

Genotypisierung einzelner, Zytokeratin-positiver Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen



Julian Andreas Schardt

München 2008

Aus dem
Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Genotypisierung einzelner, Zytokeratin-positiver Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julian Andreas Schardt

aus

München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christoph Klein
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Friese
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Karsten Spiekermann Prof. Dr. Ernst Schmid
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	7
1.1	Epidemiologie, Risiko- und Prognosefaktoren des Mammakarzinoms.....	7
1.2	Die Minimale Resterkrankung Erkrankung (MRE) bei Brustkrebs.....	10
1.2.1	Nachweisverfahren und prognostische Relevanz Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark	10
1.2.3	Die Minimale Resterkrankung als Surrogat-Marker	13
1.2.4	Phänotypische Charakterisierung Zytokeratin-positiver Zellen	14
1.2.5	Genomische Charakterisierung Zytokeratin-positiver Zellen durch Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus PCR (SSCP) und comparativer genomischer Hybridisierung (CGH).....	14
1.3	Der Verlust der Heterozygotie.....	16
1.3.1	Wie ist der Verlust der Heterozygotie definiert?	17
1.3.2	Entstehungsmechanismen des Verlusts der Heterozygotie	19
1.4	Genotypisierung von Primärtumoren des Mammakarzinoms.....	21
1.5	LOH-Studien an Primärtumoren und korrespondierenden Brustkrebsmetastasen.....	22
1.6	Zell-Zell Kontakte: Gürteldesmosomen (Zonula adhaerens).....	24
1.7	Die Rolle des Cadherin-Catenin Zell-Zell Kontakt Systems in der Signaltransduktion und Karzinogenese	25
1.8	Zielsetzung der Arbeit	28
2.	MATERIAL.....	29
2.1	Geräte.....	29
2.2	Chemikalien.....	29
2.3	Lösungen und Puffer	30
2.4	Enzyme und Antikörper.....	31

2.5	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.	METHODEN	32
3.1	Knochenmarksaufbereitung	32
3.2	Immunzytochemie.....	32
3.2.1	A45-APAAP-Färbung	32
3.2.2	MOPC 21-Färbung	33
3.3	Isolierung der A 45-AK positiven Zellen	33
3.4	Einzelzell-PCR	34
3.5	Kontroll-PCR	35
3.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	36
3.7	Reamplifikation.....	37
3.8	Generierung der Positivkontrollen (DNS-Extraktion).....	38
3.9	Auswahlkriterien für die verwendeten Marker.....	39
3.10	Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)	44
3.11	Mikrosatelliten spezifische PCR.....	46
3.12	Enzym-Verdau der Restriction-Fragment-Längenpolymorphismen	46
3.13	Klinikopathologische Charakteristika der Patienten.....	49
3.14	Kooperationspartner	52
3.15	Statistik	52
4.	ERGEBNISSE	53
4.1	Erweiterung des Kontrollzellkollektivs	53
4.2	Etablierung der spezifischen Mikrosatelliten-PCR.....	56
4.3	Ergebnisse der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)-Experimente an Einzelzellen	61

4.3.1	Ergebnisse der PAGE-Analysen des Kontrollzell-Kollektivs und Validierung der Methode	63
4.3.2	Vergleich der Markerinformativitäten für die untersuchten Gruppen	69
4.3.3	Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen mit dem Kontrollzellkollektiv	71
4.3.4	Analyse der Einzelzellen von Patienten im klinischen Stadium M0 und M1	78
4.3.5	Analyse der Einzelzellen entsprechend ihres CGH-Profiles	84
5.	DISKUSSION	92
5.1	Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen mit dem Kontrollzellkollektiv	94
5.2	Mögliche, relevante Gene der frühen Disseminierung und Kanzerogenese bei Brustkrebs.....	100
6.	ZUSAMMENFASSUNG	106
7.	LITERATURVERZEICHNIS	108
8.	DANKSAGUNG.....	115
9.	LEBENS LAUF	116
10.	PUBLIKATIONEN.....	118
11.	APPENDIX	119

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie, Risiko- und Prognosefaktoren des Mammakarzinoms

