ	Agg.	Σ	
m1625	0,5	4	1(2)	6	0	1(2)	2	3	0	3	11
m1626	0,5	2	1(2)	4	1	0	1	1	1(3)	4	9
m1637	0,5	6	1(3)	9	0	2(2,5)	7	1	2(2,3)	6	22
m1643	0,5	3	1(3)	6	0	0	0	0	0	0	6
m1559	0,5	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
m1560	0,5	1	0	1	2	0	2	0	0	0	3
m494	0,25	4	0	4	0	0	0	0	1(2)	2	6
Zellen insgesamt		20	4(2,2,3,3)	30	4	3(2,2,5)	13	5	4(2,2,3,3,)	15	58
In Prozent			51,7			22,4			25,9		100

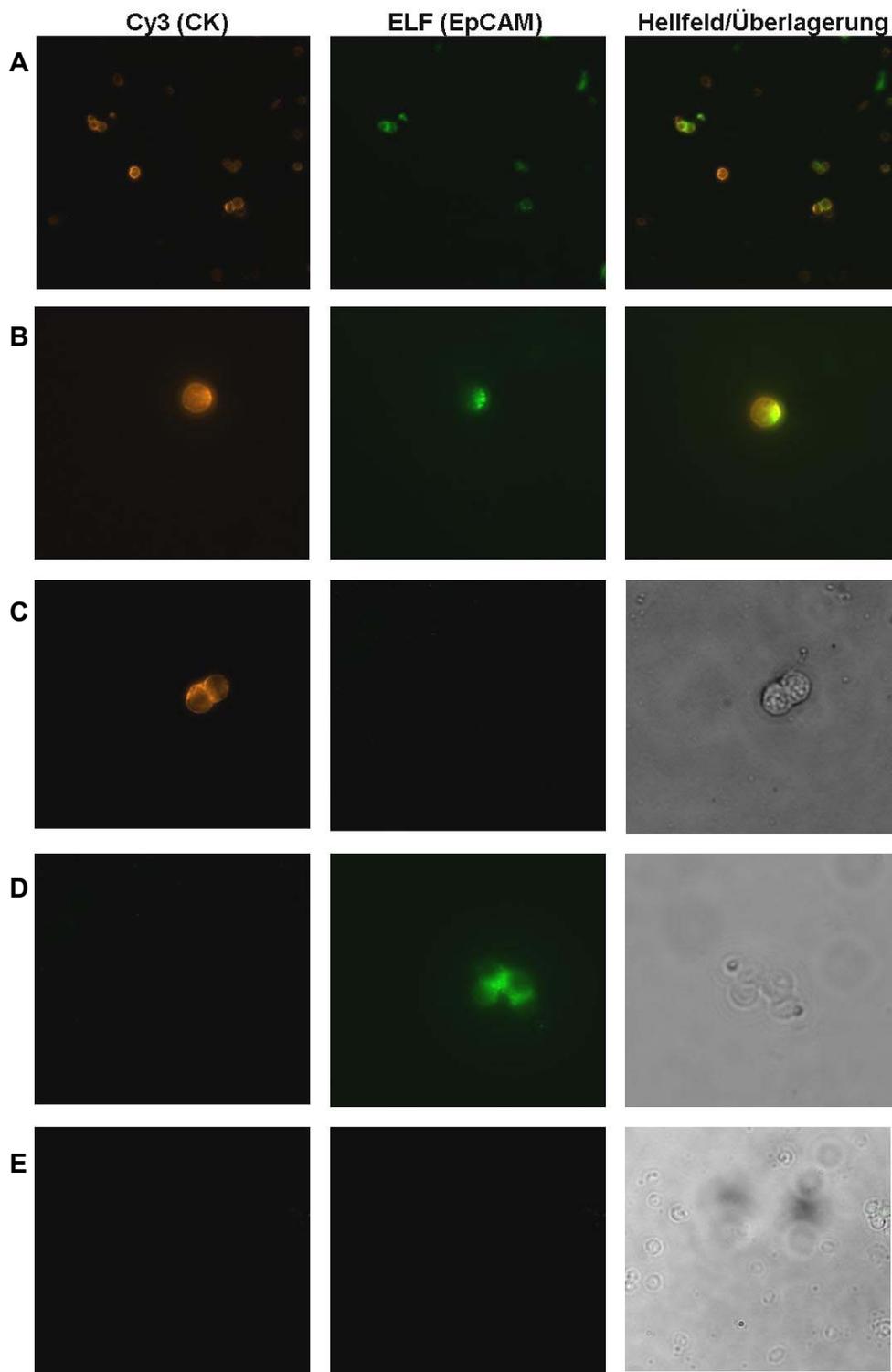


Abbildung 16 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CK und EpCAM

Ag12-Zellen und Knochenmarkzellen aus einer Balb-neuT-Maus wurden und über die Fluoreszenz-Marker Cy3 bzw. mit Hilfe des Entwicklungs-Systems ELF (DAPI-Filter) gegen CK und EpCAM gefärbt. In der Positiv-Kontrolle ist zu erkennen, dass die Ag12-Zellen beide primären Antikörper binden und beide Signale aufweisen (A). Im Knochenmark der Balb-neuT-Maus konnten sowohl Zellen gefunden werden, die beide Marker (B) exprimieren, als auch Zellen, die jeweils nur einen der beiden primären Antikörper, anti-CK (C; AK: GP11) bzw. anti-EpCAM (D; AK: G8.8-Bio) binden. In der IgG-Isotyp-Kontrolle von Ag12-Zellen ist keines der beiden Signale zu erkennen (E). (x400)

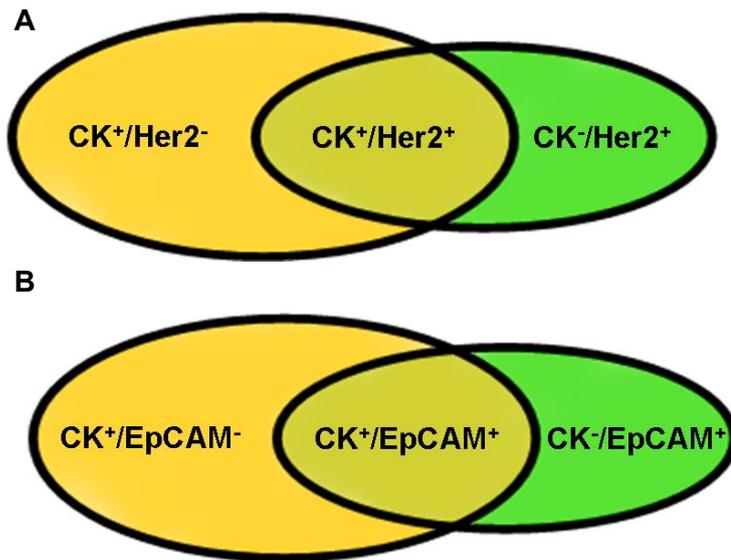


Abbildung 17 Schematische Darstellung der Subpopulationen disseminierter Zellen

*Es ist die prozentuale Verteilung (Tabelle 5/Tabelle 6) der disseminierten Zellen auf die jeweilige Subpopulation schematisch dargestellt, wobei **A**) dem Ergebnis der CK-/Her2- und **B**) der CK-/EpCAM-Doppelfärbung entspricht. Die Farben entsprechen dem Erscheinungsbild durch den jeweiligen Filter im Fluoreszenz-Mikroskop (orange= Cy3; grün= ELF-DAPI).*

3.4 Zeitpunkt der Disseminierung von Tumorzellen

Es konnte bisher veranschaulicht werden, dass die lokale und systemische Progression des Mammakarzinoms im Balb-neuT-Mausmodell dem typischen Krankheitsverlauf von Brustkrebspatientinnen ähnelt (Abbildung 18). Zum Zeitpunkt der Diagnose befindet sich der Primärtumor in Brustkrebspatientinnen bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, und es liegen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark vor. Daher lässt sich der Zeitpunkt der Disseminierung von Tumorzellen nicht genau bestimmen. Der Vorteil des hier verwendeten Mausmodells liegt nun darin, dass im Gegensatz zu der Situation im Patienten die Streuung von Tumorzellen zu verschiedenen Zeitpunkten und Tumorstadien festgestellt werden kann.

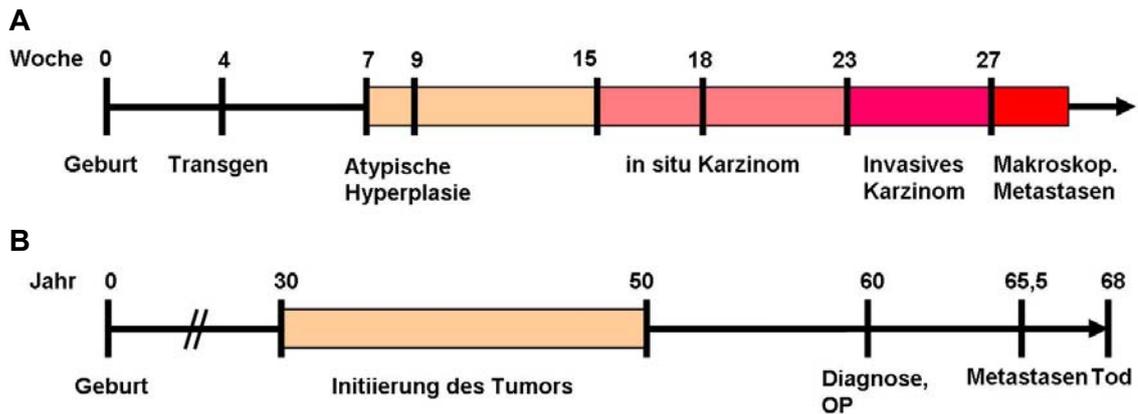


Abbildung 18 Tumorprogression in dem Balb-neu-T Maus-Modell

A) Der Zeitstrahl gibt die Zeitpunkte an, ab wann welches Tumorstadium in dem Maus-Modell erreicht ist. Nach Beginn der Transgen-Expression (4. Woche) entwickelt sich der Primärtumor über die ADH (ab 7. Woche), dem DCIS (ab 15. Woche) zum invasiven Tumor (ab 23. Woche) bis schließlich Metastasen makroskopisch zu erkennen sind. Der Zeitstrahl ergibt sich aus den histologischen Untersuchungen der einzelnen Brustdrüsen (Abbildung 8). **B)** Im Patienten erfolgt die Diagnose zumeist spät (Bsp. 60 Jahre), wobei sich der Tumor bereits in einem invasivem Stadium befindet, so dass systemische Streuung und Metastasierung bereits eingesetzt hat und zum Tod führt. Es wird postuliert, dass die Initiierung des Tumors oft ca. 20 Jahre vor Diagnose eintritt.

3.4.1 Frühe Disseminierung von CK+ und Her2+ Zellen

Die immunzytochemischen Färbungen gegen CK und Her2 haben gezeigt, dass in insgesamt 98% der transgenen Mäuse disseminierte Tumorzellen nachgewiesen wurden. In diese Untersuchungen gingen die Knochenmark-Proben von Mäusen unterschiedlichen Alters ein. Entsprechend der morphologischen Stadien der lokalen Tumorprogression wurden die Mäuse in fünf Gruppen eingeteilt (Tabelle 7). Daraus wird ersichtlich, dass zu allen Untersuchungszeitpunkten und somit auch in allen Tumorstadien sowohl CK+ als auch Her2+ Zellen im Knochenmark der Balb-neuT gefunden wurden. Erstaunlicherweise wurden disseminierte Zellen bereits in Mäusen (4. Woche) gefunden, in denen die Transgen-Expression durch Östrogenstimulation gerade erst begonnen hat.

Dieser Befund bestätigte sich auch bei den Immunfluoreszenz-Färbungen des Knochenmarks. Denn hier wurde ebenfalls das Knochenmark transgener Mäuse aus der 9.-11. Woche (ADH) untersucht, und es konnten sowohl EpCAM+ als auch doppelt-positive (CK+/EpCAM+ und CK+/Her2+) Zellen festgestellt werden.

Tabelle 7 Ergebnis der immunzytochemischen Färbungen in Gruppen

Gruppe		CK-Färbung		Her2-Färbung	
Alter	Tumorstadium	Fallzahl	Anzahl pos. Zellen (Ø)	Fallzahl	Anzahl pos. Zellen (Ø)
4. Woche	Tg	4	4,25	3	1,3
7.-11. Woche	ADH	11	6	8	6,25
18.-21. Woche	DCIS	5	7,6	6	4,8
22.-25. Woche	IC	8	8	8	4,4
27.-30. Woche	MM	5	23,4	6	6,7

Tg= Beginn der Transgen-Expression; IC= invasives Karzinom; MM= makroskopische Metastasen

3.4.2 Entwicklung der lokalen und systemischen Tumorprogression

Ab der 21. Woche konnten einzelne invasive Tumoren in den Brustdrüsen der transgenen Mäuse beobachtet werden. In der 18. Woche lagen in den Mäusen lediglich *in situ* Karzinome vor, deren maximaler Durchmesser Ø 3,2 mm betrug. Da Lungenmetastasen ebenfalls ab der 21. Woche eine messbare Größe erreicht haben (Abbildung 19C), scheint die Entwicklung der Metastasen parallel zum Primärtumor zu verlaufen. Darüber hinaus zeigte sich bei der Untersuchung des Knochenmarks, dass bereits CK+ und Her2+ disseminierte Zellen in transgenen Mäusen vorlagen, in denen noch kein Primärtumor zu beobachten war (Abbildung 19B). Folglich ist die Disseminierung von Tumorzellen bereits in nicht-invasiven Tumorstadien (ADH, DCIS) nachweisbar. Darüber hinaus ist erkennbar, dass die Anzahl der CK+ und Her2+ Zellen nicht mit dem exponentiellen Anstieg des Tumordurchmessers korreliert. Stattdessen blieb die Zahl mit einer gewissen Variation konstant.

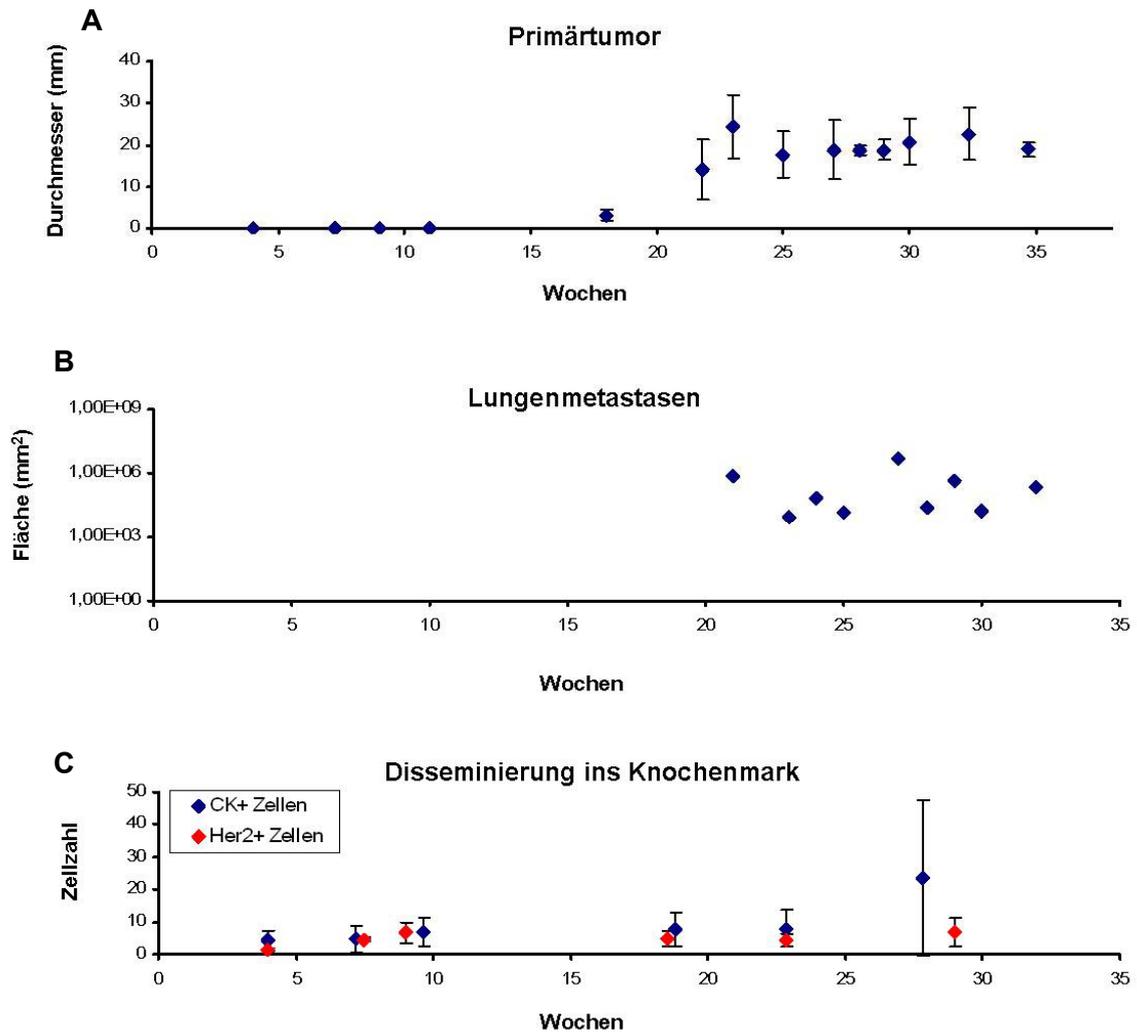


Abbildung 19 Zeitlicher Verlauf der lokalen und systemischen Tumorprogression

A) Maximaler Durchmesser der Primärtumoren transgener Mäusen; **B)** Größe der Metastasen in transgenen Mäusen verschiedenen Alters. **C)** Die Anzahl CK+ (rot) und Her2+ (blau) Zellen im Knochenmark transgener Mäuse bleibt relativ konstant.

3.4.3 Nachweis der frühen Disseminierung in PyMT-Mausmodell

Ziel dieses Abschnitts ist es zu untersuchen, ob die frühe Disseminierung von Tumorzellen allein eine Eigenschaft des Balb-neuT-Mausmodells ist. Daher wurde ein weiteres Mausmodell zum Mammakarzinom auf diese Fragestellung hin untersucht. Hierzu wurde das Polyoma-Middle-T-Mausmodell (PyMT) ausgewählt, welches ebenfalls den genetischen Hintergrund des Balb/c-Mausstamms besitzt. Die Karzinogenese wird auch wie in der Balb-neuT-Maus durch den MMTV-Promotor induziert. Die Mäuse wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Reinheckel (Molekulare Medizin, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.

Lokale Tumorprogression im Polyoma-Middle-T-Mausmodell

Zunächst wurde die lokale Tumorprogression histologisch in den zehn Brustdrüsen der PyMT-Mäuse untersucht. Da bekannt war, dass die Progression der Tumoren dieses Modells aggressiver als im Balb-neuT-Modell verläuft und dadurch mit einer schnelleren Entwicklung zu invasiven Primärtumoren einhergeht, wurden frühere Zeitpunkte für die Untersuchungen ausgewählt. So zeigte sich bereits in der 4. Woche der transgenen Mäuse, dass in den Brustdrüsen ADH zu finden waren (Abbildung 20A). Aus den Hyperplasien entwickeln sich über *in situ* Karzinome, die ab der 6. Woche zu nachweisbar waren, invasive Tumoren (ab Woche 11). Die lokale Tumorprogression verläuft daher ähnlich wie im Balb-neuT-Mausmodell mit dem Unterschied einer aggressiveren und deutlich schnelleren Entwicklung.

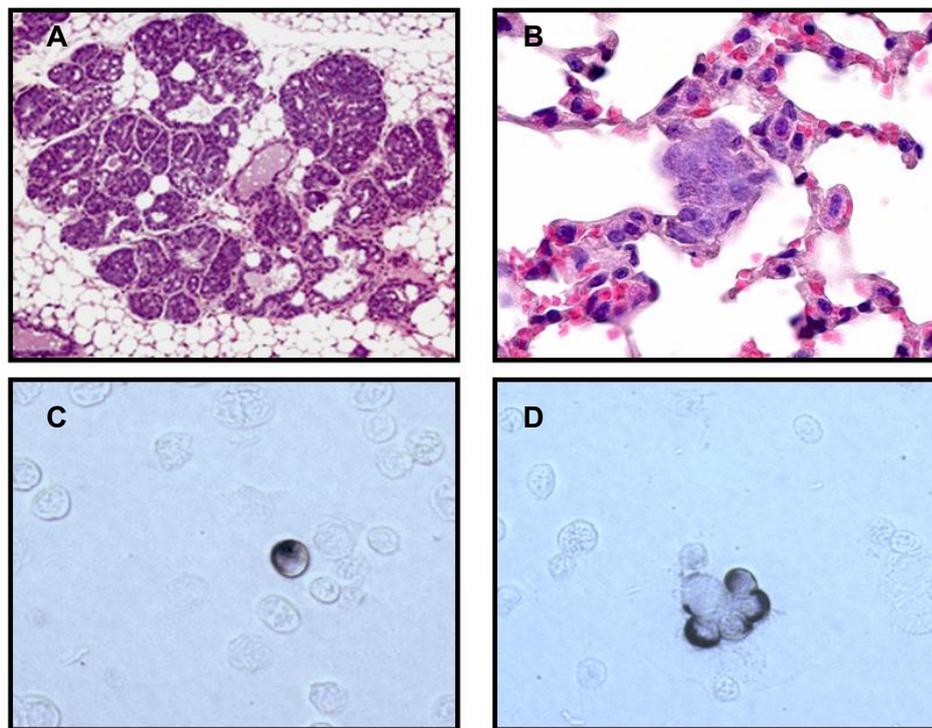


Abbildung 20 Untersuchungen an PyMT-transgenen Mäusen

A, B) H/E-Färbung von Paraffinschnitten des Brustgewebes und der Lunge PyMT-transgener Mäuse verschiedenen Alters. **A)** In der vierten Woche sind ADH in der Brust zu erkennen (x200). **B)** Im Alter von 14 Wochen sind Aggregate neoplastischer Zellen in der Lunge zu erkennen, die gut vom umliegenden normalen Lungenepithel unterschieden werden können (x400). **C)** Die CK+ Tumorzelle ist nach immunzytochemischer Färbung von den normalen Knochenmarkszellen einer PyMT-Maus zu unterscheiden. Auch CK+ Aggregate heben sich von den ungefärbten Normalzellen ab (**B**). (x 400).

Mikrometastasen in der Lunge

Zur Untersuchung einer systemischen Progression im PyMT-Modell wurde ebenfalls die Lunge untersucht. Die histologische Untersuchung (HE-Färbung) ergab, dass ausschließlich in transgenen Mäusen ab der 14. Woche Anzeichen einer Metastasierung in die Lunge festgestellt werden konnte (Abbildung 20B; Tabelle 8). Bei Mäusen mit ADH (4. Woche), *in situ* Karzinomen (6. Woche) und beginnender Invasivität (11. Woche) der Primärtumore wurden keine (Mikro-)Metastasen gefunden. Außerdem konnten im Gegensatz zum Balb-neuT-Modell (regelmäßig ab Woche 27) keine makroskopischen Metastasen beobachtet werden.

Tabelle 8 Übersicht der Daten zu den PyMT-Mäusen

Maus-ID	Alter [Wochen]	Histologie		CK+ Zellen/0,5x10 ⁶ KM-Zellen
		Primärtumor	Lungen-Metastasen	
P4-1	4	ADH		2
P4-2	4	ADH		0
P4-3	4	ADH		1
P6-1	6	DCIS		10
P6-2	6	DCIS		4
P6-3	6	DCIS		7
P11-1	11	Invasives Karzinom		7
P11-2	11	Invasives Karzinom		4
P11-3	11	Invasives Karzinom		12
P14-1	14	Invasives Karzinom	X	5
P14-2	14	Invasives Karzinom	X	9
P14-3	14	Invasives Karzinom	X	5
K-1				0
K-2				0
K-3				0

K-1-3=Kontrollmäuse (Balb/c)

Frühe Disseminierung von CK+ Zellen ins Knochenmark

Analog zum Balb-neuT-Modell wurden die Knochenmark-Proben der PyMT-Mäuse immunzytochemisch gegen CK gefärbt. Dabei konnten einzelne Zellen und Zellaggregate unterschiedlicher Größe gefunden werden, die eine Färbung und somit eine Bindung des anti-CK-Antikörpers (GP11) aufwiesen (Abbildung 20C, D). Es wurden ebenfalls wt-Balb/c-Mäuse als Kontrollen untersucht, die aus einer Zucht des gleichen Tierstalls wie die PyMT-Mäuse stammen, um externe Fehlerquellen auszuschließen.

Es wurden insgesamt 12 transgene Mäuse und drei Kontroll-Mäuse (K-1, -2, -3)

untersucht (Tabelle 8). Dabei ist zu erkennen, dass in 11/12 (92%) Knochenmark-Proben der transgenen Mäuse CK+ Zellen zu finden sind, wohingegen in den Kontrolltieren keine gefärbten Zellen nachweisbar waren. Darüber hinaus waren bereits positive Zellen in 2/3 Mäusen zu finden, in denen lediglich ADH in den Brustdrüsen diagnostiziert wurde. Da *in situ* Karzinome definitionsgemäß nicht invasiv sind, erhöht sich der relative Anteil positiver Knochenmark-Proben in Mäusen ohne invasiven Tumor auf 5/6. Es zeigt sich also, dass das Phänomen der frühen Disseminierung von CK+ Zellen nicht auf das Balb-neu-T-Mausmodell beschränkt ist, sondern auch auf die PyMT-Maus zutrifft.

3.5 Proliferatives Potential disseminierter Tumorzellen

Es konnte bisher zwar in verschiedenen Mausmodellen (Balb-neuT und PyMT) gezeigt werden, dass eine Disseminierung epithelialer Tumorzellen im Knochenmark der transgenen Mäuse bereits in nicht-invasiven Tumorstadien nachzuweisen ist, jedoch stellt sich nun die Frage, ob diese Zellen solide Metastasen generieren können. Durch Knochenmark-Transplantation von Her2/neu-transgenen in wt-Balb/c-Mäuse sollte untersucht werden, ob disseminierte Tumorzellen ein proliferatives Potential besitzen bzw. eine Karzinogenese auslösen können.

3.5.1 Etablierung der KM-Transplantation

Die Methodik der Knochenmark-Transplantation wurde zunächst etabliert und der zeitliche Versuchsablauf optimiert (Abbildung 21). Als Empfänger-Tiere wurden wt-Balb/c Mäuse verwendet, und als Spender-Tiere dienten Her2/neu-transgene Mäuse unterschiedlichen Alters. In den verschiedenen Transplantationsansätzen wurde so das Knochenmark von Mäusen mit invasivem Tumor (27. Woche) oder ADH (9.-11. Woche) in bestrahlte wt-Balb/c injiziert. In einem parallelen Versuchs-Ansatz wurden zur Kontrolle wt-Spender verwendet. Nach einer Beobachtungszeit von 18-50 Wochen konnten äußerlich keine Auffälligkeiten und Krankheitssymptome in den Rezipienten festgestellt werden. Allerdings sind sechs Empfänger-Mäuse, die transgenes Knochenmark erhalten haben, innerhalb dieses Zeitraums plötzlich verstorben. Daher war eine vollständige Dissektion und Untersuchung der Organe nicht möglich, um einen Grund für das plötzliche Versterben zu festzustellen. Die Rezipienten transgenen Knochenmarks scheinen daher zwischen der 18. bis 50. Woche klinisch inapparent krank zu sein, so dass sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten dissektiert wurden (Tabelle 9).

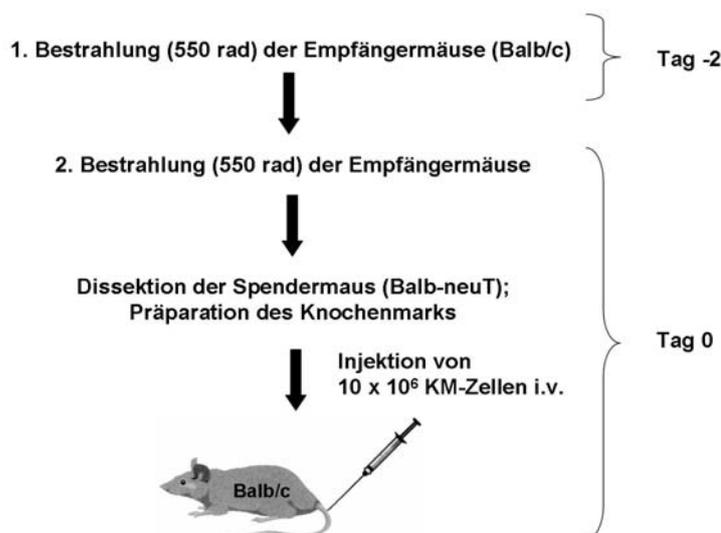


Abbildung 21 Versuchsablauf bei der Knochenmark-Transplantation

Zwei Tage vor der Transplantation werden die Empfängermause mit 550 rad bestrahlt. Die zweite Bestrahlung mit gleicher Dosis erfolgt am Tag 0 und ist letal für das endogene Knochenmark. Nach der Bestrahlung werden die Spendermause dissektiert und deren Knochenmark für die Transplantation präpariert. Schließlich erfolgt die intravenöse Injektion des Spender-Knochenmarks.

Tabelle 9 Übersicht KM-Transplantationsexperimente

Maus-ID Empfänger	Spender-Maus		Zeit nach Transplantation [Wochen]	% CK+ Zellen bezogen auf alle KM-Zellen des Empfängers
	Alter [Wochen]	n=CK ⁺ Zellen/0,5x10 ⁶ KM-Zellen		
M I	27	14	18	43
M II	27	14	18	51
M III	27	15	19	18
M IX	27	15	49	43
M X	27	15	49	35
M XI	27	11	50	33
M XII	27	11	50	27
M XIII	27	9	18	0
M XIV	27	9	18	0
M V	11	11	22	20
M VI	11	12	22	22
M VII	11	12	22	30
M VIII	11	12	22	16
M 2-1	9	4	19	10
M 2-2	9	4	19	31
M 2-3	9	4	19	28
M 3-2	9	2	28	13
M 3-3	9	2	28	14
M 1-3	9	6	42	15
M 1-1	9	6	43	6
M 0-1	9, wt	0	43	0
M 0-2	9, wt	0	19	0
M 0-3	9, wt	0	28	0

Wt= Wildtyp-Balb/c als Spender-Maus; verstorbene Tiere (n=6) sind nicht aufgeführt

3.5.2 CK+ und Her2+ Zellen im Knochenmark der Rezipienten

Nach der Dissektion der Empfänger-Tiere erfolgte die Untersuchung bezüglich Tumoren und Metastasen. Es waren sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch nach H/E-Färbung des Mammagewebes der Rezipienten keine Tumoren zu beobachten. Aufgrund der regelmäßigen Metastasierung in die Lunge im Her2/neu-transgenen Mausmodell wurden ebenfalls die Lungen der Empfänger-Mäuse histologisch untersucht und immunhistochemisch gegen Her2 gefärbt. Auch bei dieser Analyse konnten keine Tumoren bzw. Metastasen gefunden werden.

Allerdings konnten CK+ und Her+ Zellen im Knochenmark der Rezipienten gefunden werden (Abbildung 22). Dabei ist die äußerst hohe Anzahl CK+ Zellen im Knochenmark der Mäuse auffällig (Abbildung 22A). Im Gegensatz zu den transgenen Mäusen (Spender) wurden nicht 500.000 Zellen durchsucht und die absolute Anzahl sondern in zehn Blickfeldern der x100-Vergrößerung der prozentuale Anteil positiver Zellen bestimmt (Tabelle 9). Diese prozentuale Auswertung ergab, dass 6%-51% aller Zellen im Knochenmark von 18/20 transplantierten Mäusen CK+ waren. Interessanterweise erhielten die beiden Ausnahmen, MXIII und MXIV, in denen keine Zellen nachgewiesen wurden, Knochenmark von derselben Spender-Maus. Aufgrund mangelnden Knochenmarks konnte lediglich von drei Empfängermäusen (MI, MII, MIII) die Anzahl von Her+ Zellen bestimmt werden. Aber auch hier konnte eine Proliferation festgestellt werden, denn durchschnittlich wurden 68 (81, 76, 46) Zellen in $0,5 \times 10^6$ Knochenmarkzellen gefunden, die eine Her2-Expression aufwiesen. In den Kontroll-Mäusen (M0-1-3), denen das Knochenmark aus gesunden wt-Balb/c injiziert wurde, konnten sowohl für CK als auch Her2 keine positiven Zellen nachgewiesen werden.

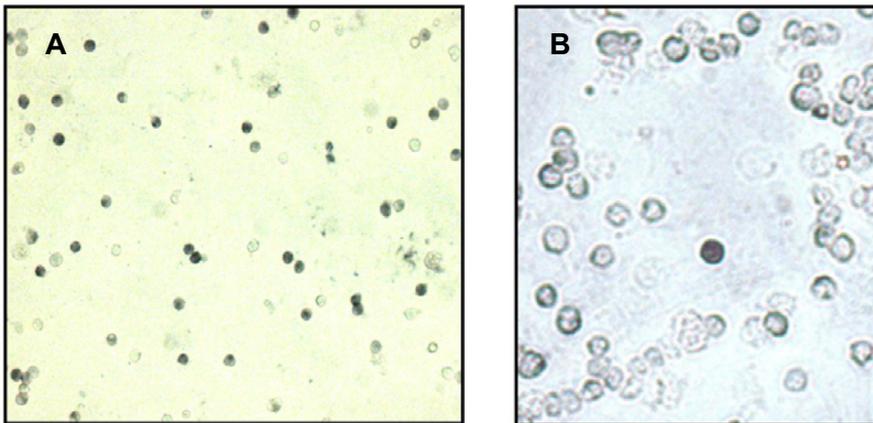


Abbildung 22 Tumorzellen im Knochenmark der Rezipienten

In den Abbildungen sind die über das BCIP-System angefarbten CK+ Zellen (A, AK: GP11; x100) bzw. die angefarbte Her2+ Zelle (B, AK: DLN-12082; x200) von den unangefärbten Normalzellen zu unterscheiden.

3.5.3 Proliferation von CK+ Zellen

Der hohe Anteil von CK+ Zellen deutet auf eine starke Proliferation dieser Zellen hin, wodurch eine Karzinose im Knochenmark der transplantierten Mäuse ausgelöst werden konnte. Eine Knochenmark-Karzinose ist daher der einzige Befund in den Empfänger-Mäusen und wäre auch eine Erklärung für das plötzliche Versterben von sechs Mäusen.

Durch die Bestimmung der Anzahl von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark der transgenen Spender-Mäuse konnte die Tumorlast nach Injektion des Knochenmarks (1×10^7 Zellen) hochgerechnet werden. Aus den Doppelfärbungen (s. Abschnitt 3.3) ging hervor, dass eine Expression von CK auf den meisten disseminierten Tumorzellen zu finden ist. Als Maß für die Tumorlast in den injizierten Knochenmarkszellen (über 70%) galt daher die Anzahl von CK+ Zellen (Tabelle 10). Daraus ergibt sich, dass die Transplantation von 40 bis 300 Tumorzellen (CK+) ausreichte, um eine Karzinose auszulösen. Wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben, führte ausschließlich die Transplantation des Knochenmarks der Spender-Maus „S4“ nicht zu einer Proliferation der CK+ Zellen in den beiden Empfängermäusen. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die disseminierten Tumorzellen aus Spendern nicht nur mit invasivem Tumor (S1-S3) sondern auch mit ADH (S5-S9) zu 100% eine Karzinose in den Empfängermäusen auslösten. So konnte auch das proliferative Potential von früh-disseminierten CK+ Zellen nachgewiesen werden.

Tabelle 10 Tumorlast bei Transplantation

Spender-ID	Alter des Spenders [Wochen]	CK+Zellen/ 0,5x10 ⁶ KM-Zellen	Tumorlast in 10x10 ⁶ Zellen	Karzinose in Empfängermaus
S1	27	14	280	Ja
S2	27	15	300	Ja
S3	27	11	220	Ja
S4	27	9	180	Nein
S5	11	11	220	Ja
S6	11	12	240	Ja
S7	9	4	80	Ja
S8	9	2	40	Ja
S9	9	6	120	ja

3.5.4 Genomische Aberrationen in CK+ und Her2+ Zellen

Es konnten zwar CK+ sowie Her2+ Zellen im Knochenmark der Rezipienten durch ICC-Färbungen gefunden werden, jedoch konnte ihr maligner Ursprung bisher nicht nachgewiesen werden. Folglich wurden die Zellen isoliert und das Genom global amplifiziert. So konnten die positiv-gefärbten Zellen durch CGH hinsichtlich genomischer Aberrationen untersucht werden. Insgesamt wurden neun Zellen bzw. Zellaggregate (5x CK+, 4x Her2+) aus sechs verschiedenen Mäusen, die eine Injektion transgenen Knochenmarks erhielten, analysiert. Darüber hinaus dienten drei negative einzelne Zellen und ein Pool von ca. 1000 Normalzellen als Kontrollen, die parallel aus vier Mäusen aufgearbeitet wurden.

CK+ und Her2+ Zellen mit heterogenen genomischen Aberrationen

Ausschließlich die positiv-gefärbten Zellen wiesen genomische Aberrationen auf (Abbildung 23). Der Anteil betrug dabei 89%, da nur in einem Fall („96-M6-CKEZ“) ein balanziertes Profil aus der CGH resultierte (Abbildung 23A). Des Weiteren zeigten keine zwei Zellen das gleiche Profil, wodurch das Auftreten aberranter chromosomaler Regionen in den Zellen äußerst heterogen ist. Zudem waren wenig dominante Aberrationen zu vermerken. Alleine die Region XE zeigt in 56% (5/9) der Fälle eine Amplifikation. Wenn nun die Zellen nach ihrer Färbung separat betrachtet werden, zeigt sich, dass diese Amplifikation in 80% (4/5) der CK+ Zellen auftritt. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass bei der Unterscheidung der oben genannten Gruppen die CK+ Zellen mehr Aberrationen als die Her2+ Zellen aufwiesen (Abbildung 23B). Insgesamt traten in den Tumorzellen (CK+ und Her2+) Amplifikationen (79%) häufiger auf als Deletionen

metastatische Potential früh-disseminierter Tumorzellen analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine bereits etablierte Methode zur orthotopen Transplantation von Mammagewebe an die gegebenen Bedingungen angepasst (Deome, Faulkin et al. 1959), wobei das Mammagewebe aus Her2/neu-transgenen Spender-Mäusen in das gesäuberte Fettgewebe von wt-Balb/c-Mäusen implantiert wurde (Abbildung 24). Im weiteren Verlauf konnte das transplantierte Gewebe aus den Rezipienten in einer weiteren OP zu unterschiedlichen Zeitpunkten total resektiert werden. Die Situation in der Empfängermaus ähnelt nun der im Patienten, denn im Vergleich zu den Her2/neu-transgenen Mäusen tragen die Rezipienten nur einen primären Tumor und besitzen einen gesunden genetischen Hintergrund. Das Stadium lässt sich bei nur einem Primärtumor eindeutig diagnostizieren und der Krankheitsverlauf besser evaluieren. Ein weiterer großer Vorteil dieses Transplantations-Modells ist, dass sich der Disseminierungs- und Metastasierungsstatus zu jedem Zeitpunkt der Tumorprogression bestimmen lässt.

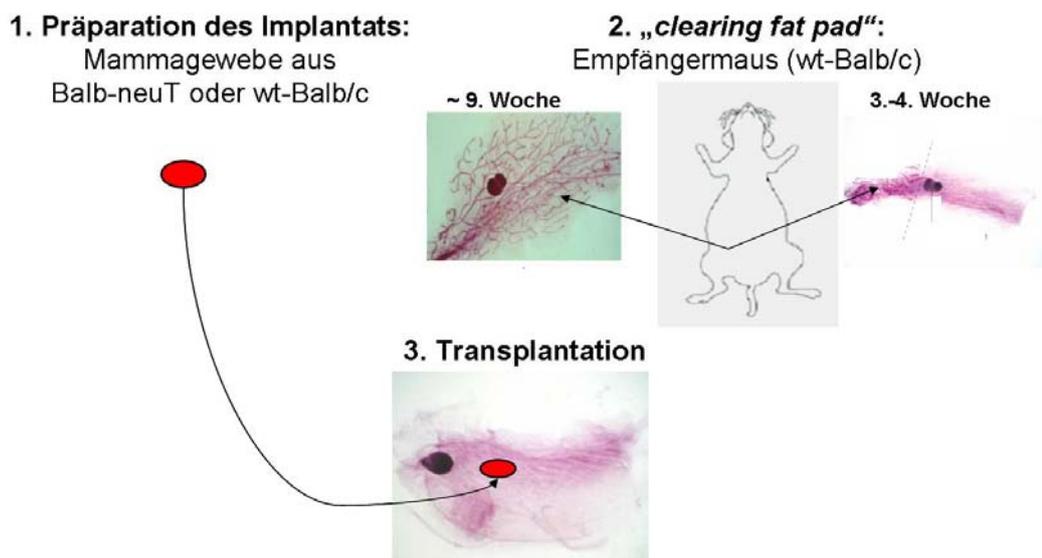


Abbildung 24 Schematische Darstellung der Mamma-Transplantation

Im ersten Schritt wird das Brustgewebe der Spendermaus entnommen, präpariert und bis zur Transplantation in 1x PBS gelagert. Dann erfolgt die Säuberung des Fettgewebes in der Empfängermaus. Die Mäuse dürfen dabei maximal 20-24 Tage alt sein, da so die vollständige Säuberung von endogenem Brustepithel in der Drüse sichergestellt werden kann. In der 9. Woche wäre das Fettgewebe bereits vollständig von Drüsengängen durchzogen. Schließlich wird das präparierte Gewebe der Spendermaus in eine Tasche im Fettgewebe der Empfängermaus eingesetzt (Abbildungen aus (Smalley and Ashworth 2003).