Brustkrebs stellt die häufigste Krebserkrankung für Frauen in Deutschland und weltweit dar. Die Dachdokumentation Krebs des Robert-Koch Institutes geht von jährlich 47.500 Neuerkrankungen bei Frauen in Deutschland aus. Insbesondere für Frauen zwischen 45 und 54 Jahren ist Brustkrebs mit über 40% die häufigste Tumorerkrankung. Die epidemiologischen Zahlen zeigen einen deutlichen Anstieg des Erkrankungsrisikos mit zunehmendem Alter (das mittlere Erkrankungsalter liegt derzeit bei etwas über 62 Jahren). Die Erkrankungsraten liegen im europäischen Vergleich im mittleren Bereich. Die baltischen Länder und südeuropäische Länder wie Spanien, Griechenland und Portugal weisen niedrigere, Länder wie Frankreich, Dänemark oder Belgien höhere Erkrankungsraten auf. Das Lebenszeitrisko für Frauen in Deutschland an Brustkrebs zu erkranken beträgt 9,1%. Das bedeutet, dass jede 11. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Im Jahre 2000 verstarben in Deutschland gemäss dem Bundesamt für Statistik 17.814 Personen an den Folgen der Brustkrebserkrankung (Giersiepen, Heitmann et al. 2005). Auf Grund epidemiologischer Untersuchungen konnten in der Vergangenheit mehrere Faktoren bestimmt werden, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einhergehen (Tabelle 1). Dazu zählen Brustkrebserkrankungen bei erstgradigen Verwandten (4-fach erhöhtes Risiko), Nullipara und Frauen, die ihr erstes Kind nach dem Alter von 35 Jahren bekommen (1,5-fach). Eine genetische Prädisposition wird für ca. 15% der Brustkrebs-Erkrankungen angenommen. Das Gen BRCA1 auf Chromosom 17, ist in Familien mutiert, in denen gehäuft und früh im Leben Brustkrebs auftritt. Etwa 85% der Frauen, die eine Mutation dieses Gens in sich tragen werden im Verlauf ihres Lebens an Brustkrebs erkranken.

Tabelle 1 Risikofaktoren für Brustkrebs
(Current Medical Diagnosis & Treatment 2003, 42nd Edition,
Lawrence M. Tierney, Jr. et al., McGraw-Hill 2002)

Risikofaktoren	
Ethnie	Kaukasierin
Alter	mit zunehmendem Alter
Familienanamnese	Brustkrebs bei Mutter oder Schwester (insbesondere wenn prämenopausal oder bilateral)
Genetik	BRCA1 oder BRCA2 Mutationen
Frühere Krankheitsgeschichte	Endometrium Karzinom proliferative Form fibrocystischer Brustdrüsenerkrankung Brustkrebs kontralateral
Menstruation	frühe Menarche (<12 Jahre) späte Menopause (>50 Jahre)
Schwangerschaft	Nullipara oder erstes Kind nach 35 Jahre

Entscheidend für die individuelle Prognose bei Brustkrebs sind der größte Durchmesser des Primärtumors (T), der Befall der regionalen Lymphknoten der Brust oder Achselhöhle (N) und das Vorliegen von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose. Diese drei Größen finden Eingang in der TNM-Klassifikation, welche von der AJCC (American joint committee on cancer) und UICC (Union international contre cancer) erarbeitet wird und die Grundlage für die Bestimmung des Krankheitsstadiums sind. Die prognostische Relevanz der TNM-Klassifikation zeigt sich beispielhaft an den Überlebenskurven einer Kohorte von Brustkrebspatientinnen die im Krebsregister München zwischen den Jahren 1978 und 1998 erfasst wurde (Abbildung 1): Je niedriger das Krankheitsstadium der Patientin bei Diagnose ist, desto besser ist die Prognose. Aus den Verlaufsdaten des Münchner Krebsregisters lassen sich ganz wesentliche Erkenntnisse zum Krankheitsverlauf und die Biologie von Brustkrebs ableiten. Zum einen zeigt sich, dass die Zeit nach Diagnose von Metastasen bis zum Tode für alle Patienten sehr homogen ist und im Mittel 24 Monate beträgt (Engel, Hölzel et al. 2003). Demnach lässt sich die Zeit nach Erstdiagnose in zwei Phasen unterteilen: In eine Zeit von Diagnose bis zum Auftreten von Metastasen und eine Zeit vom Auftreten der Metastasen bis zum Tode. Eine weitere Beobachtung ist die Korrelation des Tumordurchmessers (T) bei Diagnose mit I) der Häufigkeit des Auftretens und II) der Zeit bis zum Auftreten von Metastasen: Je größer der Tumordurchmesser T, desto wahrscheinlicher und kürzer ist die Zeit bis zum Auftreten von Metastasen.

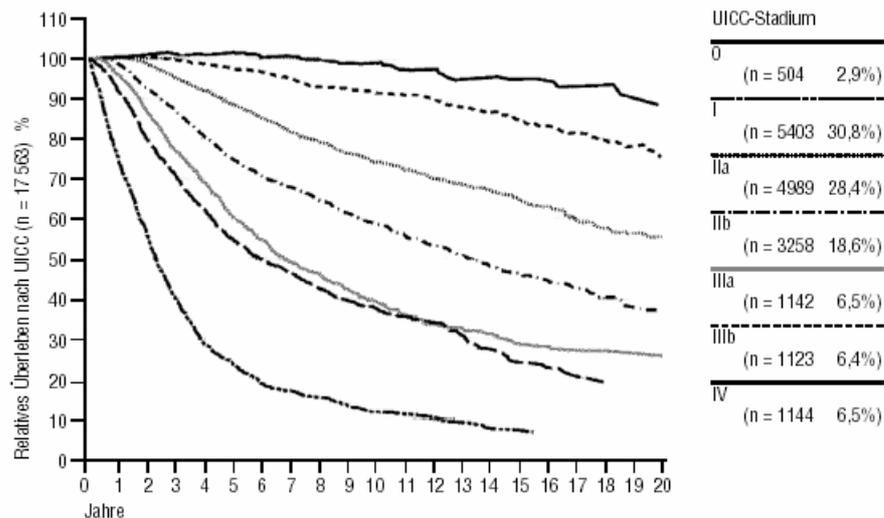


Abbildung 1 Relatives Überleben in Abhängigkeit vom UICC-Stadium (aus Engl J & Hölzel D MANUALMammakarzinom, 2005)