3.6.1 Evaluierung potentieller experimenteller Einflussfaktoren

In einem Pilotversuch wurde jeweils ein Tumorstück einer transgenen Maus aus der 23. Woche in zwei Empfängermause transplantiert. Nach sechs Wochen der Beobachtung konnte ein Tumor an der Insertionsstelle gefühlt werden, der bei der Dissektion

entnommen wurde. Die histologische Untersuchung durch H/E-Färbung von Paraffinschnitten zeigte ein invasives Karzinom (Abbildung 25A, B). Das Implantat wurde demnach von der Empfänger-Maus angenommen, infiltrierte das umliegende Fettgewebe und wuchs wiederum zu einem invasiven Tumor aus.

In den weiteren Transplantationsansätzen wurde das Gewebe von transgenen Mäusen im Alter von 3-12 Wochen transplantiert, um die Tumorentwicklung über alle Stadien in den Rezipienten untersuchen zu können, wobei die Untersuchung der frühen Tumorstadien (ADH und DCIS) von besonderem Interesse waren. Insgesamt wurden 50 Transplantationen inklusive Kontrollen, denen das Brustgewebe von wt-Balb/c implantiert wurde, angesetzt (Tabelle 11). Eine Transplantation wurde als erfolgreich gewertet, wenn die Empfängermaus den Eingriff überlebt hat und das Transplantat angewachsen ist. Sieben Mäuse sind vor dem Versuchsende verstorben, und in vier Rezipienten ist das transplantierte Gewebe nicht ausgewachsen, da nur hypotrophische Drüsen in der Implantationsstelle zu finden waren. Daraus ergibt sich eine Erfolgsrate von 78% (39/50). In zwei wt-Balb/c-Mäusen, denen nur das Epithel aus der Brustdrüse entfernt und kein fremdes Gewebe implantiert wurde, war bei der histologischen Untersuchung ausschließlich Fettgewebe zu erkennen. Diese Kontrollen stellten sicher, dass bei den operativen Eingriffen das Fettgewebe komplett gesäubert wurde und folglich kein endogenes Epithel zurückgeblieben ist. In einigen Fällen (n=18) wurde den Empfänger-mäusen das Implantat nach unterschiedlicher Verweildauer – Zeit nach Transplantation bis zur Operation – durch einen erneuten operativen Eingriff resektiert, um auch den systemischen Krankheitsverlauf nach Entfernung des primären Tumors analysieren zu können. In den folgenden Abschnitten wurden die Untersuchungen nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewertet, um neben dem Spender-Alter Faktoren zu untersuchen, die einen Einfluß auf das An- und Auswachsen der Implantate bzw. die systemische Progression haben könnten. Eine detaillierte Tabelle aller Untersuchungsergebnisse zu den Empfänger-mäusen, die den Eingriff überlebt haben, ist dem Anhang zu entnehmen.

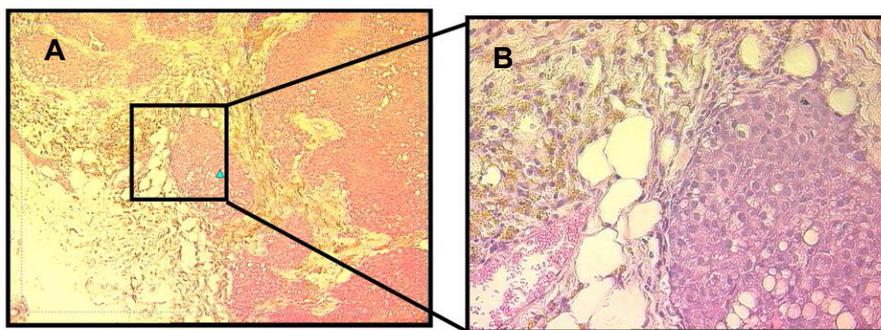


Abbildung 25 Histologie des Implantats nach Dissektion

A-B) Das eingesetzte Tumorstück (Pilotexperiment) wird vom Empfängertier angenommen und infiltriert das Fettgewebe. Das transplantierte Tumorstück im Pilotversuch wächst zu einem invasiven Karzinom aus. B Vergrößerung (x400) des Ausschnitts in A (x100).

Tabelle 11 Übersichtstabelle aller Transplantations-Experimente

Spender-Alter [Wochen]	Tumorstadium im Spender	Anzahl Spender- Tiere	Anzahl Empfängertiere	Erfolgreiche Transplantation
3	Normal	8	16	15/16
4	Normal	3	6	6/6
5	Normal	2	4	2/4
7	ADH	1	2	0/2
11	ADH	7	10	6/10
12	ADH	3	6	6/6
23	Invasives Karzinom	1	2	2/2
Kontrollen	Normal	2	4	2/4
insgesamt		27	50	39/50 (78%)

3.6.1.1 Histologische Analyse der Implantationsstelle

Die histologische Untersuchung von Paraffinschnitten durch H/E-Färbung, sollte Aufschluss über den Erfolg des jeweiligen Transplantationsansatzes und das vorliegende Tumorstadium in der Implantationsstelle zum Zeitpunkt der Dissektion bzw. Operation geben. Im Pilotexperiment (Spender 23 Wochen) infiltrierte das implantierte Tumorgewebe das epithelfreie Fettgewebe der Empfängermaus, so dass erwartungsgemäß auch wieder ein invasives Karzinom nach Dissektion diagnostiziert wurde. In den weiteren Experimenten, in denen die Spender 3-12 Wochen alt waren, und somit im transplantierten Gewebe die Expression des Transgens gerade erst begonnen hat bzw. maximal eine ADH vorlag, wurden unterschiedliche Tumorstadien diagnostiziert. In einigen Rezipienten (n=15) konnte ein Tumor makroskopisch festgestellt werden, dessen Invasivität nach mikroskopischer Untersuchung bestätigt werden konnte

(Abbildung 26C). Des Weiteren ergab die histologische Untersuchung der Implantate zum Zeitpunkt der Dissektion bzw. Resektion auch Vorstufen von Karzinomen (ADH; n=14; Abbildung 26A) und kleine Tumore mit einsetzender Invasivität (n=3; Abbildung 26B), die jedoch makroskopisch nicht erkennbar waren. Wie bereits erwähnt, ergab die Diagnose in vier Fällen hypotrophische Drüsen, die ein Korrelat dafür darstellen, dass das Implantat noch nicht angewachsen ist. Es wurden jedoch auch keine Zeichen für eine Abstoßung des Implantats durch die Rezipienten gefunden, so dass diese Experimente in die weiteren Untersuchungen und Auswertungen teilweise mit eingehen. In den zwei Kontrollen, denen das Gewebe aus 12 Wochen alten wt-Balb/c-Mäusen implantiert wurde, und die den Eingriff überlebten, wurde ausschließlich normales Brustepithel gefunden, ohne Anzeichen von Hyperplasie oder neoplastischen Zellen.

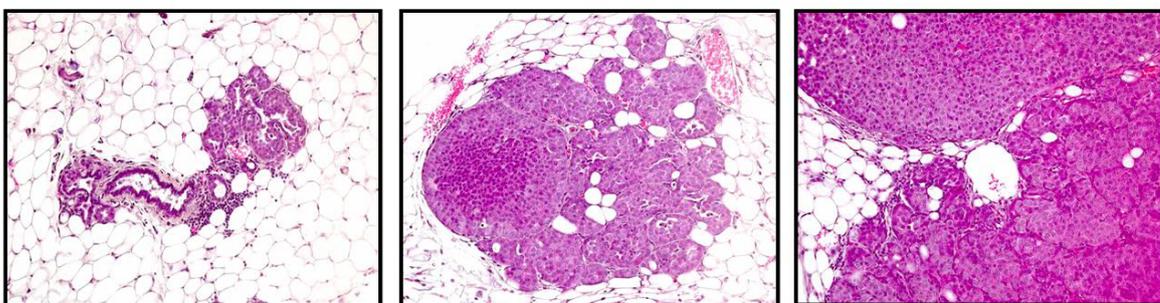


Abbildung 26 Histologie des Implantats Resektion

In den Rezipienten konnten nach der Resektion des Implantats unterschiedliche Tumorstadien diagnostiziert werden. Neben ADH (A, x100) wurden kleine invasive (B, x100) sowie große invasive Tumoren (C, x100) gefunden.

Abhängigkeit des morphologischen Befundes vom Alter des Transplantats

Bei Betrachtung aller Transplantationsansätze kann man die Empfängertiere zum Zeitpunkt der Implantatentnahme in zwei Gruppen einteilen. Das Alter des Implantats ergibt sich aus dem Spenderalter und der Verweildauer im Rezipienten bis zur Dissektion oder Operation. Bis zur 19. Woche konnte unabhängig vom Spenderalter in nur einem Fall (7%) ein invasives Karzinom diagnostiziert werden (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** Tabelle 12). Im Gegensatz dazu liegt die relative Invasivität bei 77%, wenn das transplantierte Gewebe bereits 26 Wochen oder älter ist. Dieser Unterschied wird mit Hilfe des Fisher Exact Test deutlich signifikant ($p < 0,0001$). Dabei gehen jedoch auch die vier Fälle (29%) ein, in denen das Implantat nicht angewachsen ist, so dass im Folgenden das Spenderalter und die Verweildauer als weitere potentielle Einflussfaktoren untersucht werden.

Tabelle 12 **Abhängigkeit des morphologischen Befundes vom Alter des Transplantats**

Alter des Implantats	Hypotrophische Drüsen	Atypische duktale Hyperplasie	Invasives Karzinom
17-19 Wochen	4 (29%)	9 (64%)	1 (7%)
>26 Wochen	0	5 (23%)	17 (77%)

Abhängigkeit des morphologischen Befundes vom Spenderalter und von der Verweildauer

Für die optimale Planung der Transplantationsversuche ergeben sich zwei Möglichkeiten, um ein erfolgreiches Experiment mit kürzerer Versuchsdauer zu ermöglichen, in dem alle Tumorstadien durchschritten werden. Entweder man implantiert den Empfängern Gewebe mit einsetzender Transgen-Expression (3-5 Wochen) oder Gewebe, in dem die Tumorprogression bereits bis zur Vorstufe (ADH) fortgeschritten ist. Daher ergeben sich für die Auswertungen zwei Gruppen von Empfängermäusen bezüglich des Spenderalters. In der Gruppe von Rezipienten (n=22), die Gewebe von Spendern im Alter von 3-5 Wochen erhalten haben, ergab die histologische Untersuchung, dass das Implantat zu 100% in erfolgreichen Transplantationen angewachsen ist (Tabelle 13A). Zudem ist die Wahrscheinlichkeit eines invasiven Tumors im Implantat nach einer Verweildauer von über 23 Wochen (83%) verglichen mit 12-16 Wochen (0%) signifikant höher ($p < 0,005$; Fisher Exact Test). Auffällig ist in der zweiten Gruppe (Spender 11-12 Wochen), dass in den Rezipienten 7-8 Wochen nach Transplantation in nur einem Fall (10%) ein invasives Karzinom diagnostiziert werden konnte (Tabelle 13B). Die Wahrscheinlichkeit der Invasivität war nach 14-15 Wochen zwar höher (50%), jedoch wurde der Unterschied aufgrund der Fallzahl nicht signifikant. Darüber hinaus muß beachtet werden, dass das Implantat in 40% der Rezipienten, die 7-8 Wochen nach Transplantation operiert oder dissektiert wurden, noch nicht angewachsen war.

Beim Vergleich der Gruppen bezogen auf das Spenderalter ist trotz geringer Fallzahlen zu erkennen, dass nach einer Verweildauer von 12-16 Wochen in den Rezipienten, denen Gewebe mit ADH (Spender 11-12 Wochen) implantiert wurde, eher invasive Karzinome diagnostiziert werden (Tabelle 13C). Zudem hat sich gezeigt, dass das Implantat im Alter von 17-19 Wochen bei Dissektion bzw. Resektion unabhängig vom Spenderalter ($p=1$) mit hoher Wahrscheinlichkeit noch nicht invasiv ist. Jedoch war das Implantat bei 11-12 Wochen alten Spendern zu diesem Zeitpunkt in vier Fällen noch nicht angewachsen. Folglich benötigt das Implantat unabhängig vom Spenderalter mindestens 12 Wochen, um anzuwachsen.

Tabelle 13 Abhängigkeit des morphologischen Befundes von Spenderalter und Verweildauer

A Spenderalter: 3-5 Wochen

Verweildauer [Wochen]	Hypotrophische Drüsen	Atypische duktale Hyperplasie	Invasives Karzinom
12-16	0/4	4/4 (100%)	0/4
23-26	0/18	3/18 (17%)	15/18 (83%)

B Spenderalter: 11-12 Wochen

Verweildauer [Wochen]	Hypotrophische Drüsen	Atypische duktale Hyperplasie	Invasives Karzinom
7-8	4/10 (40%)	5/10 (50%)	1/10 (10%)
14-15	0/4	2/4 (50%)	2/4 (50%)

C Verweildauer: 12-16 Wochen

Spenderalter [Wochen]	Hypotrophische Drüsen	Atypische duktale Hyperplasie	Invasives Karzinom
3-5	0/4	4/4 (100%)	0/4
11-12	0/4	2/4 (50%)	2/4 (50%)

D Spenderalter + Verweildauer: 17-19 Wochen

Spenderalter [Wochen]	Hypotrophische Drüsen	Atypische duktale Hyperplasie	Invasives Karzinom
3-5	0/4	4/4 (100%)	0/4
11-12	4/10 (40%)	5/10 (50%)	1/10 (10%)

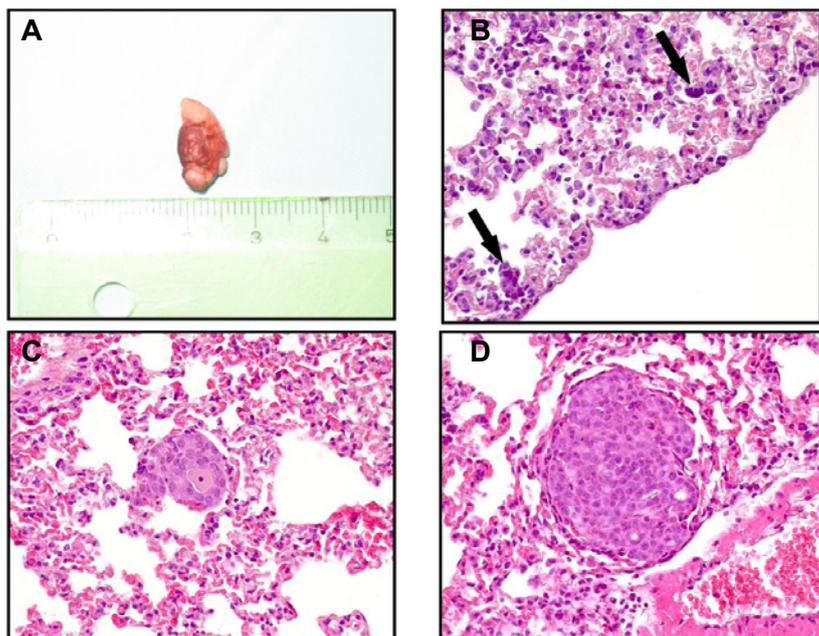
3.6.2 Untersuchung der systemischen Erkrankung in Rezipienten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich transplantiertes Gewebe nach Implantation in das Fettgewebe der Rezipienten über das Stadium der ADH zu invasiven Tumoren entwickelt. Es blieb jedoch bisher der Nachweis einer systemischen Progression in den Empfänger-mäusen aus, welche im Her2/neu-transgenen Mausmodell regelmäßig durch Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark und Auswachsen solider Metastasen in der Lunge festgestellt wurde. Aufgrund dieser Erfahrung wurde untersucht, ob in den wt-Balb/c-Mäuse nach Implantation transgenen Gewebes ebenfalls eine systemische Streuung von Tumorzellen in diese Organe einsetzt.

3.6.2.1 Histologische Untersuchung der Lunge

Wie in Abschnitt 3.6.1 angesprochen, wurde ein Teil der Rezipienten (n=18) nach unterschiedlicher Verweildauer des Implantats dissektiert. Einem anderen Teil der

Empfängermäuse (n=18) wurde das Implantat in einem weiteren operativen Eingriff entfernt, um die systemische Erkrankung nach totaler Resektion zu analysieren. Daher ergeben sich für die Untersuchungen und Auswertungen zwei Gruppen (Abbildung 27E). In den Mäusen, bei denen das Implantat nicht resektiert wurde, konnte in keinem Fall eine makroskopische Metastase beobachtet werden, so dass die Lungen nach H/E-Färbung der Paraffinschnitte mikroskopisch untersucht wurden. Dabei konnten in einer Empfängermaus neoplastische Zellen gefunden werden, die Anzeichen für eine Metastasierung in der Lunge sind, wobei zum Zeitpunkt der Dissektion ein invasiver Tumor in der Implantationsstelle diagnostiziert wurde (Abbildung 27B). Auch in den Rezipienten, denen ein bereits invasiver Tumor implantiert wurde (Pilotexperiment), waren nach 13 Wochen keine Anzeichen einer Metastasierung in der Lunge zu beobachten. Die gesamte Versuchslaufzeit (=Alter des Transplantats) bis zur Dissektion betrug maximal 30 bzw. 36 Wochen im Falle des Pilotexperiments. Diese errechnet sich aus dem Spenderalter und der Verweildauer in der Empfängermaus.



E

Gruppe von Rezipienten	Normal	Anzeichen für Metastasierung
Nicht-operiert	17 (94%)	1 (6%)
Operiert	8 (62%)	5 (38%)

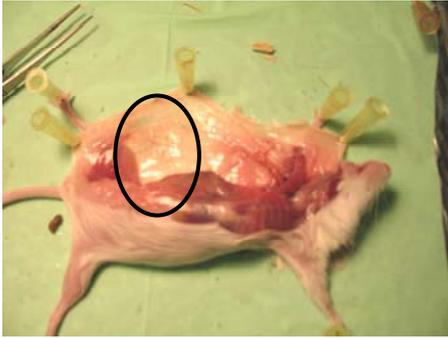
Abbildung 27 Histologische Untersuchung der Lunge zum Zeitpunkt der Dissektion

A) Frisch-dissektierte Lunge einer Empfängermaus. Die Metastasen sind makroskopisch erkennbar (4mm). **B-D)** H/E-Färbung von Paraffinschnitten durch Lungengewebe verschiedener Rezipienten. **B)** Kleine Aggregate neoplastischer Zellen (Pfeile) heben sich von dem normalen umliegenden Lungenepithel ab. **C-D)** Die Mikrometastasen sind aufgrund der Zellmorphologie und kompakten Struktur vom umliegenden normalen Lungenepithel zu unterscheiden. **E)** Die Tabelle

zeigt den absoluten und prozentualen Anteil der Rezipienten, in denen Anzeichen einer Metastasierung in der Lunge erkennbar waren.

(Mikro-)Metastasen in der Lunge nach totaler Resektion

In den Transplantationsansätzen ohne anschließende Resektion wurden äußerst selten (6%) Anzeichen einer Metastasierung festgestellt. Um zu untersuchen, ob die Entwicklung solider Metastasen in der Lunge eine längere Beobachtungszeit beansprucht, wurde einigen Mäuse zu vergleichbaren Zeitpunkten das Implantat resektiert, bevor sie schließlich nach 11-24 Wochen ebenfalls dissektiert wurden. Die vier Rezipienten, in denen das Implantat nicht angewachsen war, wurden bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt. Es entwickelte sich in nur einer Empfängermaus ein lokales Rezidiv an der Implantationsstelle, so dass die Erfolgsrate der Resektion bei 93% liegt (Abbildung 28). Die Dissektion der operierten Mäuse erfolgte nach einer Versuchsdauer von 39-43 Wochen, die sich aus dem Spenderalter, der Verweildauer des Transplantats bis zur Resektion und der Beobachtungszeit bis zur Dissektion ergibt. Im Zuge der Dissektion einer Empfängermaus waren bereits makroskopisch Tumoren in der Lunge erkennbar, die eine Größe von bis zu 4 mm erreichten (Abbildung 27A). Die histologische Untersuchung der H/E-gefärbten Paraffinschnitte der Lunge ergab darüber hinaus, dass in drei weiteren Mäusen kleine Knoten zu finden waren (Abbildung 27C, D). Darunter befindet sich allerdings auch die Maus, in der sich nach Resektion ein lokales Rezidiv entwickelt hat. Zudem konnten in zwei Fällen neoplastische Zellen gefunden werden (Abbildung 27B). Darunter war interessanterweise eine Empfängermaus, in der zum Zeitpunkt der Resektion lediglich eine ADH in der Implantationstelle diagnostiziert wurde. Es bleibt folglich festzuhalten, dass in 5/13 (38%) Empfängermäusen, denen das Implantat erfolgreich entfernt wurde, nach 11-13 Wochen Anzeichen von Metastasen in der Lunge nachweisbar waren (Abbildung 27E). Daraus ergibt sich ein Unterschied zu den nicht-operierten Rezipienten, der zwar nicht signifikant ist, aber Aufschluss über die gesamte Versuchslaufzeit gibt, die für das Auswachsen solider Metastasen in diesem Transplantations-Modell benötigt wird.