Beträgt das durchschnittliche Zeitintervall bei Vorliegen eines T1 Tumors bis zum Auftreten von Metastasen 43.7 Monate, so ist dies bei Vorliegen eines T4 Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose im Mittel nur noch 17.1 Monate. Gemäß den Verlaufsdaten des Tumorregisters versterben 23% der Patientinnen mit T1 Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose im Verlauf von 15 Jahren, während dies für 76% der Patientinnen mit einem T4 Tumor bei Diagnose zu erwarten ist. Dies impliziert, daß in über 20% der Patientinnen mit einem kleinen Tumor (<2cm, T1 gemäß TNM-Klassifikation) metastatische Vorläuferzellen den Primärtumor bereits vor der chirurgischen Therapie verlassen haben müssen, aber auch, daß ein wesentlicher Anteil an Tumoren die Fähigkeit zur Metastasierung erst nach dem T1 Stadium gewinnt. Trotz Fortschritte in der Diagnose und Therapie führen in den meisten Fällen periphere Metastasen und die damit verbundenen Komplikationen zum Tode des Patienten. Die Gene und das komplexe Wechselspiel der beteiligten Moleküle, die dem Prozeß der Metastasierung zu Grunde liegen sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Die experimentellen Daten weisen daraufhin, daß für die Transformation einer Tumorzelle in eine metastatische Zelle, diese eine Kaskade von definierten Schritten durchlaufen muß.

1.2 Die Minimale Resterkrankung Erkrankung (MRE) bei Brustkrebs

Einen Hinweis, daß es sich bei der Brustkrebserkrankung schon frühzeitig um kein lokoregionäres Geschehen, sondern um eine systemische Erkrankung handelt, liefert der Nachweis von einzelnen, disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. Diese Zellen lassen sich, je nach Studienpopulation, bei 26-36% der Brustkrebspatientinnen (Braun, Pantel et al. 2000; Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003; Braun, Vogl et al. 2005) nachweisen und gewinnen um so mehr an Bedeutung, wenn man berücksichtigt, daß etwa ein Drittel der Brustkrebspatientinnen, die bei Diagnose ohne Nachweis peripherer Metastasen und regionalen Lymphknotenmetastasen sind, im weiteren Verlauf der Erkrankung ein Rezidiv entwickeln (De Vita 1989; Rosner and Lane 1993). Für diese Patientengruppe muß also davon ausgegangen werden, daß der Prozeß der Metastasierung bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung begonnen hat, und Zellen den Primärtumor noch vor der chirurgischen Intervention verlassen haben. Das häufigste, von peripheren Metastasen betroffene Organ bei Brustkrebspatientinnen ist der Knochen (Rubens and Mundy 2000). In einer retrospektiven Studie an 1350 Brustkrebspatientinnen fanden sich in 48,5% der Fälle von peripheren Metastasen diese im Skelett (Jimeno, Amador et al. 2004). Die besondere vaskuläre Ausstattung metaphysealen Knochens (im proximalen und distalen Bereich von Röhrenknochen, den Rippen und Wirbelkörpern), sowie das Vorhandensein spezialisierter, endothelialer Mikrodomänen im Knochenmark prädestiniert den Knochen als bevorzugtes Organ für Metastasen (Mastro, Gay et al. 2003; Welch, Harms et al. 2003; Sipkins, Wei et al. 2005). Einzelne, disseminierte Tumorzellen, welche im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden können, werden deshalb als Vorläuferzellen peripherer Metastasen betrachtet (Klein, Blankenstein et al. 2002; Janni, Rack et al. 2005).

1.2.1 Nachweisverfahren und prognostische Relevanz Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark

Normale, nichtdysplastische Epithelzellen sind nicht in der Lage ihr ursprüngliches Organ zu verlassen. Ausnahmen von dieser Regel können im Rahmen von chronischen Entzündungen auftreten durch einen Prozeß, der als epitheliale-mesenchymale Transition bezeichnet wird (Doglioni, Dell'Orto et al. 1990). Ausreichend methodisch validiert ist der immunzytochemische Nachweis der einzelnen, disseminierten Zellen.

Bei diesem Verfahren erwies sich die Verwendung von Antikörpern gegen Intermediärfilamente, den sogenannten Zytokeratinen, gegenüber Antikörpern gegen polymorphe, epitheliale Muzine als überlegen (Heyderman, Strudley et al. 1985; Schlimok, Funke et al. 1987; Pantel, Schlimok et al. 1994; Braun, Muller et al. 1998; Brugger, Buhning et al. 1999; Braun, Pantel et al. 2000). Ein Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität konnte unter Verwendung des Anti-Zytokeratin-Antikörpers A45-B/B3, in Verbindung mit dem APAAP-Detektionssystems etabliert werden (Naume, Borgen et al. 1998; Stigbrand, Andres et al. 1998). Im Rahmen des Konsensus-Protokolls der deutschen-, österreichischen- und schweizerischen Gesellschaft für Senologie zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark (Fehm, C et al. 2006), ist auch die Verwendung des anti-Zytokeratin-Antikörpers AE1/AE3 möglich (Fehm et al. 2005). Gemäß diesem Protokoll müssen 2×10^6 Zellen mit dem spezifischen Antikörper und 2×10^6 Zellen mit einem isotyp-gematchten Antikörper als Negativkontrolle gefärbt und analysiert werden. Mit diesem Verfahren ist es möglich, eine Zytokeratin-positive Zelle mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit aus 2×10^6 Knochenmarkszellen nachzuweisen (Osborne, Wong et al. 1991). Falsch-positive Ergebnisse liegen bei dieser verwendeten Technik bei $< 1\%$ (Braun, Pantel et al. 2000). Der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen als ein unabhängiger prognostischer Faktor wird insbesondere durch die Ergebnisse der Studie von Braun et al. aus dem Jahre 2000 (Braun, Pantel et al. 2000) und den Ergebnissen einer Metaanalyse (Braun, Vogl et al. 2005) über neun Studien zu diesem Thema unterstrichen. In der Studie aus dem Jahr 2000 wurden in 199 (36%) der 552 untersuchten Brustkrebspatientinnen Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen. In einem Beobachtungszeitraum von vier Jahren zeigte sich, daß der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark signifikant mit dem auftreten peripherer Metastasen ($P < 0,001$) und krebsbedingter Todesfolge ($P < 0,001$) korrelierte. Für die Subgruppe der Patientinnen, für die bei Diagnosestellung kein Lymphknotenbefall nachgewiesen werden konnte, korrelierte der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen ebenfalls signifikant mit der krebsbedingten Todesfolge ($P < 0,001$). Der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark stellt in dieser Studie nach multivariater Analyse einen unabhängigen, prognostischen Faktor für den durch die Krebserkrankung bedingten Tod (Relative risk, 4.17; 95% CI, 2.51 – 6.94; $P < 0.001$) in einem Zeitraum von 4 Jahren nach Diagnosestellung dar. In der 2005 publizierten Metaanalyse (Braun, Vogl et al. 2005) wurde der Krankheitsverlauf von 4703 Brustkrebspatientinnen über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren

dokumentiert und ausgewertet. Der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark stellte in dieser Analyse ebenfalls einen signifikanten ($P < 0,001$), negativen prognostischen Faktor bezüglich dem Gesamtüberleben und dem krebsbedingten Tod dar, sowie für das erkrankungsfreie Überleben (Abbildung 2). In einer univariaten Analyse von Subpopulationen des Patientenkollektivs, zeigte sich für Patienten mit Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark eine signifikante Verkürzung des Gesamtüberlebens, unabhängig davon, ob diese eine adjuvante Chemotherapie oder Hormontherapie erhielten. Auch für die Patientengruppe mit niedrigem Rückfall-Risiko (Tumordurchmesser $< 2\text{cm}$, pN0), zeigte sich eine signifikante Verkürzung der Überlebenszeit durch die Grunderkrankung bei Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark ($P < 0,001$).