**Abbildung 28 Erfolgreiche Resektion des Transplants**

Im Zuge der Dissektion ist 13 Wochen nach der OP kein lokales Rezidiv in der vierten rechten Brustdrüse (Implantationsstelle; Markierung) der Empfängermaus zu erkennen. Daher war die Resektion des implantierten transgenen Gewebes erfolgreich.

Her2-Expression in (Mikro-)Metastasen

Die histologische Untersuchung des Lungengewebes ergab, dass sowohl neoplastische Zellen als auch solide Tumoren in den Rezipienten gefunden wurden. Die starke Her2-Expression nach immunhistochemischer Färbung von Folgeschnitten der dargestellten Tumore (Abbildung 27B-D) in den kleinen Knoten im Gegensatz zum umliegenden Lungenepithel bestätigte den Ursprung aus dem implantierten Brustepithel, da normales Lungenepithel Her2 nicht exprimiert (Abbildung 29B, C). Die Aggregate neoplastischer Zellen dagegen zeigten keine Färbung und somit auch keine Bindung des anti-Her2-Antikörpers (Abbildung 29A).

In einer weiteren Maus konnte zwar ein Karzinom diagnostiziert werden, welches sich jedoch morphologisch aufgrund einer fehlenden kompakten Struktur von den anderen unterschied. Da außerdem keine Her2-Expression (immunhistochemische Färbung) und das Transgen auch nach einer spezifischen PCR in aufgearbeiteten mikrodisezierten Arealen nicht nachgewiesen wurden, handelt es sich wahrscheinlich um ein seltenes autochthones Lungenkarzinom.

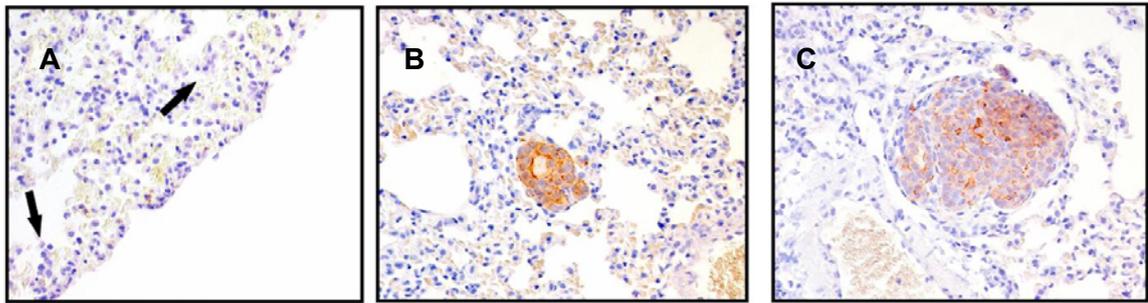


Abbildung 29 Her2-Färbung von Lungenmetastasen

Immunhistochemisch gegen Her2 gefärbte Folgeschnitte des Lungengewebes aus Abbildung 27. **A)** Die Aggregate neoplastischer Zellen (Pfeile) weisen keine Her2-Expression auf. **B-C)** In den kompakten Mikrometastasen hingegen ist die spezifische Bindung des anti-Her2-Antikörpers deutlich zu erkennen, da das umliegende Lungenepithel keine Färbung aufweist. (x200)

3.6.2.2 Immunzytochemische Färbung des Knochenmarks

Eine ICC-Färbung gegen die epithelialen Marker CK und Her2 sollte Aufschluss darüber geben, ob und wann eine systemische Streuung von Tumorzellen ins Knochenmark der Rezipienten stattfindet. Analog zum Balb-neuT-Modell wurde den wt-Mäusen, denen Brustgewebe implantiert wurde, das Knochenmark zum Zeitpunkt der Dissektion entnommen und analysiert.

CK+ Zellen im Knochenmark von Rezipienten

Die ICC-Färbung gegen CK ergab, dass unabhängig von den bisher untersuchten potentiellen Einflussfaktoren (Spenderalter und Verweildauer) in allen 17 Empfängermäusen, denen das Implantat nicht entfernt wurde, positive Zellen zu finden waren (Abbildung 30A). In einigen Mäusen (n=3) konnte aufgrund mangelnder Anzahl von Knochenmarkszellen nach der Aufarbeitung keine Untersuchung vorgenommen werden. Im Gegensatz dazu zeigten 69% (9/13) der Rezipienten nach Resektion CK+ Zellen im Knochenmark, wobei die erfolglosen Transplantationen und Resektionen nicht in diese Auswertung nicht mit eingehen. Interessanterweise wurden jedoch trotz eines nicht-angewachsenen Implantats in 3/4 Fällen CK+ Zellen im Knochenmark gefunden. Erwartungsgemäß wurden diese auch in der Maus mit dem lokalen Rezidiv gefunden. Ein Vergleich der operierten zu den nicht-operierten Mäusen bezüglich der CK-Positivität ist nicht direkt möglich, da die Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen wurden. In dem Knochenmark der Kontrolltiere (n=4), denen Gewebe aus wt-Balb/c-Mäusen implantiert bzw. kein Gewebe eingesetzt wurde, konnten keine CK+

Zellen gefunden werden.

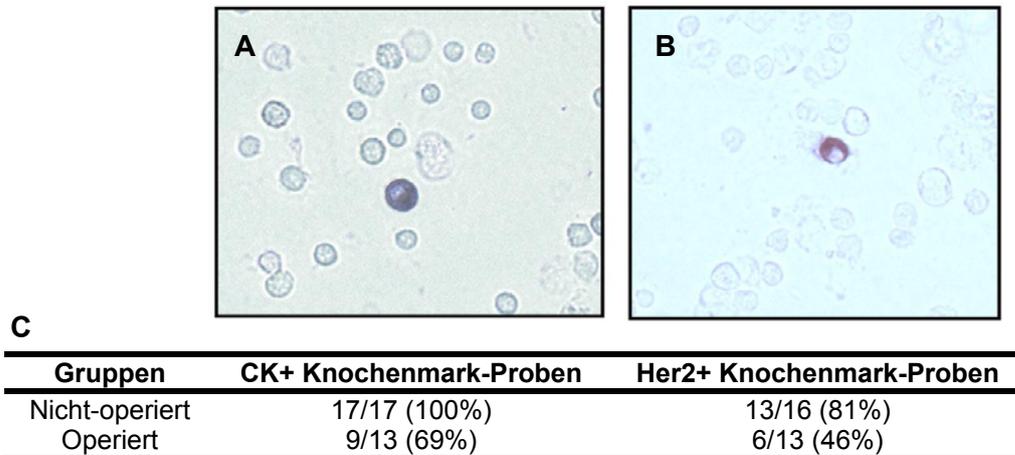


Abbildung 30 Immunzytochemische Färbung von Knochenmark transplantiertter Mäuse
 Die blau-schwarz gefärbten Einzelzellen, die damit eine Bindung des anti-CK-Antikörpers (A) bzw. des anti-Her2-Antikörpers (B) aufweisen, sind von den umliegenden ungefärbten normalen Knochenmarkzellen zu unterscheiden (x200). C) Die Tabelle zeigt die Anzahl CK+ und Her2+ Knochenmarkproben transplantiertter Mäuse.

Her2+ Zellen im Knochenmark von Rezipienten

Neben der ICC-Färbung gegen CK wurde das Knochenmark der Rezipienten auch auf die Expression von Her2 hin untersucht. In Rezipienten ohne Resektion wurden in 81% (13/16) der untersuchten Knochenmarkproben Zellen gefunden, die eine Bindung des anti-Her2-Antikörpers aufwiesen (Abbildung 30B, C). Es konnten zwar ebenfalls Zellen mit Her2-Expression im Knochenmark von Rezipienten nach Resektion nachgewiesen werden, jedoch lag die Her2-Positivität bei lediglich 46% (6/13). Ein Vergleich der beiden Gruppen ist wie bei der ICC-Färbung gegen CK aufgrund unterschiedlicher Untersuchungszeitpunkte nicht direkt möglich, da in den operierten Mäusen zum Zeitpunkt der Dissektion kein Primärtumor mehr vorhanden war. Jedoch ist interessant, dass die CK- und Her2-Positivität im Knochenmark nach Resektion des Primärtumors abnimmt. Im Knochenmark der Kontrollmäuse wurden ebenfalls keine gefärbten Zellen gefunden. Auch hier gehen die als nicht-erfolgreich gewerteten Experimente nicht mit ein. Es wurden jedoch in allen vier Rezipienten ohne angewachsenes Implantat Her2+ Zellen festgestellt.

Bei der Betrachtung aller Untersuchungsergebnisse zur systemischen Progression in den Empfängermäusen bleibt festzustellen, dass eine Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark bzw. Anzeichen einer Metastasierung in der Lunge in 94% (33/35) der Rezipienten nachgewiesen werden konnte.

3.6.3 Genomische Aberrationen in disseminierten Tumorzellen

Die systemische Streuung konnte über den Nachweis disseminierter Zellen im Knochenmark der Rezipienten durch ICC-Färbungen gegen epitheliale Marker (CK und Her2) festgestellt werden. Zudem wurden solide Fernmetastasen nach Resektion durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen in der Lunge gefunden. Es blieb jedoch bisher der Nachweis für den malignen Ursprung der disseminierten Zellen im Knochenmark aus. Demzufolge wurden die CK+ und Her2+ Zellen durch CGH auf genomische Aberrationen hin analysiert. Aus insgesamt fünf Mäusen wurden neun positiv-gefärbte Zellen aus den ICC-Färbungen isoliert und untersucht. In den resultierenden CGH-Profilen der einzelnen Zellen konnten ausschließlich in den CK+ und Her2+ Zellen genomische Aberrationen festgestellt werden (Abbildung 31A). Die sechs ungefärbten Kontroll-Zellen, die ebenfalls aus fünf Mäusen stammen und parallel untersucht wurden, zeigten solche Aberrationen in den CGH-Profilen nicht. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte der maligne Ursprung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark der wt-Empfängermäuse, denen transgenes Gewebe implantiert wurde, bestätigt werden. Und es bleibt festzuhalten, dass bei der Tumorprogression des Implantats in allen Stadien – die ADH eingeschlossen – eine systemische Streuung von genomisch aberranten Tumorzellen stattfand.

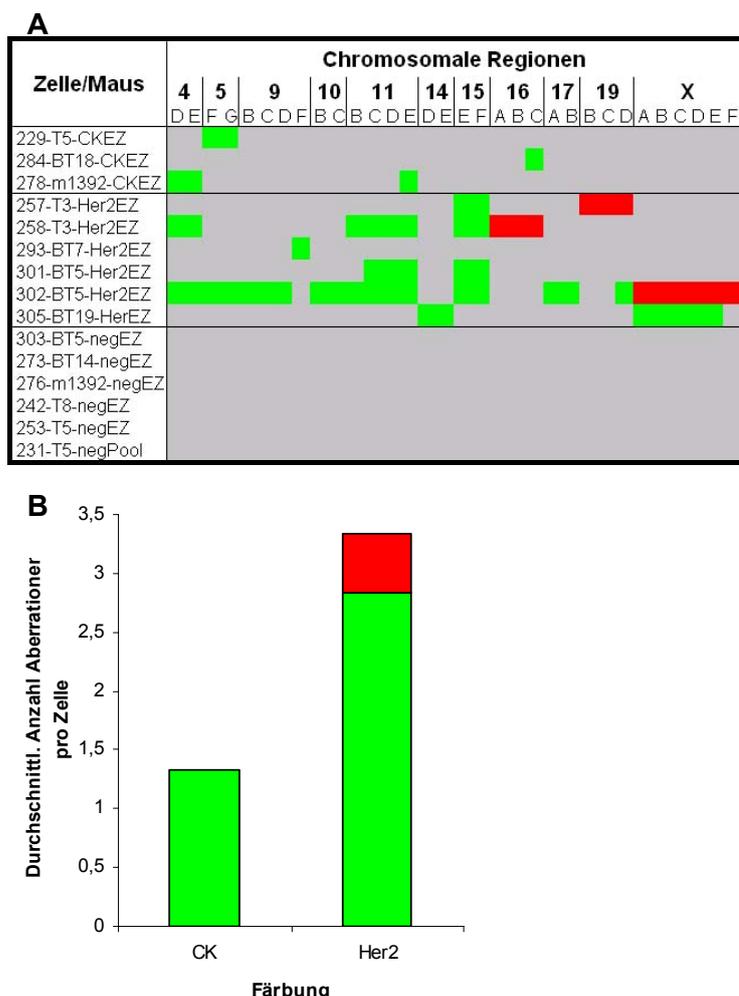


Abbildung 31 CGH-Analyse einzelner disseminierter Zellen

A) Übersicht der genomischen Aberrationen aller mittels CGH analysierten Zellen (linke Spalte). Die Kodierung der untersuchten Zellen gibt folgendes an: Proben-Nr., Maus-ID, Färbung (neg= ungefärbt/Normalzelle), EZ= Einzelzelle oder Agg= Aggregat. Dabei sind die einzelnen Gruppen, CK+, Her2+ und negativ/Normalzellen, voneinander getrennt aufgeführt. Die obere Zeile zeigt ausschließlich chromosomale Regionen an, die in mindestens einer Zelle aberrant sind (Grün=Gewinn; Rot=Verlust; Grau=Normal). **B)** Der Vergleich der durchschnittlichen Anzahl von Aberrationen in CK+ und Her2+ Zellen zeigt, dass Her2+ Zellen mehr Aberrationen angehäuft haben und dass Deletionen ausschließlich in Her2+ festzustellen sind. (Rot= Deletion; Grün= Amplifikation).

Disseminierte Zellen mit heterogenen Aberrationen

Bei eingehender Betrachtung aller Profile der untersuchten Tumorzellen ist zu erkennen, dass die Aberrationen unterschiedliche chromosomale Regionen betreffen (Abbildung 31A). In 4/9 Zellen (44%) liegt ein Gewinn genomischen Materials der chromosomalen Region 11E vor. Auch die Region 15E-F ist in 44% (4/9) der untersuchten Zellen amplifiziert. Abgesehen von diesen beiden Regionen ist auffällig, dass alle analysierten

disseminierten Zellen weitere unterschiedliche Aberrationen aufweisen und damit genomisch sehr heterogen sind.

Ein weiterer Unterschied ist in der Anzahl aberranter Regionen zwischen CK+ und Her2+ zu erkennen (Abbildung 31B). Zum einen haben die Her2+ Zellen mehr Aberrationen angehäuft. Zum anderen sind Deletionen ausschließlich in Her2+ Zellen zu finden. Interessanterweise handelt es sich bei diesen vereinzelt auftretenden Deletionen nicht um einzelne Regionen sondern jeweils um das komplette Chromosom. Bezüglich der Verteilung von Aberrationen ist festzustellen, dass insgesamt Amplifikationen gegenüber Deletionen deutlich überwiegen.

3.7 Genexpressionsanalysen früh-disseminierter Tumorzellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Disseminierung von Tumorzellen ein frühes Ereignis ist. Zudem haben die funktionellen Experimente der Knochenmark- und orthotopen Mamma-Transplantation gezeigt, dass die früh-disseminierten Zellen eine potentielle Malignität besitzen, da Knochenmark-Karzinosen und trotz Resektion einer frühen Läsion Anzeichen einer Metastasierung in der Lunge nachweisbar waren. Diese früh-disseminierten Tumorzellen sollten nun durch eine Genexpressionsanalyse weiter charakterisiert werden. Aufgrund einer intrazellulären ICC-Färbung ist eine solche Analyse mit CK+ Zellen nicht möglich, so dass EpCAM+ Zellen für diese Untersuchung verwendet wurden. Interessanterweise gilt EpCAM nicht nur als Marker disseminierter Tumorzellen, sondern in Kombination mit der Expression weiterer Gene als Marker epithelialer Vorläuferzellen und Krebsstammzellen (Al-Hajj, Wicha et al. 2003); (Gudjonsson, Villadsen et al. 2002). Es wurden spezifische PCR auf den cDNA-Proben, die aus der mRNA der EpCAM+ Zellen generiert wurden, durchgeführt. Zu den Genen, die untersucht wurden und als Marker für Zellen mit Progenitor- und Stammzeleigenschaften gelten, zählen Sca-1 (*stem cell antigen 1*; (Welm, Tepera et al. 2002)) und CD44 (Liu, True et al. 1997). Darüber hinaus wurde die Expression von CD24, das in Krebsstammzellen gar nicht oder gering exprimiert wird (Al-Hajj, Wicha et al. 2003), und die hämatopoetischen Marker CD31 und CD45 untersucht.

Unterschiedliche Genexpression-Profile in EpCAM+ Zellen

Für die Genexpressionsanalysen wurden insgesamt 15 EpCAM+ Zellen aus dem Knochenmark von drei Her2/neu-transgenen Mäusen isoliert. Alle Mäuse hatten ein Alter

von 9-11 Wochen, in denen folglich die Primärtumoren das Stadium der ADH aufwiesen. Es wurden für die weiteren Analysen ausschließlich Zellen verwendet, die das Haushaltsgen β -Aktin exprimieren (Abbildung 32). Weiterhin ist zu erkennen, dass ebenfalls alle Zellen keine Expression von CD31 und CD45 aufwiesen. Interessanterweise zeigten die EpCAM+ Zellen unterschiedliche Kombinationen in der Expression der Gene CD24, CD44 und Sca-1. Die Kombination CD44+/CD24- konnte in drei Zellen („3“, „16“ und „c9“) festgestellt werden, die zusätzlich eine Expression von Sca-1 aufwiesen. In 13/15 (87%) der untersuchten EpCAM+ Zellen wurde zumindest die Expression eines weiteren Markers für Vorläuferzellen detektiert (Sca-1 oder CD44). Acht der hier untersuchten Zellen wurden bereits durch CGH analysiert (Tabelle 4; Abbildung 32B), wobei in 6/8 Zellen genomische Veränderungen festzustellen wurden. Demzufolge weisen Subpopulationen von früh-disseminierten Tumorzellen Merkmale von Krebsstammzellen auf.