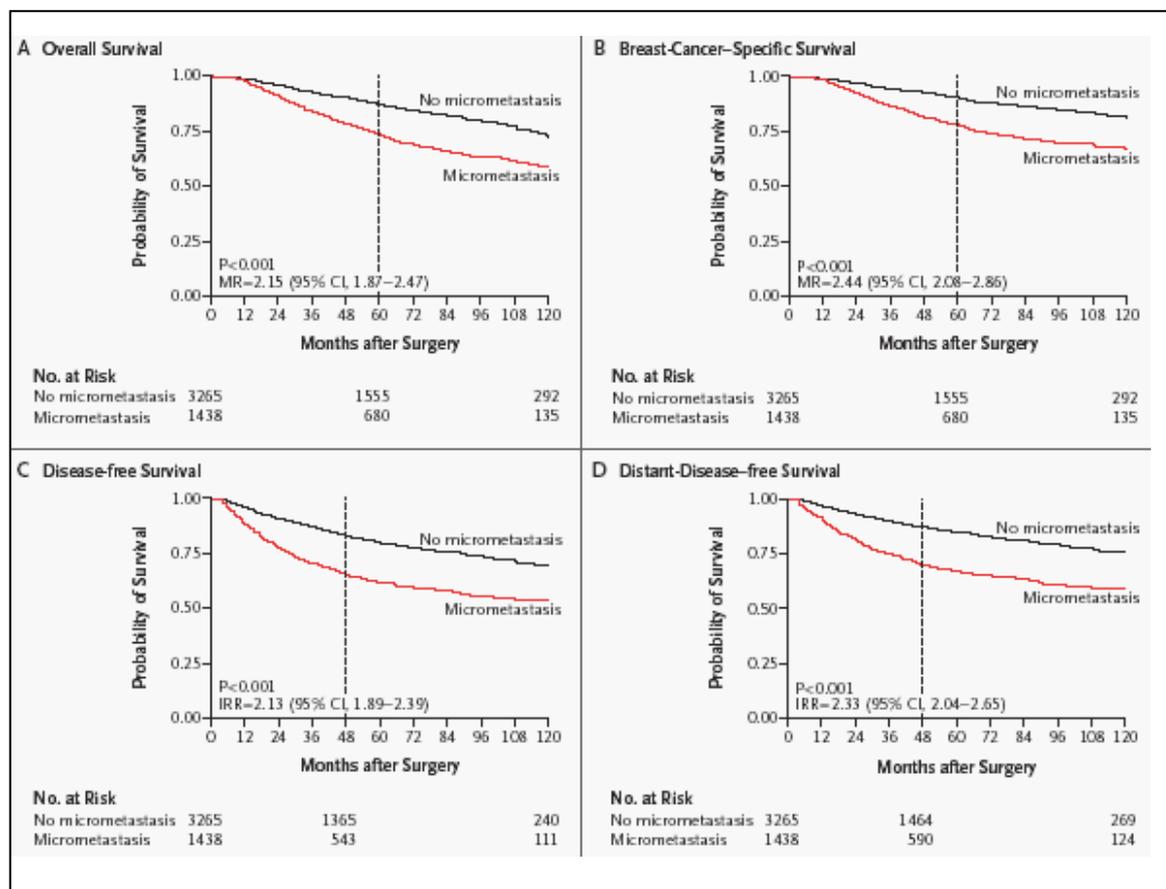


Abbildung 2 Überlebenskurven der Patientengruppen hinsichtlich dem Vorliegen oder Fehlen von Mikrometastasen im Knochenmark (Braun, Vogl et al. 2005).

Die gestrichelte Linie markiert den cutoff Punkt nach fünf oder vier Jahren, welcher für die stückweise Cox-Regressions Analyse verwendet wurde. MR bezeichnet das Mortalitäts-Verhältnis (das Verhältnis der Mortalitätsrate von Frauen mit Mikrometastasen zur Mortalitätsrate von Frauen ohne Mikrometastasen), IRR steht für Inzidenzrate-Verhältnis (das Verhältnis der Inzidenzen für Rückfall oder Tod von Frauen mit Mikrometastasen im Vergleich zu Frauen ohne Mikrometastasen), CI bezeichnet das Vertrauensintervall. Die P Werte wurden mit dem Log-rank Test berechnet.

1.2.3 Die Minimale Resterkrankung als Surrogat-Marker

Die individuelle Prognose des Patienten wird im Wesentlichen durch die Bestimmung der TNM-Größen (TNM-Klassifikation) zum Zeitpunkt der Diagnose, bzw. chirurgischen Therapie bestimmt. Derzeit fehlen noch Möglichkeiten, im weiteren Verlauf die individuelle Prognose weiter zu präzisieren, oder den Erfolg einer adjuvanten Therapie zu bestimmen. Hinweise, dass der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark auch nach operativer und adjuvanter Therapie prognostische Relevanz besitzt, konnte in zwei Studien zu dieser Fragestellung aufgezeigt werden (Wiedswang, Borgen et al. 2004; Janni, Rack et al. 2005). In der Studie von Janni et al. (Janni, Rack et al. 2005) analysierten die Autoren das Knochenmark von 228 Brustkrebspatientinnen nach einem Rezidiv-freien Intervall von 21.3 – 29.1 Monaten. Patientinnen ohne Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark wiesen eine signifikant längere rezidivfreie Zeit auf (149,7 Monate (95% CI, 139,6-159,8 Monate) als Patientinnen mit positivem Knochenmarksbefund (86,5 Monate (95% CI, 65,7-107,4 Monate $P=0,0003$). Auch für das Gesamtüberleben zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei negativem Knochenmarksbefund (162.1 Monate; 95% CI, 152,1-172,0 Monate) im Vergleich zu Patientinnen mit positivem Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark (98,7 Monate; 95% CI, 79,7-117,9 Monate; $P=0,0008$). In der Studie von Wiedswang et al. (Wiedswang, Borgen et al. 2004) wiesen die Autoren im Mittel drei Jahre nach Diagnose und primärer Therapie im Knochenmark von 15% der Patientinnen eines Kollektivs von 356 Brustkrebspatientinnen Zytokeratin-positive Zellen nach. In einem Beobachtungszeitraum von weiteren 66 Monaten kam es bei 21% der Patientinnen mit positivem Knochenmarksbefund zu einem Tumorrezidiv, während dies nur bei 7% der Patientinnen mit negativem Knochenmarksbefund der Fall gewesen war ($P<0,001$). Für Patientinnen mit persistierenden Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark zeigte sich ausserdem eine signifikant verkürzte krankheitsfreie Zeit und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an der Grunderkrankung Brustkrebs zu versterben ($P<0,001$).