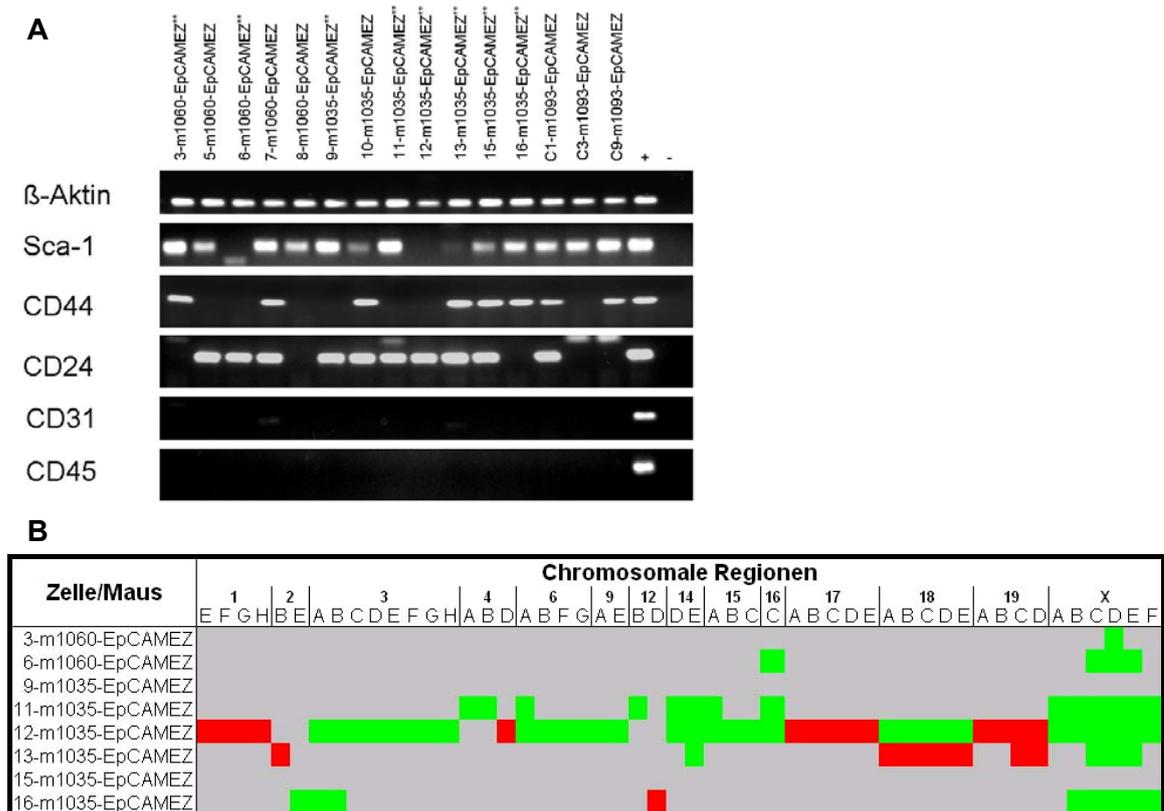


Abbildung 32 Genexpressions- und CGH-Analysen von EpCAM+ Einzelzellen

A) Aufnahmen der 1,5%-Agarose-Gele nach der jeweils spezifischen PCR. Die linke Seite zeigt das jeweilig untersuchte Gen an. Die Spuren „+“ und „-“ entsprechen der Positiv-Kontrolle (siehe Abschnitt 2.1.6, S.39) bzw. Negativ-Kontrolle (ohne DNA). In den weiteren Spuren wurde die cDNA der jeweiligen Zelle untersucht. „**“- Markierung zeigt an, welche Zellen mittels CGH auf genomische Aberrationen untersucht wurden. **B)** Ergebnis der CGH-Analyse aller untersuchten EpCAM+ Zellen (linke Spalte). Es sind nur chromosomale Regionen angegeben, die in mindestens einer Zelle aberrant sind (Grün= Amplifikation, Rot= Deletion, Grau= nicht aberrant)

4 Diskussion

4.1 Balb-neuT-Modell eignet sich zur Untersuchung des Mammakarzinoms

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die systemische Tumorprogression im Mammakarzinom anhand des Balb-neuT-Mausmodells zu untersuchen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des Primärtumors im Mammagewebe nach histopathologischer Betrachtung der Tumorprogression im Patienten ähnelt. In der Balb-neuT-Maus wird mit der Ausschüttung von Östrogen die Expression des Her2/neu-Transgens unter der Kontrolle des MMTV-Promotors ausgelöst. Dadurch erfolgt die simultane Initiierung der Karzinogenese in allen zehn Brustdrüsen. In der Folge entwickeln sich die Tumore in dem Mausmodell wie in Brustkrebspatientinnen über die Vorstufen ADH und DCIS bis zu invasiven Karzinomen. Der Verlauf der lokalen Tumorprogression über die verschiedenen Tumorstadien konnte so die Beobachtungen einer Studie bestätigen, in der mit demselben Mausmodell gearbeitet wurde (Boggio, Nicoletti et al. 1998). Im Balb-neuT-Modell kann folglich der Verlauf der Tumorprogression zu verschiedenen Zeitpunkten unterbrochen werden, um Untersuchungen zu einer systemischen Erkrankung vorzunehmen.

Manifeste Metastasierung im Balb-neuT-Modell

Brustkrebspatientinnen versterben zumeist nicht am Primärtumor, der in einer Operation entfernt wird, sondern an den Folgen der systemischen Ausbreitung von Tumorzellen, die zu manifesten Fernmetastasen auswachsen. Dabei korreliert eine Überexpression des Onkogens Her2 im Primärtumor, welche in 20-30% der Patientinnen nachweisbar ist, mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung und folglich auch einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung (Slamon, Godolphin et al. 1989). Um die systemische Erkrankung im Mausmodell eingehender untersuchen zu können, müssen sich in diesem ebenfalls Metastasen in sekundären Organen manifestieren. Die Untersuchungen der Balb-neuT-Mäuse haben ergeben, dass sich in der Lunge solide Fernmetastasen entwickeln. Diese konnten sowohl makroskopisch, sowie histologisch und auch aufgrund einer starken Her2-Expression nachgewiesen werden. Die Inzidenz einer manifesten Lungenmetastasierung wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht ermittelt, so dass ein Vergleich zu anderen Studien nicht möglich ist. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine manifeste Lungenmetastasierung in 20% der Mäuse mit aktiviertem Her2/neu-

Transgen oder gar in 100% der Fälle im MMTV/VEGF-Mausmodell eintritt (Dankort, Maslikowski et al. 2001; Schoeffner, Matheny et al. 2005). Für die weiteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Entwicklung von Metastasen war jedoch allein die Tatsache ausschlaggebend, dass sich Fernmetastasen regelmäßig manifestieren. Somit konnte gezeigt werden, dass sich der aggressivere Krankheitsverlauf in Patientinnen, die eine Überexpression von Her2 aufweisen, in dem vorliegenden Mausmodell mit induzierter Her2/neu-Expression widerspiegelt. Folglich ist es möglich, in Balb-neuT-Mäusen nicht nur die lokale Tumorprogression zu untersuchen, sondern auch die Prozesse zu analysieren, die einer soliden Metastasierung vorausgehen.

4.2 Nachweis der Streuung von Mammakarzinom-Zellen in Balb-neuT-Mäusen

Für das Auswachsen zu manifesten Fernmetastasen ist es notwendig, dass Tumorzellen vom Primärtumor systemisch gestreut werden. Diese frühen Schritte in der Metastasierung über den Nachweis gestreuter einzelner Tumorzellen wurden bisher jedoch nicht in Mausmodellen analysiert, so dass auch keine Nachweismethode etabliert ist. Bei Krebspatienten hingegen werden zahlreiche Antikörper für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark verwendet, deren Gemeinsamkeit die Erkennung epithelialer Antigene ist. Aufgrund der prognostischen Relevanz disseminierter Tumorzellen in klinischen Studien zum Mammakarzinom (Braun, Vogl et al. 2005; Janni, Rack et al. 2005), wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls im Knochenmark der transgenen Mäuse nach ihnen gesucht. Neben Her2, das in den Primärtumoren überexprimiert wird, wurden Antikörper gegen CK8/18 und EpCAM verwendet, welche beide etablierte Marker zum Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Patienten sind (Pantel, Schlimok et al. 1993; Kubuschok, Passlick et al. 1999).

In der vorliegenden Dissertation wurden durch Immunfärbungen erstmals einzelne disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark eines Tumor-Mausmodells gefunden. Alle Immunfärbungen zusammengenommen wurden in 97% (Her2), 98% (CK) und 93% (EpCAM) der untersuchten Knochenmark-Proben positive Zellen für den jeweiligen epithelialen Marker nachgewiesen. Unabhängig vom untersuchten Marker wurden so in 98% (55/56) aller transgenen Mäuse Her2+, CK+ oder EpCAM+ Zellen im Knochenmark gefunden. Der Nachweis solcher Zellen im Knochenmark kann unterschiedliche Gründe haben. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich normale Epithelzellen handelt, da die untersuchten Antigene nicht ausschließlich von Epithelzellen der Mamma exprimiert werden (Lacroix 2006), da auch in seltenen Fällen positive Zellen in wt-Mäusen gefunden

wurden. Das Auffinden dieser Zellen in transgenen und wt-Mäusen kann zudem auf Färbeartefakten beruhen. Eine Möglichkeit für gefärbte Her2+ Zellen im Knochenmark könnte darin bestehen, dass die Bindung unspezifischer Transkriptionsfaktoren am MMTV-Promotor eine Expression des Her2/neu-Transgens in normalen Knochenmarkzellen auslöste. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten jedoch deutlich zeigen, dass es sich bei den Epithelmarker-positiven Zellen im Knochenmark und der Lunge um disseminierte epitheliale Zellen handelt, die ihren Ursprung in den multiplen Primärtumoren der Mamma haben. Die Untersuchungen an verschiedenen Lungentumoren in den Her2/neu-transgenen Mäusen zeigen, dass es sich um Metastasen der Mammakarzinome handelt, da sie nicht nur eine starke Her2-Expression, die im umliegenden Lungengewebe nicht zu beobachten war, sondern auch mammaspezifische Gene exprimieren. Darüber hinaus konnten ausschließlich in den untersuchten positiv-gefärbten Zellen (95%) aus dem Knochenmark der transgenen Mäuse genomische Veränderungen festgestellt werden, die häufig mit Mammakarzinomen assoziiert sind (Hanahan and Weinberg 2000). Der Vergleich an dieser Stelle zu einer Studie an Brustkrebspatientinnen, in der 64% der CK+ Zellen im Knochenmark genomisch aberrant sind (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003), ist nicht direkt möglich, da das Patienten-Kollektiv im Gegensatz zum Balb-neuT-Modell heterogen ist. Im Übrigen zeigte eine weiterführende Studie dieses Patienten-Kollektivs, dass trotz balanzierendem CGH-Profil in CK+ Zellen genetische Veränderungen festgestellt wurden (Schardt, Meyer et al. 2005). Das regelmäßige Auffinden positiver Zellen ausschließlich im Knochenmark der Rezipienten nach orthotoper Transplantation transgenen Mammagewebes bestätigte, dass diese Zellen vom implantierten Primärtumor abstammen. Außerdem ist so eine unspezifische Expression des Transgens unwahrscheinlich. Im Gegensatz zu wt-Mäusen (Median: 0/0) wurden in den Proben der transgenen Mäuse (Median: 5/7) deutlich mehr positive Zellen im Knochenmark gefunden, die zudem nach Transplantation eine Karzinose im Knochenmark der bestrahlten wt-Mäuse auslösen konnten. So ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den positiven Signalen der Immunfärbungen ausschließlich in den wt-Mäusen um Färbeartefakte handelt. Die Epithelmarker-positiven Zellen in den transgenen Mäusen hingegen sind malignen Ursprungs, haben sich von den multiplen Primärtumoren aus dem Mammagewebe abgelöst und im Knochenmark angesiedelt. Die systemische Streuung von Tumorzellen im Balb-neuT-Modell lässt sich demnach nicht nur durch das Auswachsen manifester Metastasen in sekundären Organen (Lunge) sondern auch durch einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisen. Somit ist in dem Mausmodell die Analyse der frühen Prozesse einer Metastasierung möglich.

Frühe Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark

Die Tumorprogression konnte in dem verwendeten Her2/neu-transgenen Mausmodell zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert und der Disseminierungs- und Metastasierungsstatus in den verschiedenen Stadien des Primärtumors ermittelt werden. In dieser Arbeit konnte der Beweis erbracht werden, dass die systemische Streuung von Tumorzellen ein frühes Ereignis im Verlauf der Tumorprogression des vorliegenden Mausmodells ist, und nicht mit dem Tumorstadium korreliert. Erwartungsgemäß wurden in 95% (18/19) der Her2/neu-transgenen Mäuse mit invasiven Karzinomen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gefunden. Überraschenderweise jedoch konnten in jeweils 100% der Balb-neuT-Mäuse, in denen zum Zeitpunkt der Dissektion mit DCIS (8/8) oder ADH (18/18) laut Definition nicht-invasive Karzinome im Mammagewebe vorlagen, ebenfalls disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Sogar zu Beginn der Transgen-Expression im Mammagewebe wurden in 100% (4/4) der Mäuse bereits positive Zellen für mindestens einen der untersuchten epithelialen Zellmarker gefunden. Im Übrigen konnte keine Korrelation in der Anzahl disseminierter mit der lokalen Tumorprogression festgestellt werden. Darüber hinaus konnten einzelne Her2+ Zellen und Zellaggregate in der Lunge von transgenen Mäusen gefunden werden, in denen sich der Primärtumor lediglich im Stadium eines DCIS oder einer ADH befand. In 92% (11/12) der Rezipienten, in denen das implantierte transgene Mammagewebe zum Zeitpunkt der Dissektion oder Resektion noch nicht invasiv war (ADH), wurden ebenfalls disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen. Außerdem konnte mit dem Nachweis von disseminierten CK+ Zellen im Knochenmark von MMTV-PyMT-Mäusen in nicht-invasiven Tumorstadien gezeigt werden, dass die frühe systemische Streuung nicht ein alleiniges Phänomen des Her2/neu-transgenen Mausmodells ist.

Augrund verschiedener Studien an Brustkrebspatientinnen gibt es Hinweise darauf, dass auch im Verlauf der Tumorprogression des humanen Mammakarzinoms eine frühe systemische Streuung von Tumorzellen existiert. So wurden disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von 30% der Patientinnen gefunden, in denen ein nicht-invasives Karzinom (DCIS) diagnostiziert wurde (Diel, Kaufmann et al. 1996). Allerdings erfolgte hier der Nachweis dieser Zellen durch TAG12, das im Allgemeinen nicht als Marker für Mikrometastasen im Knochenmark gilt. Mit der Verwendung eines anderen Antikörpers konnten in 15% (3/20) der Patientinnen ebenfalls mit einem *in situ* Karzinom CK+ Zellen im Knochenmark gefunden werden (Funke, Fries et al. 1996). In einer weiteren Studie wurden in 13% von 39 Patientinnen mit einem DCIS CK+ Zellen im Knochenmark nachgewiesen (Husemann, Geigl et al. 2008). Hier wurde hingegen der allgemein

anerkannte Antikörper A45-B/B3 zum Nachweis disseminierter Tumorzellen (CK+) verwendet. Weitere Hinweise für eine frühe Streuung sind klinischen Studien zu entnehmen, in denen Tumoren unbekannter Herkunft beschrieben wurden (Abbruzzese, Abbruzzese et al. 1994; van de Wouw, Janssen-Heijnen et al. 2002). Zudem konnte eine Metastasierung in Patientinnen festgestellt werden, denen der primäre Tumor im DCIS-Stadium total resektiert wurde (Silverstein, Lagios et al. 1998; Solin, Fourquet et al. 2001).

Es konnte in der vorliegenden Dissertation eindeutig dargestellt werden, dass die Streuung von Tumorzellen ein frühes Ereignis in der Tumorprogression ist. Die Untersuchungen des Lungengewebes zeigten zudem, dass sich Primärtumor und Metastase in den transgenen Mäusen offenbar parallel entwickeln. Diese Ergebnisse unterstützen demnach das alternative Modell der Metastasierung (Abbildung 3B), wonach die Disseminierung ein frühes Ereignis in der Tumorprogression ist und sich Primärtumor und Metastase durch Anhäufung verschiedener Mutationen parallel zueinander entwickeln (Klein et al. 2004). Jedoch konnte bisher noch kein funktionelles Experiment nachweisen, ob die Epithelmarker-positiven Zellen im Knochenmark eine solide Metastasierung auslösen können.

4.3 Disseminierte Tumorzellen besitzen proliferatives Potential

Im Patienten ist aufgrund des Befundes von Mikrometastasen nur die Assoziation mit einer Prognose möglich. So wurde in einer Studie von über 4700 Brustkrebspatientinnen gezeigt, dass das Auftreten von Fernmetastasen in Patientinnen, in denen zum Zeitpunkt der OP CK+ Zellen im Knochenmark vorliegen, doppelt (2,03) so wahrscheinlich ist als in Patientinnen, in denen keine CK+ Zellen gefunden wurden (Braun, Vogl et al. 2005). Ein direkter Nachweis, ob die CK+ Zellen die manifeste Metastasierung auslösen ist jedoch in Patientinnen nicht möglich. Die Experimente der Knochenmark-Transplantation in der vorliegenden Dissertation konnten hingegen direkt belegen, dass die disseminierten Tumorzellen im Knochenmark transgener Mäuse ein proliferatives Potential besitzen und eine Karzinose auslösen können. Die Untersuchung des Knochenmarks der Rezipienten, denen nach Bestrahlung transgenes Knochenmark injiziert wurde, ergab 18-50 Wochen nach der Transplantation, dass in 90% der Fälle 6-51% aller Knochenmarkzellen CK exprimieren. Man kann daher von einer Knochenmark-Karzinose in den Rezipienten sprechen, welche auch eine Erklärung für das Versterben einiger Mäuse wäre. Dieses proliferative Potential konnte auch in früh-disseminierten Zellen festgestellt werden, da Knochenmark von Spendern ohne invasives Karzinom ebenfalls eine Karzinose auslöste.

Da die Doppelfärbungen gezeigt haben, dass über 70% der disseminierten Zellen CK exprimieren, galt als Maß für die injizierte Tumorlast die Anzahl CK+ Zellen im Knochenmark des jeweiligen Spenders hochgerechnet auf 1×10^7 Knochenmark-Zellen. Erstaunlicherweise reichte dabei eine Tumorlast von ca. 80 CK+ Zellen aus, um eine Karzinose in den Empfänger-mäusen herbeizuführen. Eine klinische Studie konnte durch ICC-Färbungen zeigen, dass in 15,9% der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen eine Co-Expression von Ki67 auf CK+ Zellen nachweisbar war, die damit ein proliferatives Potential besitzen (Pantel, Schlimok et al. 1993).

Durch das Experiment der Knochenmark-Transplantation konnte dargestellt werden, dass die disseminierten Tumorzellen aus Primärtumoren des Her2/neu-transgenen Mausmodells selbst maligne sind. Es wurde jedoch nicht geklärt, welche der Tumorzellen zur Karzinose auswachsen können. Denn es ist möglich, dass unterschiedliche Subpopulationen von disseminierten Zellen im Knochenmark vorliegen, da die disseminierten Zellen mit unterschiedlichen epithelialen Markern nachgewiesen wurden. Die Zellen in den Rezipienten exprimieren zwar Zytokeratin, was jedoch eine Folge der Anhäufung weiterer Mutationen oder der Einflüsse des neuen Milieus sein kann.

Disseminierung maligner Zellen nach orthotoper Mamma-Transplantation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass sich die systemische Tumorprogression anhand des Her2/neu-transgenen Mausmodells untersuchen lässt. Es konnte zudem festgestellt werden, dass früh-disseminierte Tumorzellen nach Transplantation eine Knochenmark-Karzinose auslösen und somit auch für die Lungenmetastasierung verantwortlich sein könnten. Da in Balb-neuT-Mäusen die Tumore zwar sporadisch jedoch multifokal in allen zehn Brustdrüsen entstehen, sind auch die disseminierten Tumorzellen multiplen Ursprungs. Daher war es Ziel dieser Arbeit ein Modell zu entwickeln, welches nicht nur der Situation in Brustkrebspatientinnen nahe kommt sondern auch die Analyse der disseminierten Tumorzellen ermöglicht, die eine Lungenmetastasierung bewirken und einen direkten Bezug zu ihrem Ursprung zulassen. Das bedeutet, dass sich wie in Patientinnen trotz kompletter Resektion des Primärtumors Fernmetastasen manifestieren, um die MRD und Prozesse der Metastasierung untersuchen zu können. Nach Transplantation von Mammagewebe transgener Mäuse in das gesäuberte Fettgewebe von wt-Mäusen, liegt in den Rezipienten nur ein Primärtumor vor. Daraus ergeben sich verschiedene Vorteile im Vergleich zum Her2/neu-transgenen Mausmodell. Zum einen ist die Diagnose eines Tumors nicht nur schneller, sondern auch

präziser. Bei Tumoren in zehn Brustdrüsen könnte es passieren, dass ein Areal übersehen wird, das Anzeichen einer Invasivität aufweist, obwohl im restlichen Mammagewebe ausschließlich nicht-invasive Läsionen diagnostiziert werden. Zum anderen gestaltet sich auch eine erfolgreiche Resektion eines Tumors wesentlich einfacher als des kompletten Mammagewebes bei zehn Tumoren. Man kann davon ausgehen, dass sich nach der Entfernung von zehn Tumoren eher lokale Rezidive bilden. Dies erschwert wiederum die Untersuchung der MRD und resultierenden Metastasierung im transgenen Modell. Im syngenen Transplantationsmodell der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich in den Rezipienten nicht nur der einzelne Primärtumor über die verschiedenen Tumorstadien entwickelt, sondern auch eine frühe Streuung von Tumorzellen und nach Resektion des Tumors Fernmetastasen manifestieren. Zudem konnten trotz kompletter Resektion des Primärtumors im Stadium der ADH und ohne lokales Rezidiv Anzeichen von Lungenmetastasen (neoplastische Zellen) in einer Empfängermaus gefunden werden. Der Grund für die Her2-Negativität dieser neoplastischen Zellaggregate könnte eine Immunreaktion der Rezipienten sein, durch die die Expression des aktivierten Her2/neu-Transgen in den disseminierten Zellen unterdrückt wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass auch Her2-negative Subpopulationen von Tumorzellen disseminieren, denn die Doppelfärbungen in transgenen Mäusen hat gezeigt, dass nicht alle disseminierten Zellen Her2 exprimieren. Nach Extravasation dieser Zellen in die Lunge, findet nach weiterer Transformation eine Proliferation und Differenzierung statt. Dies könnte zu einer erhöhten Her2-Expression führen, so dass das Protein in Mikrometastasen wiederum nachgewiesen werden konnte. Demnach konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nur durch die Knochenmark-Transplantation gezeigt werden, dass die disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ein proliferatives Potential besitzen und eine Karzinose auslösen können. Auch die Mamma-Transplantation hat gezeigt, dass disseminierte Tumorzellen nach Resektion des Primärtumors zu einer manifesten Lungenmetastasierung führen. Zudem gibt es Hinweise, dass aus früh-gestreuten Zellen ebenfalls solide Fernmetastasen resultieren können.