1.2.4 Phänotypische Charakterisierung Zytokeratin-positiver Zellen

Die Transformation in einen invasiven Phänotyp ist ein Hauptmerkmal maligner Tumoren. Metastatische Vorläuferzellen lösen sich aus dem epithelialen Zellverband durch den Verlust von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und exprimieren Proteine, welche die Degradation von Bindegewebe und der Basalmembran ermöglichen, so genannte Proteasen. Durch immunzytochemische Doppelfärbungen an Zytokeratin-positiven Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, daß diese Zellen Moleküle exprimieren, die im Zusammenhang mit einem invasiven Phänotyp stehen.

So gelang der immunzytochemische Nachweis für HER2/neu und Urokinase Plasminogen Aktivator (UPA) an der Oberfläche einzelner, Zytokeratin-positiver Zellen (Pantel, Schlimok et al. 1993; Braun, Hepp et al. 1999; Hensen, Riethdorf et al. 2003; Reimers, Zafrakas et al. 2004). Innerhalb einer Studienpopulation exprimierten 60-70% der Zytokeratin-positiven Zellen HER2/neu, hingegen nur 20-30% der Primärtumoren. Auf Grund dieses Missverhältnisses, so folgern die Autoren, ist die HER2/neu-Überexpression, möglicherweise für das Auswachsen der Zytokeratin-positiven Zellen in klinisch nachweisbare Metastasen notwendig (Braun, Hepp et al. 1999; Braun, Schlimok et al. 2001; Meng, Tripathy et al. 2004). Das Molekül EMMPRIN stimuliert peritumorale Fibroblasten zur Sekretion der Matrix Metalloproteasen (MMPs)-1,-2 und-3, sowie MT1-MMP und wird auf ca. 90% der analysierten Zytokeratin-positiven Zellen exprimiert (Reimers, Zafrakas et al. 2004). In wie weit es sich bei den Zytokeratin-positiven Zellen um proliferierende Zellen handelt wurde in Doppelfärbungen gegen Zytokeratin und die Proliferationsmarker p120 und Ki67 untersucht (Pantel, Schlimok et al. 1993; Braun and Pantel 1999). Dabei zeigte sich, daß nur in einem Anteil von unter 10% der Zellen die entsprechenden Proliferationsmarker immunzytochemisch nachgewiesen werden konnten.

1.2.5 Genomische Charakterisierung Zytokeratin-positiver Zellen durch Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus PCR (SSCP) und comparativer genomischer Hybridisierung (CGH)

Die genomische Charakterisierung der Zytokeratin-positiven Zellen wurden erst durch die Entwicklung eines PCR-Verfahrens möglich, welche das Genom einer einzelnen Zelle vervielfältigt und somit weiteren Analysen zugänglich macht (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999). Die in den Arbeiten von Klein et al. (Klein, Blankenstein et al. 2002) und Schmidt-Kittler et al. (Klein, Blankenstein et al. 2002) im Anschluss an die

globale Amplifikation des Genoms verwendeten Verfahren sind zum einen SSCP-PCR Analysen (engl.: single-stranded conformational polymorphism) und Sequenzierungsreaktionen zum Nachweis von Punktmutationen, zum anderen das Verfahren der Comparativen genomischen Hybridisierung (CGH), einem Screening-Verfahren über das gesamte Genom zum Nachweis von größeren DNA-Amplifikationen und -Verlusten mit einer Auflösung von $\geq 10\text{-}25$ Mb (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1994; Lichter, Joos et al. 2000). Bei der Methode der CGH wird Tumor-DNA und die DNA eines gesunden Probanden mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert (z.Bsp. Tumor DNA grün und gesunde DNA rot) und in gleichen Mengen auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Die beiden Farbsignale werden anschließend durch digitale Bilderauswertung quantifiziert. Ein chromosomaler Bereich, der überwiegend grün fluoreszierende DNA gebunden hat zeigt an, dass Tumor-DNA in diesem Bereich überrepräsentiert ist und somit eine Amplifikation dieses chromosomalen Abschnittes im untersuchten Tumormaterial vorliegt. Ist eine Region rot gefärbt, so ist Tumor-DNA in diesem Bereich unterrepräsentiert und es liegt demzufolge ein DNA-Verlust vor.

In der Arbeit von Klein et al. (Klein, Blankenstein et al. 2002) wurden Proben aus dem Knochenmark, Blut und Lymphknoten von 525 Patienten (304 Proben von Brustkrebspatientinnen, 115 von Patienten mit gastrointestinalem Tumor und 106 Proben von Prostata-Karzinom Patienten) auf Zytokeratin-positive Zellen untersucht. Unabhängig vom Karzinom-Typ zeigte sich in Cluster-Analysen (Ähnlichkeits-Analysen hinsichtlich definierter Merkmale) der CGH-Ergebnisse der Einzelzellen von Patienten im klinischen Stadium M1 eine größere Ähnlichkeit der Zellen eines individuellen Patienten als für Zellen von Patienten im klinischen Stadium M0 ($P=0,0016$). Die Zellen der M1-Patienten wiesen deutlich mehr Abberationen als die Zellen der M0-Patienten auf (durchschnittlich 11,8 vs. 6,7; $P<0,0001$). Auf Grund dieser Ergebnisse, so schliessen die Autoren, muß eine Selektion, beziehungsweise eine Konvergenz des Karyotyps aus dem Repertoire an disseminierten Zellen beim Übergang des klinischen Stadiums M0 in M1 stattgefunden haben, hin zu einer Population, welche einem aggressiven Genotyp entspricht. Der p53-Status wurde in 115 Einzelzellen bestimmt. Für 19 Zellen (16,5%) konnten Mutationen in den Exons 4-9 des p53 Gens nachgewiesen werden.

In der Studie von Schmidt-Kittler et al. (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003) wurden 189 einzelne, Zytokeratin-positive Zellen mit der Technik der comparativen genomischen Hybridisierung analysiert. Für 14 Patienten konnten sowohl Zytokeratin-positive Zellen,

als auch Mikrodissektate des korrespondierenden Primärtumors miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse sind im Folgenden kurz zusammengefasst. Im Vergleich der CGH-Profile für M0- und M1 Patienten zeigte sich, dass die Zellen von Patienten im Stadium M1 der Erkrankung (nach UICC) deutlich mehr CGH-Veränderungen aufwiesen als für Zellen von M0 Patienten (durchschnittliche Anzahl Aberrationen je Zelle: 12,8 vs. 5,9; $P < 0,0001$). Folgende Aberrationen fanden sich häufiger in M1-Zellen als in M0-Zellen: Deletionen von 6q, 13q, 14q, 16q und 18q, sowie Amplifikationen von 1q, 8q, 16q, 17q und 20q. Im Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen mit dem korrespondierenden Primärtumor zeigte sich für nur zwei von 14 Patienten ein hoher Grad an Übereinstimmung bezüglich der genetischen Aberrationen. Für Zellen von M0-Patienten liessen sich deutlich weniger CGH-Veränderungen nachweisen als in dem entsprechenden Primärtumor (5,9 vs. 10,4; $P < 0,008$). Die Mehrzahl, der in M0-Zellen auftretenden Veränderungen sind numerische Chromosomenaberrationen, während M1-Zellen signifikant häufiger große, strukturelle Chromosomenaberrationen (beispielsweise ganze Chromosomenarmverluste oder -Amplifikationen) aufweisen, wie sie nach Fusion von Chromosomenendigungen und Doppelstrang-Brüchen auftreten können, ein Vorgang der auch als „telomere Krise“ bezeichnet wird (Maser and DePinho 2002),(Artandi, Chang et al. 2000). Da diese Veränderungen in M0-Zellen fehlen, muß davon ausgegangen werden, daß sie den Primärtumor vor der Phase dieser „Krise“ verlassen haben. 60 % (61/101) der in M0 Patienten detektierten Zytokeratin-positiven Zellen, wiesen in dieser Studie keine CGH-Veränderungen auf.

1.3 Der Verlust der Heterozygotie

Fehlerhafte Rekombinationsereignisse während der Mitose, sowie der Verlust der Fähigkeit zur Wahrung der Integrität des Genoms durch fehlerfreie Replikation, Telomerprotektion und DNA-Reparaturmechanismen führen zu genomischer Instabilität der Zelle. Eine der am häufigsten nachzuweisenden, genetischen Veränderungen in Tumorzellen ist der Verlust genetischen Materials, welcher unter anderem durch die Analyse hochpolymorpher Nukleotidsequenzen des menschlichen Genoms, sogenannter Mikrosatelliten bestimmt werden kann (Allelverlust-Studien oder LOH-Studien, LOH engl.: *loss of heterozygosity*). Die Frequenz dieser subchromosomalen Deletionen ist ein wesentliches Merkmal und Ausdruck genomischer Instabilität maligner Tumoren (Hanahan and Weinberg 2000; Thiagalingam, Foy et al. 2002). In der Vergangenheit erwiesen sich Allelverlust-Studien von besonderem Nutzen für die Lokalisation und