Es wurden in den letzten Jahren immer häufiger Transplantationsmodelle etabliert, die ebenfalls insbesondere Aufschlüsse über die Metastasierung liefern sollten. Anhand dieser Experimente konnten verschiedene Gene identifiziert werden, die die organspezifische Metastasierung beispielsweise im Knochen oder in der Lunge beeinflussen (Kang, Siegel et al. 2003; Minn, Gupta et al. 2005). Der Nachteil solch xenogener Transplantationen ist jedoch, dass das umliegende Stroma von unterschiedlicher Herkunft ist, und somit die Untersuchung einer artspezifischen Metastasierung nicht zulässt. In

einer Studie zur Umgehung dieses Problems wurden Brustkrebszellen und Knochenstücke aus dem Menschen in die Maus implantiert. So wurde ein humanes Milieu geschaffen, und es konnte eine Metastasierung in dem transplantierten Knochen beobachtet werden (Kuperwasser, Dessain et al. 2005). Zudem erfordern xenogene Transplantationsexperimente ein nicht-intaktes Immunsystem der Empfängermäuse, wodurch ihr Einfluss auf die lokale als auch auf die systemische Tumorprogression nicht berücksichtigt wird. Syngene Transplantationsmodelle teilen diese Nachteile nicht. So konnten durch die syngene Transplantation einer Zelllinie und Analyse von Expressions-Signaturen zu Subpopulationen dieser Zelllinie Unterschiede in den verschiedenen Stadien der Tumorprogression festgestellt werden (Aslakson and Miller 1992; Yang, Mani et al. 2004). Jedoch basieren alle hier aufgeführten Studien auf der Transplantation von invasivem Tumorgewebe, Zellsuspensionen von invasiven Tumoren oder immortalisierten Zelllinien. Daher ist es nicht möglich, die frühen Stadien in der Tumorprogression anhand dieser Modelle zu untersuchen. Folglich lässt sich nicht bestimmen, wann Tumorzellen streuen und die Metastasierung initiiert wird. Vor allen Dingen ist es mit diesen Modellen nicht möglich, das Metastasierungspotential (früh-)disseminierter Zellen zu untersuchen. Im Gegensatz dazu ermöglicht das Transplantationsmodell der vorliegenden Arbeit alle diese Untersuchungen.

Evaluierung der experimentellen Einflussfaktoren auf die orthotope Mamma-Transplantation ermöglicht optimale Untersuchung der MRD

Es konnten durch verschiedene Versuchsreihen experimentelle Faktoren ermittelt werden, die einen Einfluss auf die Tumorprogression in den Empfängermäusen nach Transplantation transgenen Mammagewebes haben. So wurde untersucht, bei welchem Spenderalter, 3.-5. Woche, 11.-12. Woche oder 23. Woche, sich die Entwicklung des Tumors über die verschiedenen Stadien am besten kontrollieren lässt. Des Weiteren wurde ermittelt, nach welcher Verweildauer des Implantats im Fettgewebe der Empfänger die verschiedenen Tumorstadien (ADH und invasives Karzinom) erreicht sind. Schließlich galt es, die Dauer nach der Resektion des Implantats zu bestimmen, in der sich Fernmetastasen in den Rezipienten manifestieren. Im Vordergrund stand dabei immer der Nachweis von disseminierten Tumorzellen, die Hinweise für eine MRD sind, um die frühen Prozesse einer Metastasierung analysieren zu können. Durch die Evaluierung dieser Faktoren hat sich für die Mamma-Transplantation folgender Versuchsablauf als optimal herauskristallisiert. Das Mammagewebe aus transgenen Spendern der 3. Woche wird in wt-Balb/c-Mäuse aus der 3. Woche transplantiert, worin im Übrigen auch ein großer

praktischer Vorteil für die Versuchsplanung liegt. Da bei der Zucht der Balb-neuT-Mäuse Nachkommen hervorgehen, die hemizygot für das Transgen Her2/neu oder wt-Balb/c-Mäuse sind, kann das Mammagewebe zwischen Geschwistern transplantiert werden. Je nach Verweildauer (mindestens 12 Wochen) entwickeln sich in der Implantationsstelle die verschiedenen Stadien des Mammakarzinoms. Nach 12-15 Wochen können ADH diagnostiziert werden, die sich nach etwa 23 Wochen zu invasiven Karzinomen entwickeln. Zu beiden Zeitpunkten sind disseminierte Tumorzellen bereits nachweisbar. Durch die komplette Resektion des Implantats ist es möglich die Mäuse länger zu beobachten, so dass sich aufgrund der systemischen Streuung von Tumorzellen nach einer gesamten Versuchsdauer von mindestens 40 Wochen Fernmetastasen manifestieren können. Je nach Resektionszeitpunkt können nun auch Analysen über das metastatische Potential früh- oder spät-disseminierter Zellen angestellt werden, wobei sich möglicherweise unterschiedliche Kinetiken einer Metastasierung einstellen. Dieses Modell der Mamma-Transplantation kommt der Situation in Brustkrebspatientinnen verschiedener Erkrankungsstadien sehr nahe.

4.4 Subpopulation disseminierter Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Untersuchung von lokaler und systemischer Tumorprogression zu verschiedenen Zeitpunkten im Balb-neuT-Modell und dem Transplantationsmodell möglich ist. Da der Nachweis disseminierter Zellen mit unterschiedlichen epithelialen Markern im Knochenmark der gleichen Mäusen möglich war, stellte sich die Frage, ob die Marker CK, Her2 und EpCAM auf denselben Zellen exprimiert werden, oder ob sich Subpopulationen bilden. Möglicherweise ergeben sich daraus Hinweise, ob und welche Zellen das Potential haben, eine Karzinose oder Metastasierung auszulösen. Die kombinierten Immunfärbungen haben gezeigt, dass die Expression aller möglichen Markerkombinationen auf disseminierten Tumorzellen auftreten kann. So wurden in 100% sowie 86% der transgenen Mäuse Zellen nach Doppelfärbung gegen die epithelialen Marker CK und Her2 disseminierte Zellen im Knochenmark gefunden, die nur CK bzw. Her2 exprimieren. In 43% der Mäuse wurden Zellen gefunden, die beide Marker exprimieren. Daraus folgt, dass in den Mäusen Subpopulationen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark vorliegen. So konnte eine heterogene Her2-Expression beobachtet werden, denn in 43% der Mäuse sind nicht alle CK+ Zellen zugleich Her2+. Analog dazu zeigten 29% der Fälle, dass nicht alle gefundenen Her2+ Zellen auch CK exprimieren. Diese Aufspaltung disseminierter Zellen konnte auch in klinischen Studien beobachtet werden. So konnte ebenfalls in

Doppelfärbungen festgestellt werden, dass nicht alle CK+ Zellen zugleich Her2 exprimieren. Der Prozentsatz von Patienten mit CK+ Zellen im Knochenmark, in denen ebenfalls eine Her2-Expression nachgewiesen wurde, reichte von 43-87% (Braun, Hepp et al. 1999; Braun, Schlimok et al. 2001; Kallergi, Mavroudis et al. 2007). Auch die Heterogenität disseminierter Tumorzellen konnte im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen festgestellt werden. So wurde in 41% der Patientinnen mit CK+ Zellen im Knochenmark beobachtet, dass neben einfach CK+ auch doppelt-positive (CK+/Her2+) Zellen existieren (Solomayer, Becker et al. 2006). Im Mammagewebe der transgenen Mäuse entstehen die primären Tumore aufgrund der induzierten Her2-Überexpression, so dass man erwarten würde, dass die systemisch gestreuten Tumorzellen ebenfalls Her2 exprimieren. Interessanterweise jedoch exprimieren nur 49% aller gefärbten Zellen Her2, während 71% den epithelialen Marker CK exprimieren. Eine klinische Studie konnte ebenfalls feststellen, dass im Primärtumor von Patientinnen Her2 stark exprimiert wird, wohingegen die entsprechenden disseminierten Zellen (CK+) nur selten oder schwach Her2 exprimieren (Kasimir-Bauer, Otterbach et al. 2003).

In der vorliegenden Dissertation zeigte sich nach Doppelfärbung gegen CK und EpCAM ebenfalls, dass sich die disseminierten Tumorzellen in Subpopulationen aufspalten. So wurden in 57% der untersuchten Mäuse doppelt-positive Zellen im Knochenmark gefunden. In 86% sowie 71% der transgenen Mäuse konnten Zellen nachgewiesen werden, die nur CK bzw. EpCAM exprimieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass von allen CK+ Zellen nur 33% auch EpCAM exprimieren. Analog dazu konnte eine CK-Expression in 54% aller EpCAM+ Zellen festgestellt werden. Auch hier gibt es klinische Studien, die sich mit der Co-Expression dieser beiden epithelialen Marker auf disseminierten Zellen befassten. So konnte nach Anreicherung von EpCAM+ Zellen aus dem Knochenmark nur in 26% der Patientinnen mit CK+ Zellen eine Co-Expression beider epithelialer Marker festgestellt werden (Kasimir-Bauer, Otterbach et al. 2003). Eine weitere Studie von Patientinnen mit Mammakarzinom zeigte, dass ebenfalls nach Anreicherung von EpCAM+ Zellen und Doppelfärbung gegen CK und EpCAM nur 7,4% der Patientinnen doppelt-positive Zellen aufwiesen (Thurm, Ebel et al. 2003). Zudem wurde in dieser Studie festgestellt, dass nach Anreicherung mononuklearer Zellen und ICC-Färbung keine der CK+ Zellen ebenfalls EpCAM exprimierten. Demnach sind beide Marker nur selten gemeinsam in einer disseminierten Tumorzelle exprimiert. Die relative Häufigkeit doppelt-positiver Zellen im Knochenmark der Her2/neu-transgenen Mäuse ist zwar deutlich höher als in Brustkrebspatientinnen, jedoch wurden in den erwähnten Studien heterogene Patienten-Kollektive untersucht.

Aus beiden Doppelfärbungen wird deutlich, dass Subpopulationen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark existieren. Es hat sich dabei gezeigt, dass der Großteil solcher Zellen (über 70%) CK exprimiert. Es bleibt jedoch unklar, was dieser Aufspaltung in Subpopulationen zugrunde liegt. Zum einen ist es möglich, dass sich nur ein Zelltyp von der primären Läsion abgelöst und im Knochenmark angesiedelt hat. Faktoren des neuen Milieus und weitere Mutationen bewirkten möglicherweise eine unterschiedliche Weiterentwicklung dieser Zellen, so dass sich die Zellen folglich in verschiedenen Differenzierungsstadien befanden. Zum anderen ist vorstellbar, dass sich unterschiedliche Zellpopulationen bereits von der Primärläsion ablösen, und somit die disseminierten Zellen im Knochenmark unterschiedliche Expressions-Profile von epithelialen Markern zeigen.

Disseminierte Zellen zeigen Merkmale von Stammzellen

Aus den bisherigen Erkenntnissen geht hervor, dass die Tumorzellen früh während der Tumorprogression des Mammakarzinoms in Balb-neuT-Mäusen disseminieren und Subpopulationen bilden. Es blieb jedoch die Frage offen, welche der gefundenen disseminierten Zellen in der Lage sind, eine manifeste Metastasierung auszulösen. Eine limitierte Phänotypisierung sollte daher Aufschlüsse darüber ermöglichen, ob in den früh-disseminierten Zellen bestimmte Merkmale nachweisbar sind, die mit einem malignen Potential assoziiert werden können. Die in der Expressionsanalyse untersuchten Gene gelten in bestimmter Kombination als Marker für Krebsstammzellen, die Stammeigenschaften besitzen, und aus denen Karzinome entstehen können. So wurde in einer Studie gezeigt, dass die Injektion von 100 Zellen der angereicherten Population aus EpCAM+/CD44+/CD24- Zellen ausreichten, um eine Karzinogenese im Mammagewebe einer Maus zu bewirken (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Die hämatopoetischen Zellmarker CD31 und CD45 wurden in diesen Zellen nicht exprimiert. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit nach Genexpressionsanalyse in 20% (3/15) der isolierten EpCAM+ Zellen ein vergleichbares Expressions-Profil festgestellt werden, so dass offenbar eine Subpopulation disseminierter Tumorzellen Merkmale von Stammzellen besitzt. Unterstützt wird dieses Erkenntnis durch die Expression von Sca-1 in diesen Zellen. Die Expression von Sca-1 wurde in einer angereicherten Fraktion epithelialer Vorläuferzellen in der Mamma nachgewiesen (Welm, Tepera et al. 2002). Zudem wurden EpCAM und CD44 in weiteren Studien als Marker für Vorläuferzellen beschrieben (Liu, True et al. 1997; Gudjonsson, Villadsen et al. 2002). Vorläuferzellen haben ähnlich wie Stammzellen ein proliferatives Potential.

Die früh-disseminierten Tumorzellen im Balb-neuT-Modell exprimieren folglich Marker, die auf Merkmale von Stamm- und Vorläuferzellen hinweisen. Zudem konnte das proliferative Potential in den disseminierten Zellen durch die Knochenmark-Transplantation bereits nachgewiesen werden. Daher ist es denkbar, dass Zellen mit Merkmalen von Krebsstammzellen, aus denen durch Injektion ins Mammagewebe Karzinome entstehen (Al-Hajj, Wicha et al. 2003), möglicherweise auch in sekundären Organen eine Metastasierung bewirken können. Die Expression der epithelialen Marker CK und Her2 wurde in den EpCAM+ Zellen nicht untersucht, wodurch sich nicht bestimmen lässt, in welcher der durch Immunfärbungen detektierten Subpopulationen dieses Expressions-Profil auftritt. Es besteht nun die Möglichkeit, dass Zellen mit Merkmalen von Krebsstammzellen sich von der primären Läsion ablösen und sich im Knochenmark und später in der Lunge ansiedeln. Durch anschließende Differenzierung und Anhäufung weiterer Mutationen werden Differenzierungsmarker wie CK und Her2 exprimiert, welche in Mikrometastasen nachweisbar sind.

5 Zusammenfassung

Bei Brustkrebspatientinnen entwickeln sich häufig trotz Resektion des Primärtumors Fernmetastasen, an denen die Patientinnen schließlich versterben. Dies macht deutlich, dass nach der Operation disseminierte Tumorzellen im Körper vorliegen, deren Auswachsen zu manifesten Metastasen führt. Das Thema der vorliegenden Dissertation war, anhand eines Mausmodells nähere Einblicke in die Dynamik der systemischen Erkrankung beim Mammakarzinom zu erlangen. Das Balb-neuT-Modell ist hierfür geeignet, da sich in den Mäusen multiple Mammakarzinome ähnlich der humanen Erkrankung über verschiedene Tumorstadien entwickeln. Die transgenen Mäuse tragen eine konstitutiv aktivierte Form des epithelialen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (Her2). Eine Amplifikation des Onkogens Her2 im Primärtumor korreliert in Brustkrebspatientinnen mit einem erhöhten Risiko zur Metastasierung. Entsprechend manifestieren sich in dem Mausmodell regelmäßig Fernmetastasen, so dass der Disseminierungs- und Metastasierungsstatus zu allen Zeitpunkten der Tumorprogression bestimmt werden konnte.

Durch Immunfärbungen wurden erstmals disseminierte Tumorzellen in einem transgenen Mausmodell nachgewiesen. Diese ektopen Tumorzellen konnten zum einen im Knochenmark durch die verschiedenen epithelialen Marker, Her2, die Zytokeratine 8/18 oder das epitheliale Zelladhäsionsmolekül, in 98% aller transgenen Mäuse nachgewiesen werden. Mit der komparativen genomischen Hybridisierung wurden in 95% aller untersuchten Epithelmarker-positiven Zellen genomische Aberrationen festgestellt, so dass ihr maligner Ursprung belegt werden konnte. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass erste Hinweise aus klinischen Studien auf eine frühe systemische Streuung von Tumorzellen auch in dem Mausmodell gefunden werden konnten. So wurden bereits disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bei allen transgenen Mäusen nachgewiesen, in denen lediglich nicht-invasive Vorstufen eines Karzinoms, wie atypische duktale Hyperplasien und duktale *in situ* Karzinome, im Mammagewebe vorlagen. Auch nach orthotoper Transplantation von transgenem jedoch nicht-transformiertem Mammagewebe wurde in den Wildtyp-Rezipienten regelmäßig eine frühe Disseminierung von Tumorzellen im Knochenmark festgestellt. Dies schließt eine illegitime Expression des Transgens in extramammarieschen Geweben aus. In der Lunge wurden solide Metastasen bereits zu Beginn der histologisch sichtbaren Invasion der primären Tumoren gefunden. Außerdem konnten im Lungengewebe von transgenen Mäusen mit atypischer duktaler Hyperplasie einzelne Tumorzellen und epitheliale Zellaggregate nachgewiesen werden, die Her2 exprimierten. Die frühe Streuung und Kolonisierung von Tumorzellen in Lunge und

Knochenmark legt nahe, dass die weitere Progression der Zellen nicht innerhalb des Primärtumors sondern im Zielorgan stattfindet. Durch Etablierung verschiedener Transplantationsmodelle wurde gezeigt, dass die (früh-)disseminierten Tumorzellen ein malignes Potential besitzen. Die Injektion von transgenem Knochenmark führte zu einer Karzinose in den bestrahlten Wildtyp-Rezipienten. Nach Transplantation von Brustdrüsen und trotz erfolgreicher Resektion des Implantats in nicht-invasivem Stadium gab es Hinweise auf eine Mikrometastasierung in der Lunge. Doppelfärbungen gegen die verschiedenen epithelialen Marker ergaben, dass Subpopulationen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark vorhanden sind, die sich in der Expression der untersuchten Marker unterscheiden. Die Expressionsanalyse ausgewählter Gene bei einzelnen disseminierten Tumorzellen zeigte, dass eine Population von EpCAM+/CD44+/CD24- Zellen im Knochenmark zu finden ist, welche somit Merkmale von Krebsstammzellen aufweisen. Ob diese Subpopulation möglicherweise auch für das Auswachsen zu manifesten Metastasen verantwortlich ist, muss in Zukunft untersucht werden. Somit kann ein Modell vorgestellt werden, in dem die epithelialen Mammazellen die maligne Progression im Organismus von Beginn der Transformation an durchlaufen, und welches dadurch die Situation von Brustkrebspatientinnen in verschiedenen Erkrankungsstadien widerspiegelt. Zudem ermöglicht es die Untersuchung der klinisch hochrelevanten minimalen residualen Erkrankung nach kurativer Resektion des Primärtumors.

6 Literaturverzeichnis

- Abbruzzese, J. L., M. C. Abbruzzese, et al. (1994). "Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients." J Clin Oncol **12**(6): 1272-80.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-8.
- Aslakson, C. J. and F. R. Miller (1992). "Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor." Cancer Res **52**(6): 1399-405.
- Badache, A. and A. Goncalves (2006). "The ErbB2 signaling network as a target for breast cancer therapy." J Mammary Gland Biol Neoplasia **11**(1): 13-25.
- Bargmann, C. I. and R. A. Weinberg (1988). "Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5394-8.
- Beckmann, M. W., D. Niederacher, et al. (1997). "Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity." J Mol Med **75**(6): 429-39.
- Bernards, R. and R. A. Weinberg (2002). "A progression puzzle." Nature **418**(6900): 823.
- Boggio, K., G. Nicoletti, et al. (1998). "Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice." J Exp Med **188**(3): 589-96.
- Braun, S., F. Hepp, et al. (1999). "Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease." Int J Cancer **84**(1): 1-5.
- Braun, S., G. Schlimok, et al. (2001). "ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients." Cancer Res **61**(5): 1890-5.
- Braun, S., F. D. Vogl, et al. (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." N Engl J Med **353**(8): 793-802.
- Cardiff, R. D., D. Moghanaki, et al. (2000). "Genetically engineered mouse models of mammary intraepithelial neoplasia." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**(4): 421-37.
- Choesmel, V., J. Y. Pierga, et al. (2004). "Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance." Breast Cancer Res **6**(5): R556-70.
- Citri, A., K. B. Skaria, et al. (2003). "The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3." Exp Cell Res **284**(1): 54-65.
- Dankort, D., B. Maslikowski, et al. (2001). "Grb2 and Shc adapter proteins play distinct roles in Neu (ErbB-2)-induced mammary tumorigenesis: implications for human breast cancer." Mol Cell Biol **21**(5): 1540-51.
- Deome, K. B., L. J. Faulkin, Jr., et al. (1959). "Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice." Cancer Res **19**(5): 515-20.
- Diel, I. J., M. Kaufmann, et al. (1996). "Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status." J Natl Cancer Inst **88**(22): 1652-8.
- Fargiano, A. A., K. V. Desai, et al. (2003). "Interrogating mouse mammary cancer models: insights from gene expression profiling." J Mammary Gland Biol Neoplasia **8**(3): 321-34.

- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Funke, I., S. Fries, et al. (1996). "Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer." Int J Cancer **65**(6): 755-61.
- Grann, V. R., A. B. Troxel, et al. (2005). "Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma." Cancer **103**(11): 2241-51.
- Graus-Porta, D., R. R. Beerli, et al. (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." Embo J **16**(7): 1647-55.
- Gudjonsson, T., R. Villadsen, et al. (2002). "Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties." Genes Dev **16**(6): 693-706.
- Guy, C. T., R. D. Cardiff, et al. (1992). "Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease." Mol Cell Biol **12**(3): 954-61.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harari, D. and Y. Yarden (2000). "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." Oncogene **19**(53): 6102-14.
- Hartmann, C. H. (2006). Grundlagen für zielgerichtete adjuvante Therapien solider Tumoren: Eine Methode zur Analyse der globalen Genexpression einzelner metastatischer Vorläuferzellen. Fakultät für Chemie und Pharmazie. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Husemann, Y., J. B. Geigl, et al. (2008). "Systemic spread is an early step in breast cancer." Cancer Cell **13**(1): 58-68.
- Janni, W., B. Rack, et al. (2005). "The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence." Cancer **103**(5): 884-91.
- Jonkers, J., R. Meuwissen, et al. (2001). "Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer." Nat Genet **29**(4): 418-25.
- Kallergi, G., D. Mavroudis, et al. (2007). "Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells." Mol Med **13**(1-2): 79-88.
- Kang, Y., P. M. Siegel, et al. (2003). "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone." Cancer Cell **3**(6): 537-49.
- Kasimir-Bauer, S., F. Otterbach, et al. (2003). "Rare expression of target antigens for immunotherapy on disseminated tumor cells in breast cancer patients without overt metastases." Int J Mol Med **12**(6): 969-75.
- Klapper, L. N., S. Glathe, et al. (1999). "The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4995-5000.
- Klein, C. A. (2004). "Gene expression signatures, cancer cell evolution and metastatic progression." Cell Cycle **3**(1): 29-31.
- Klein, C. A., T. J. Blankenstein, et al. (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer." Lancet **360**(9334): 683-9.
- Kubuschok, B., B. Passlick, et al. (1999). "Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **17**(1): 19-24.
- Kuperwasser, C., S. Dessain, et al. (2005). "A mouse model of human breast cancer

- metastasis to human bone." Cancer Res **65**(14): 6130-8.
- Lacroix, M. (2006). "Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells." Endocr Relat Cancer **13**(4): 1033-67.
- Lakhani, S. R. (1999). "The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast." J Pathol **187**(3): 272-8.
- Levkowitz, G., L. N. Klapper, et al. (1996). "Coupling of the c-Cbl protooncogene product to ErbB-1/EGF-receptor but not to other ErbB proteins." Oncogene **12**(5): 1117-25.
- Liu, A. Y., L. D. True, et al. (1997). "Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10705-10.
- Lucchini, F., M. G. Sacco, et al. (1992). "Early and multifocal tumors in breast, salivary, harderian and epididymal tissues developed in MMTY-Neu transgenic mice." Cancer Lett **64**(3): 203-9.
- McCormack, S. J., Z. Weaver, et al. (1998). "Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability." Oncogene **16**(21): 2755-66.
- Minn, A. J., G. P. Gupta, et al. (2005). "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung." Nature **436**(7050): 518-24.
- Muller, W. J., E. Sinn, et al. (1988). "Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene." Cell **54**(1): 105-15.
- Ottewill, P. D., R. E. Coleman, et al. (2006). "From genetic abnormality to metastases: murine models of breast cancer and their use in the development of anticancer therapies." Breast Cancer Res Treat **96**(2): 101-13.
- Pantel, K., G. Schlimok, et al. (1993). "Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells." J Natl Cancer Inst **85**(17): 1419-24.
- Parmar, H. and G. R. Cunha (2004). "Epithelial-stromal interactions in the mouse and human mammary gland in vivo." Endocr Relat Cancer **11**(3): 437-58.
- Ross, J. S. and J. A. Fletcher (1998). "The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy." Stem Cells **16**(6): 413-28.
- Ryan, J. A. and C. J. Coady (1962). "Intraductal epithelial proliferation in the human breast-a comparative study." Can J Surg **5**: 12-9.
- Schardt, J. A., M. Meyer, et al. (2005). "Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer." Cancer Cell **8**(3): 227-39.
- Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, et al. (2003). "From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7737-42.
- Schnitt, S. J., J. L. Connolly, et al. (1992). "Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria." Am J Surg Pathol **16**(12): 1133-43.
- Schoeffner, D. J., S. L. Matheny, et al. (2005). "VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms." Lab Invest **85**(5): 608-23.
- Silverstein, M. J., M. D. Lagios, et al. (1998). "Outcome after invasive local recurrence in patients with ductal carcinoma in situ of the breast." J Clin Oncol **16**(4): 1367-73.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science **235**(4785): 177-82.

- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." Science **244**(4905): 707-12.
- Smalley, M. and A. Ashworth (2003). "Stem cells and breast cancer: A field in transit." Nat Rev Cancer **3**(11): 832-44.
- Solin, L. J., A. Fourquet, et al. (2001). "Salvage treatment for local recurrence after breast-conserving surgery and radiation as initial treatment for mammographically detected ductal carcinoma in situ of the breast." Cancer **91**(6): 1090-7.
- Solomayer, E. F., S. Becker, et al. (2006). "Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients." Breast Cancer Res Treat **98**(2): 179-84.
- Stoecklein, N. H., A. Erbersdobler, et al. (2002). "SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples." Am J Pathol **161**(1): 43-51.
- Tavassoli, F. A. and H. J. Norris (1990). "A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast." Cancer **65**(3): 518-29.
- Thurm, H., S. Ebel, et al. (2003). "Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy." Clin Cancer Res **9**(7): 2598-604.
- Tzahar, E., H. Waterman, et al. (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." Mol Cell Biol **16**(10): 5276-87.
- Tzahar, E. and Y. Yarden (1998). "The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands." Biochim Biophys Acta **1377**(1): M25-37.
- van de Wouw, A. J., M. L. Janssen-Heijnen, et al. (2002). "Epidemiology of unknown primary tumours; incidence and population-based survival of 1285 patients in Southeast Netherlands, 1984-1992." Eur J Cancer **38**(3): 409-13.
- Waterman, H., I. Sabanai, et al. (1998). "Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency." J Biol Chem **273**(22): 13819-27.
- Welm, B. E., S. B. Tepera, et al. (2002). "Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population." Dev Biol **245**(1): 42-56.
- Wiseman, B. S. and Z. Werb (2002). "Stromal effects on mammary gland development and breast cancer." Science **296**(5570): 1046-9.
- Yang, J., S. A. Mani, et al. (2004). "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis." Cell **117**(7): 927-39.
- Yarden, Y. (2001). "Biology of HER2 and its importance in breast cancer." Oncology **61 Suppl 2**: 1-13.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.

7 Danksagung

Zu allererst möchte ich Prof. Dr. Christoph Klein für die ausgezeichnete und kompetente Betreuung der Arbeit, für das umfassende Know-how bei allen fachlichen und praktischen Fragen danken. Ich möchte Prof. Dr. Christoph Klein für die Überlassung des Themas und für seinen Einsatz zur Finanzierung des Projektes und meiner Stelle danken. Weiterhin danke ich ihm, dass er es stets verstanden hat mich zu motivieren, und mir für die selbständige Gestaltung meiner Dissertation Freiräume gelassen hat. Insbesondere möchte ich ihm für die persönliche und freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß möchte ich danken für die Bereitschaft sich als Doktormutter dieser Dissertation zur Verfügung zu stellen, für die Vertretung meiner Promotion an der Biologischen Fakultät der LMU München und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Dr. Jochen Geigl danke ich für die Vermittlung essentieller Kenntnisse für das Arbeiten mit Mäusen und für die Anwendung der CGH. Andrea Bol danke ich besonders für die hervorragende Leitung des Tierstalls und stete Unterstützung bei Tierexperimenten. Elke Burghart möchte ich für die generelle Einarbeitung in die verschiedensten Experimente danken. Ein ganz besonderer Dank gilt Manfred Meyer, ohne den der Laboralltag wahrscheinlich gar nicht möglich gewesen wäre, und der mir eine große Hilfe bei den Transplantationen gewesen ist.

Dr. Bernhard Polzer möchte ich ganz herzlich danken, denn er war stets bereit, meine Arbeit zu lesen, zu korrigieren, wieder zu lesen und zu korrigieren. Auch Isabelle May und wieder einmal Manfred Meyer danke ich für die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit.

Ich möchte allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klein am Institut für Immunologie und der Abteilung für Onkogenomik am Universitätsklinikum Regensburg danken. Es war eine super Zeit, es hat wahnsinnig viel Spaß gemacht, und alle waren mir eine große Hilfe während meiner Dissertation.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Eltern. Sie haben mich in den letzten Jahren nicht nur finanziell unterstützt, sondern haben es in schwierigen Phasen immer verstanden mich zu motivieren, um meine Ziele zu erreichen. Meiner ganzen Familie danke ich für den engen und guten Kontakt, so dass ich immer ein offenes Ohr für meine Probleme finden konnte.

8 Lebenslauf

Name:	Yves Hüsemann
Geburtsdatum:	21.02.1978
Geburtsort:	Göttingen
Familienstand:	ledig
1984 – 1988	Besuch der Grundschule Isernhagen
1988 – 1990	Besuch der Orientierungsstufe Isernhagen
1990 – 1997	Besuch des Gymnasiums Isernhagen
06.1997	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife „gut“ (2,0)
08.1994 – 02.1995	Auslandsaufenthalt (Spanien) und Besuch der Deutschen Schule in der Provinz Malaga
1997 – 2002	Studium an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina in Braunschweig; Fachrichtung Diplom-Biologie
10.1999	Diplom-Vorprüfung „gut“
11.2002	Diplom-Hauptprüfung „sehr gut“ (1,28) Diplomarbeit in der Abteilung für Epigenetische Regulationsmechanismen unter der Leitung von Prof. Dr. J. Bode an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig mit dem Thema „Halo-FISH: Ausbau einer neuen Methode zum <i>in situ</i> Nachweis von Chromatin-Domänen“; Bewertung: „sehr gut“ (1,0)
Seit 02.2003	Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. T. Bocker und der Betreuung von Dr. C. Klein. Seit Oktober 2006 wurden die praktischen Arbeiten am Institut für Pathologie, Abteilung für Onkogenomik der Universität Regensburg im Labor von Prof. Dr. C. Klein durchgeführt.

9 Publikationen

Götze S, Hüsemann Y, Baer A, Bode J. (2003). Functional characterization of transgene integration patterns by halo fluorescence in situ hybridization: electroporation versus retroviral infection. *Biochemistry* **42**: 7035-43.

Bode J, Götze S, Ernst E, Hüsemann Y, Baer A, Seibler J, Mielke C. (2003). Architecture and utilization of highly expressed genomic sites. *In: New Comprehensive Biochemistry 38; Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Chapter 20: 551-572.*

Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**: 58-68.

Posterpräsentationen

Yves Hüsemann, Jochen B. Geigl, Falk Schubert, Manfred Meyer, Elke Burghart, Guido Forni, Roland Eils, Piero Musiani, Gert Riethmüller and Christoph A. Klein. (2006). Mammary tumor cells disseminate during atypical hyperplasia in Her2-transgenic mice. *GRC: Mammary Gland Biology. Barga, Italien.*

Vorträge

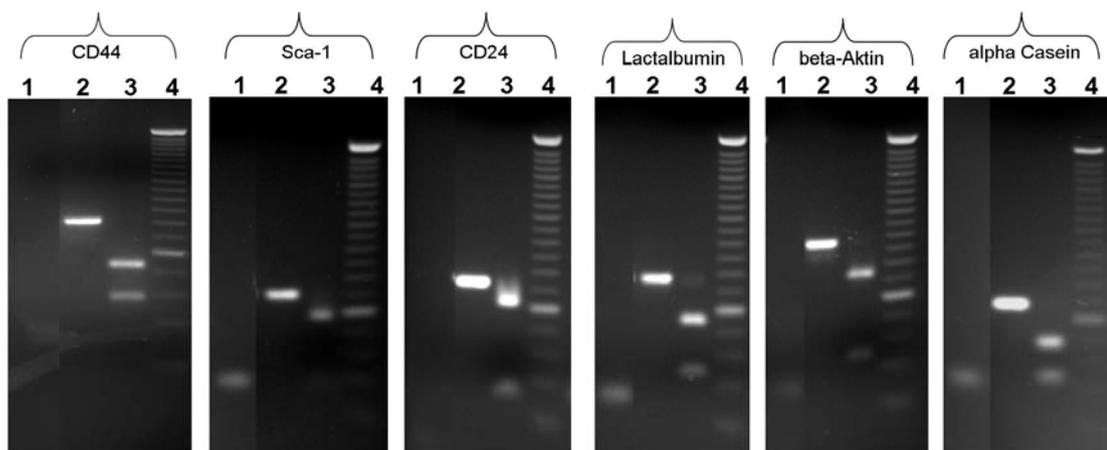
Yves Hüsemann. (2006). Mammary tumor cells disseminate during atypical hyperplasia in Her2-transgenic mice. *97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Washington, DC.*

10 Anhang

Tabelle und Gelelektrophorese zur Kontrolle der verwendeten Primer für genspezifischer PCR von cDNA-Proben

Die Numerierung 1-4 der Spuren in der Gelelektrophorese stehen für: 1= Wasserkontrolle, 2= unverdautes PCR-Produkt, 3= PCR-Produkt nach Restriktionsverdau und 4= 25 bp-Leiter.

Gen	Sequenzlänge	Restriktionsenzym	Schnittstelle
β -Aktin	214 bp	<i>Aci</i> I	160
Sca-1	150 bp	<i>Sau</i> 96 I	35
CD24	169 bp	<i>Sfa</i> N I	127
CD44	177 bp	<i>Hae</i> III	71
alpha Casein	143 bp	<i>Bsm</i> A I	53
Lactalbumin	167 bp	<i>Mbo</i> I	57



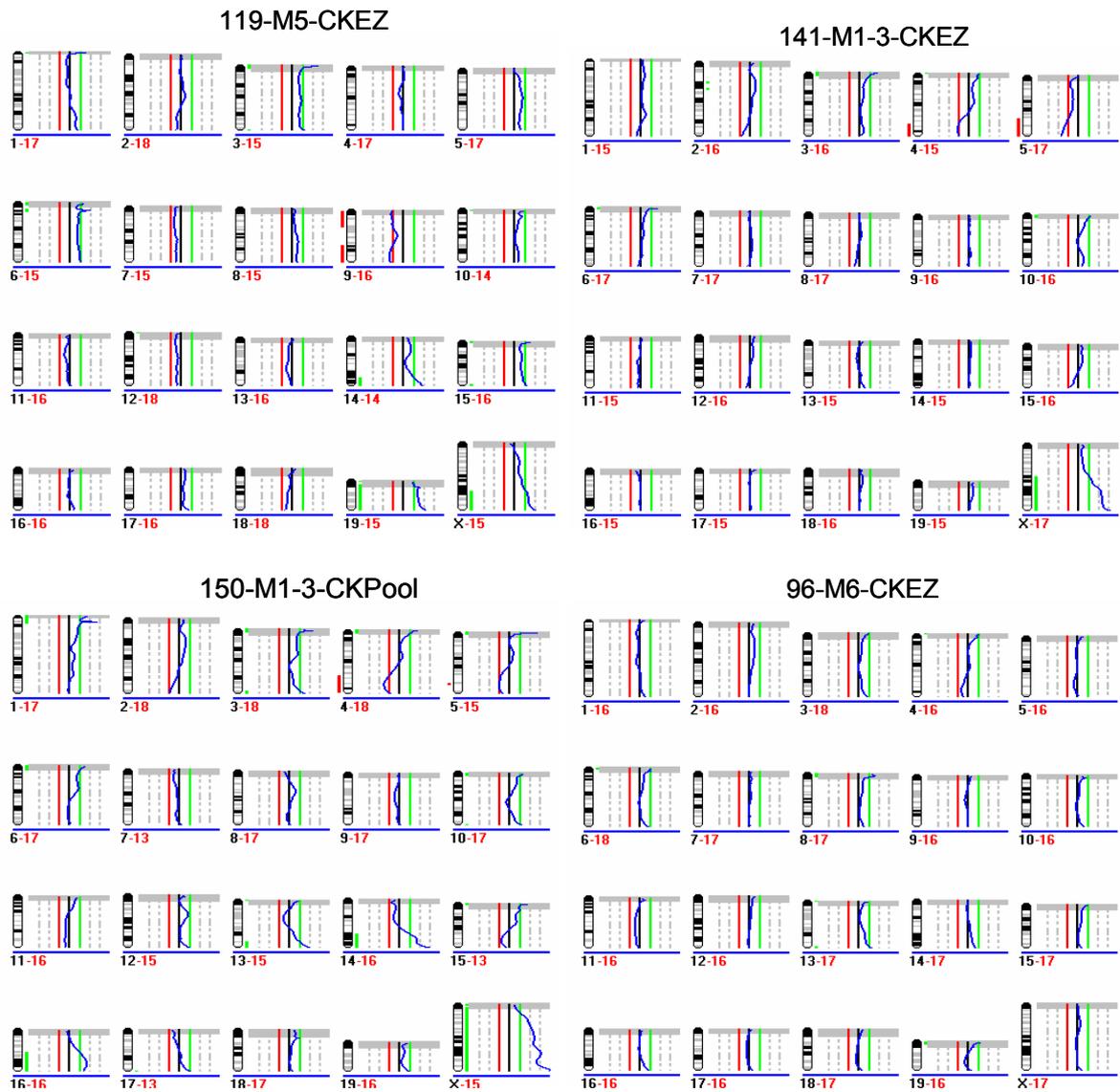
Alle Transplantationsexperimente und Untersuchungsergebnisse

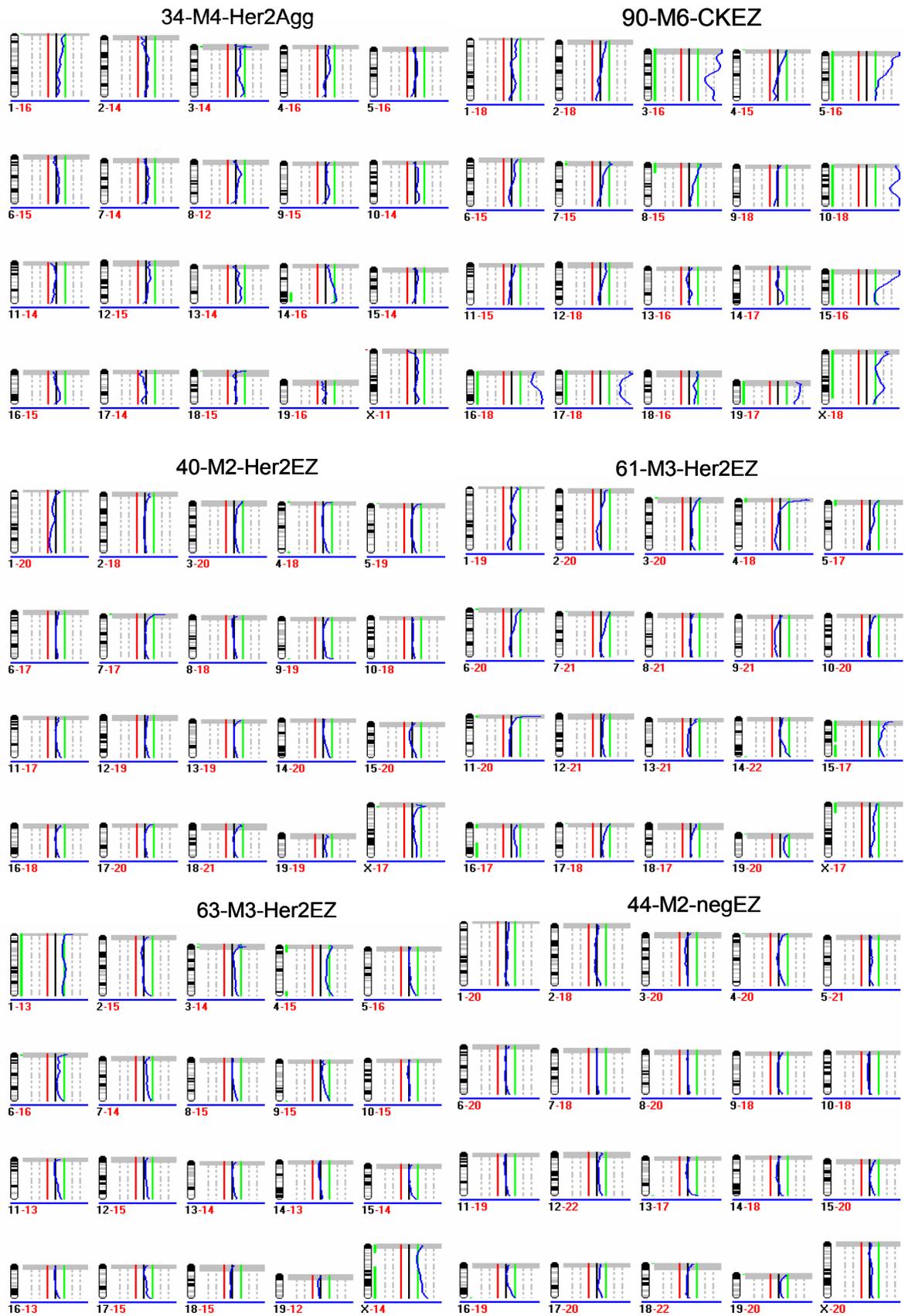
Maus-ID	Spenderalter [Wochen]	Verweildauer [Wochen]	Dissektion (Diss) / Resektion (Res)	Zeit bis Dissektion nach OP [Wochen]	Gesamte Versuchsdauer [Wochen]	Implantat	Diagnose	n= Her2+/5000000	ICC-Färbung n= CK+/5000000
BT 15	3	26	Res	11	40	IC	Mikromet.	0	3
m1389	3	13	Res	13	39	IC	NZ	0	4
BT 13	3	23	Res	13	39	IC	Mikromet.	n.d.	5
m1395	3	25	Res	13	41	IC	Mikromet.	0	1
BT 22	3	25	Res	13	41	ADH	NZ	30	6
BT 23	3	25	Res	13	41	ADH	Normal	6	5
BT 20	3	25	Res	13	41	IC	Normal	2	0
m1354	3	16	Diss	13	19	ADH	Normal	n.d.	n.d.
m1355	3	16	Diss		19	ADH	Normal	n.d.	n.d.
m1392	3	25	Diss		28	IC	Normal	4	5
BT 18	3	25	Diss		28	IC	Normal	3	2
BT 19	3	25	Diss		28	IC	Normal	1	3
BT 21	3	25	Diss		28	IC	Normal	1	2
BT 14	3	26	Diss		29	ADH	Normal	4	1
BT 17	4	26	Res	11	41	IC	Normal	0	6
BT 8	4	26	Res	13	43	IC	Metastasen	0	2
BT 5	4	25	Diss		29	IC	NZ	2	3
BT 6	4	25	Diss		29	IC	Normal	3	1
BT 7	4	25	Diss		29	IC	Normal	3	1
BT 16	4	26	Diss		30	IC	Normal	2	1
BT 10	5	12	Diss		17	ADH	Normal	2	2
BT 11	5	12	Diss		17	ADH	Normal	2	2
BT 32	11	8	Res	23	42	HD	Normal	5	10
BT 33	11	8	Res	23	42	HD	Normal	5	3
BT 34	11	8	Res	23	42	HD	Normal	9	2
BT 31	11	8	Res	23	42	HD	Normal	1	0
BT 26	11	8	Res	24	43	ADH	Karzinom	2	1
BT 30	11	8	Res	24	43	ADH	Normal	4	7
BT 27	11	8	Res	24	43	IC	Normal	0	0
BT 29	11	8	Res	24	43	ADH	Normal	0	0
BT 25	11	8	Res	24	43	ADH	Normal	1	0
T2	12	7	Diss	24	19	ADH	Normal	0	3
T1	12	14	Diss		26	ADH	Normal	0	4
T3	12	14	Diss		26	ADH	Normal	0	4
T5	12	14	Diss		26	ADH	Normal	3	1
BT 12	12	15	Diss		27	IC	Normal	5	7
T8	23	6	Diss		29	IC	Normal	n.d.	5
T6	23	13	Diss		36	IC	Normal	0	7
K-1	12	24	Diss		36	Normal	Normal	0	0
K-3	12	24	Diss		36	Normal	Normal	0	0

K-1 und K-3= Kontrollmäuse; T6 und T8= Pilotexperiment; IC=invasives Karzinom; ADH=atypische duktale Hyperplasie; HD= hypotrophische Drüsen; NZ= neoplastische Zellen

CGH-Profile aller untersuchten Einzelzellen

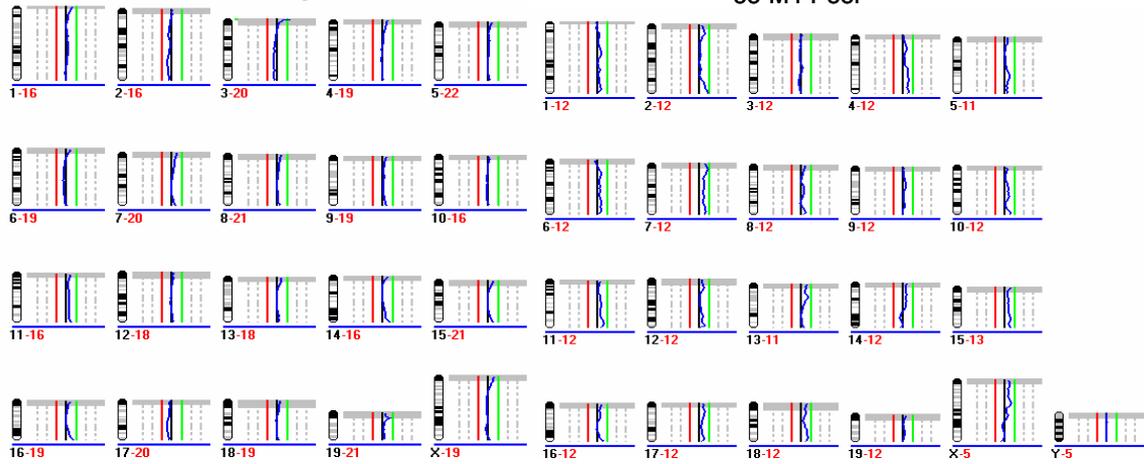
Die ermittelten CGH-Profile aller untersuchten Einzelzellen sind im Folgenden aufgeführt. Anhand der Bezeichnung ist die Maus, Zellnummer und Färbung zu entnehmen.





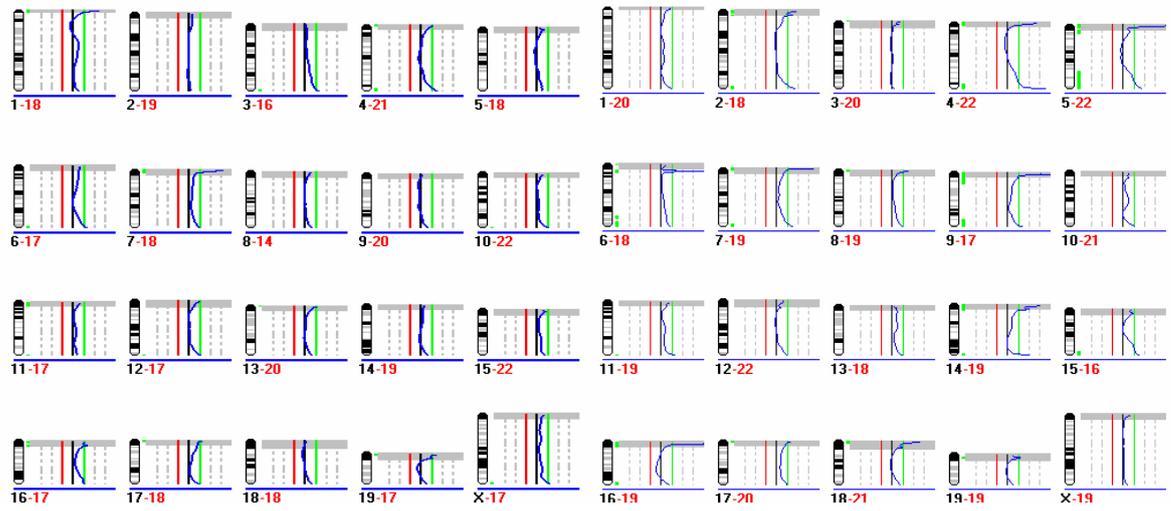
56-M1-negEZ

33-M4-Pool



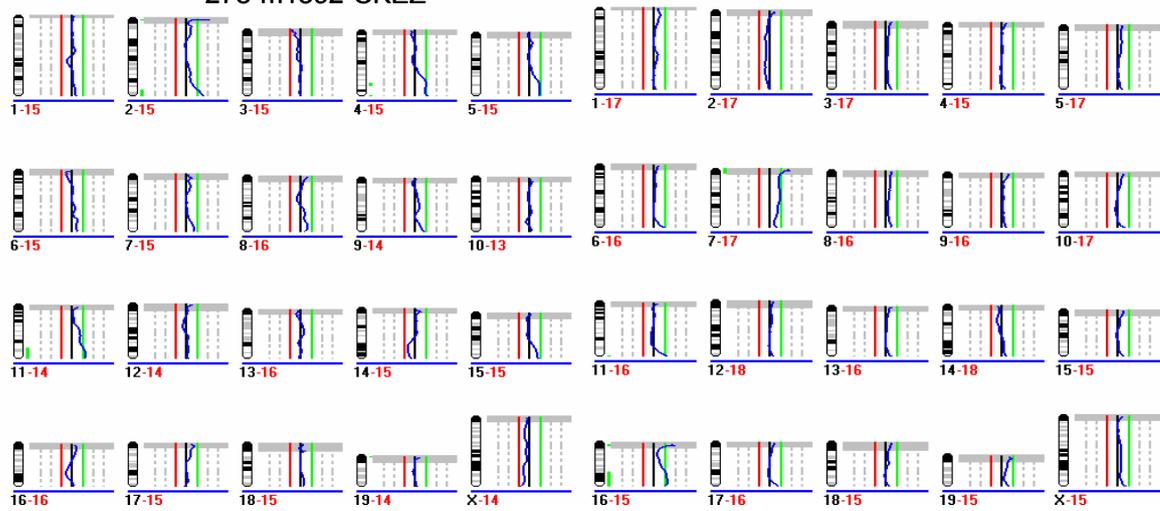
67-M3-negEZ

229-T5-CKEZ

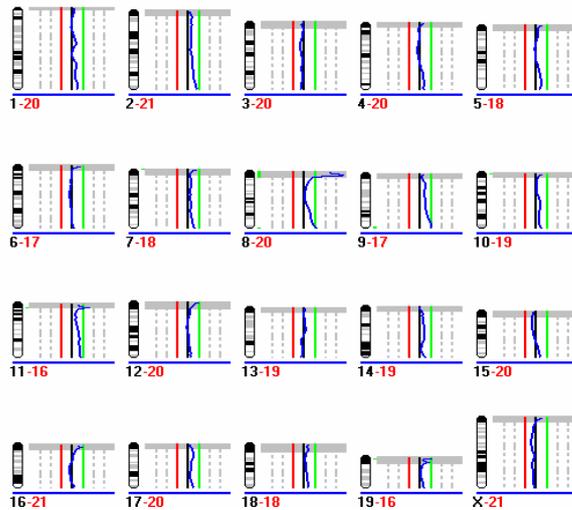


278-m1392-CKEZ

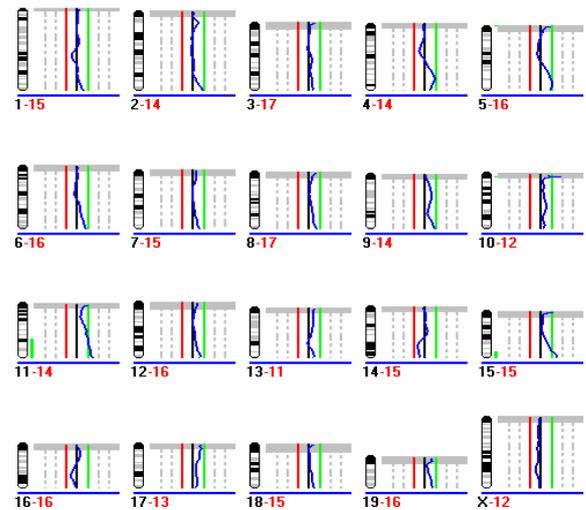
284-BT18-CKEZ



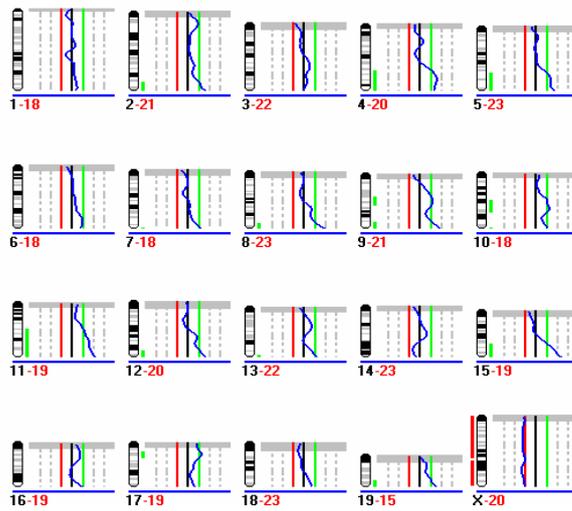
293-BT7-Her2EZ



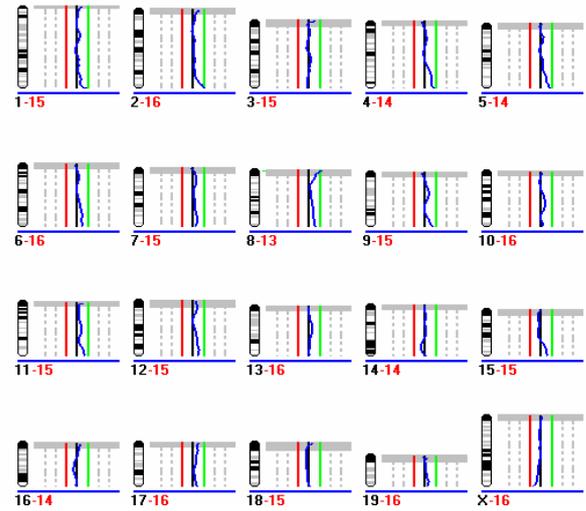
301-BT5-Her2EZ



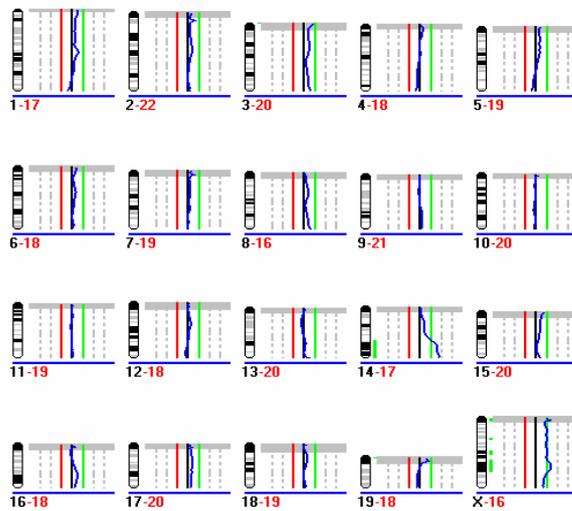
302-BT5-Her2EZ



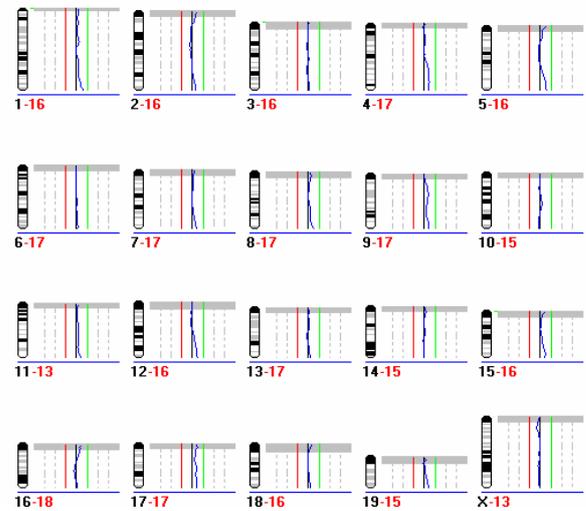
303-BT5-negEZ



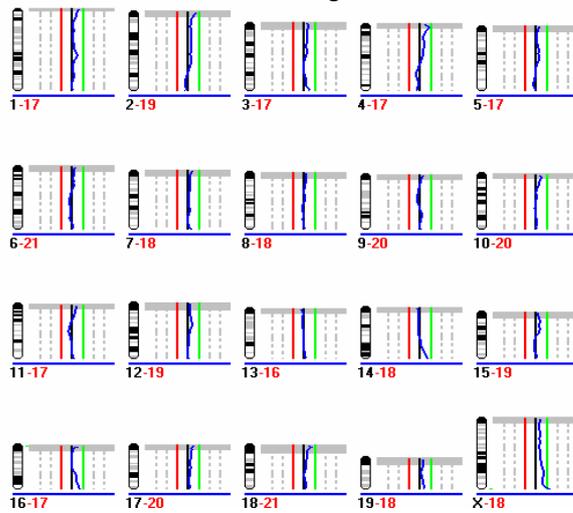
305-BT19-Her2EZ



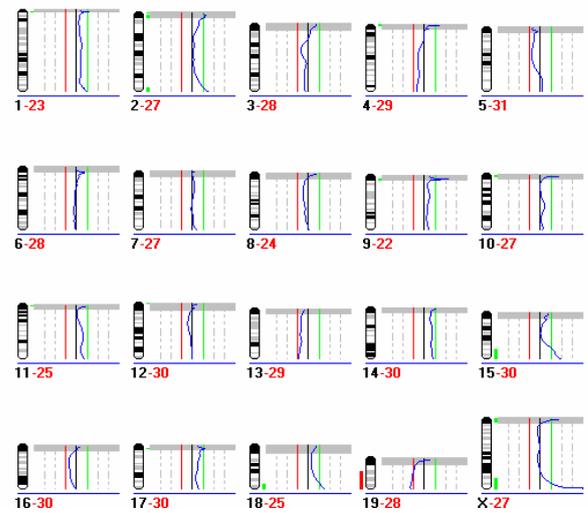
231-T5-negPool



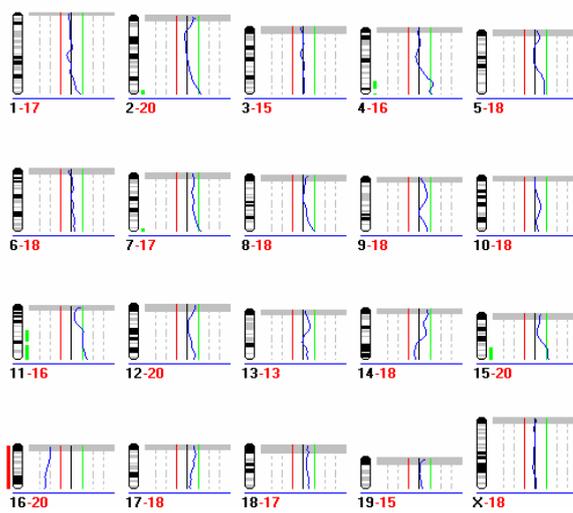
242-T8-negEZ



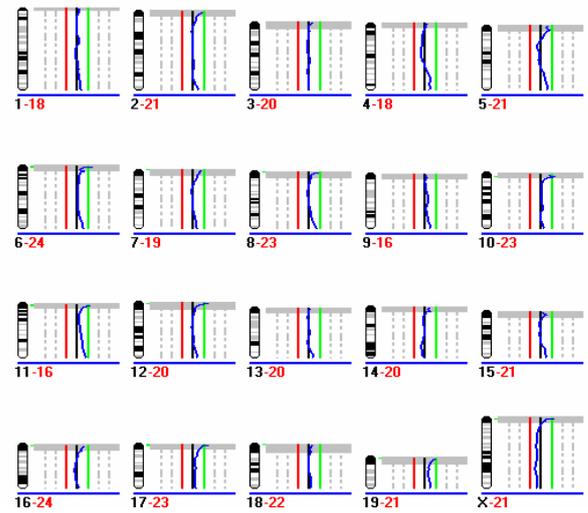
257-T3-Her2EZ



258-T3-Her2EZ



273-BT14-negEZ



276-m1392-negEZ