Identifizierung von Tumorsuppressorgenen (TSG): Alfred Knudson folgerte aus Inzidenzkurven für das Retinoblastom, dass zwei limitierende, genetische Ereignisse (sogenannte „hits“) für die Ausbildung eines klinisch manifesten Retinoblastoms ausreichend und notwendig sind (Knudson 1971; Knudson 1975; Knudson 2000). Diese Hypothese konnte später bestätigt werden, als bei Retinoblastom-Patienten mit dem Verlust der Heterozygotie im RB1-Locus germinale Mutationen in dem verbliebenen Allel nachgewiesen werden konnten (Cavenee, Dryja et al. 1983; Godbout, Dryja et al. 1983). Auf Grund der Tatsache, dass beide Allele des RB1 Gens durch Mutationen („hits“) betroffen sind entstand als Verallgemeinerung das Konzept der Inaktivierung rezessiver Tumorsuppressorgene. Eine Vielzahl der bis heute identifizierten Tumorsuppressorgene (TSG) zeigen diese Charakteristika der Inaktivierung und sind assoziiert mit seltenen, familiären Syndromen. In neuerer Zeit wird aber deutlich, daß immer mehr Ausnahmen für Knudsons „Two-hit“ Paradigma bestehen. So kann der Verlust eines Allels (durch Deletion, oder durch Suppression der Transkription) zur Reduktion in der Expression des betroffenen Gens führen. Dieser Dosiseffekt allein kann ausreichen, um die volle Funktionalität des Gens zu beeinträchtigen. Eine Mutation in dem zweiten verbliebenen Allel und der damit verbundene Verlust der kompletten Genaktivität ist in diesen Fällen keine Notwendigkeit. Beispiele von Genen, die diesem Prinzip der sogenannten ‚Haploinsuffizienz‘ folgen sind CHD5 auf dem Chromosomenabschnitt 1q36 (Bagchi A et al. 2007) , der Transkriptionsfaktor Nkx3.1 für das Prostatakarzinom (Magee, Abdulkadir et al. 2003) oder der Zellzyklusregulator p27 für die akute myelolische Leukämie (Fero, Randel et al. 1998) beschrieben.

1.3.1 Wie ist der Verlust der Heterozygotie definiert?

Nach Entschlüsselung des menschlichen Genoms wird davon ausgegangen, daß etwa 35% der menschlichen DNA aus repetitiver DNA besteht (Venter, Adams et al. 2001). Mikrosatelliten sind spezifische Nukleotid-Sequenzen, die sich aus repetitiven mono-, di-, tri- oder tetra- Nukleotid-Einheiten zusammensetzen und sich bis zu 10- oder 20-mal wiederholen. Diese Wiederholungsmotive sind in einer Vielzahl über das Genom von höheren Eukaryonten verteilt (Nadir, Margalit et al. 1996). So werden über 0,25% des Genoms von Mikrosatelliten mit einem CA-dinukleotid Wiederholungsmotiv gebildet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Bezeichnung „Mikrosatellit“ gründet auf dem Phänomen, dass genomische DNA, wird sie über einen Dichtegradienten-Zentrifugationsschritt fraktioniert, DNA-Fragmente mit Tandem-Wiederholungen

sogenannte „Satellitenbanden“ bilden. Ihre Funktion ist weitestgehend unbekannt. Mikrosatelliten sind hochpolymorph, das bedeutet, daß sich die Anzahl der Wiederholungs-Motive eines Locus für die Mehrzahl der Mitglieder einer Spezies voneinander unterscheidet. Innerhalb einer Population können zum Teil 70 oder 80 Allele eines einzigen Mikrosatellitenlokus auftreten. Ein Individuum, welches homozygot für einen Locus ist, hat die gleiche Anzahl Wiederholungen (beispielsweise eines CA-Dinukleotid Motivs) innerhalb dieses Mikrosatelliten für das maternale und das homologe, paternale Chromosom (Patient A in Abbildung 3). Ein für den entsprechenden Mikrosatellitenlokus heterozygoten Individuum besitzt unterschiedliche Anzahlen des CA-dinukleotid Wiederholungsmotivs für die Allele der beiden homologen Chromosomen (Patient B in Abbildung 3). Die flankierenden DNA-Regionen von Mikrosatelliten sind in einer Population nicht polymorph und können deshalb dazu benutzt werden, Mikrosatellitenloci durch das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren.

Für den Nachweis des Fehlens bzw. Vorliegens eines Mikrosatelliten-Polymorphismus wird der Mikrosatellitenlokus mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und das PCR-Produkt elektrophoretisch nach der Größe über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Für Patient A ist der untersuchte Locus homozygot und nur eine Bande ist in der PAGE-Analyse sichtbar. Für Patient B lassen sich zwei unterschiedlich große Banden darstellen. Dem Verlust der Heterozygotie (LOH) liegt der Verlust genetischen Materials im Bereich des Mikrosatelliten Locus zu Grunde, welcher für die Beurteilung in dem betreffenden Patienten heterozygot sein muss. Man spricht von homozygotem Allelverlust, wenn beide Allele deletiert sind und durch PCR nicht mehr nachweisbar sind. Um den Verlust der Heterozygotie innerhalb malignen Gewebes zu detektieren, wird der Genotyp des Tumors für einen spezifischen Mikrosatelliten Locus mit dem entsprechenden Genotyp von Normalzellen (z.Bsp. periphere, mononukleäre Blutzellen) des Patienten verglichen (Abbildung 3). Die Genotypisierung solider Tumoren ermöglicht die Bestimmung von kleinsten, deletierten Regionen als wahrscheinliche Bereiche, in denen Tumorsuppressorgene lokalisiert sind (Baker, Fearon et al. 1989; Nigro, Baker et al. 1989; Oda, Kanai et al. 1994; Wooster, Bignell et al. 1995; Hahn, Hoque et al. 1996; Li, Yen et al. 1997; Liaw, Marsh et al. 1997).

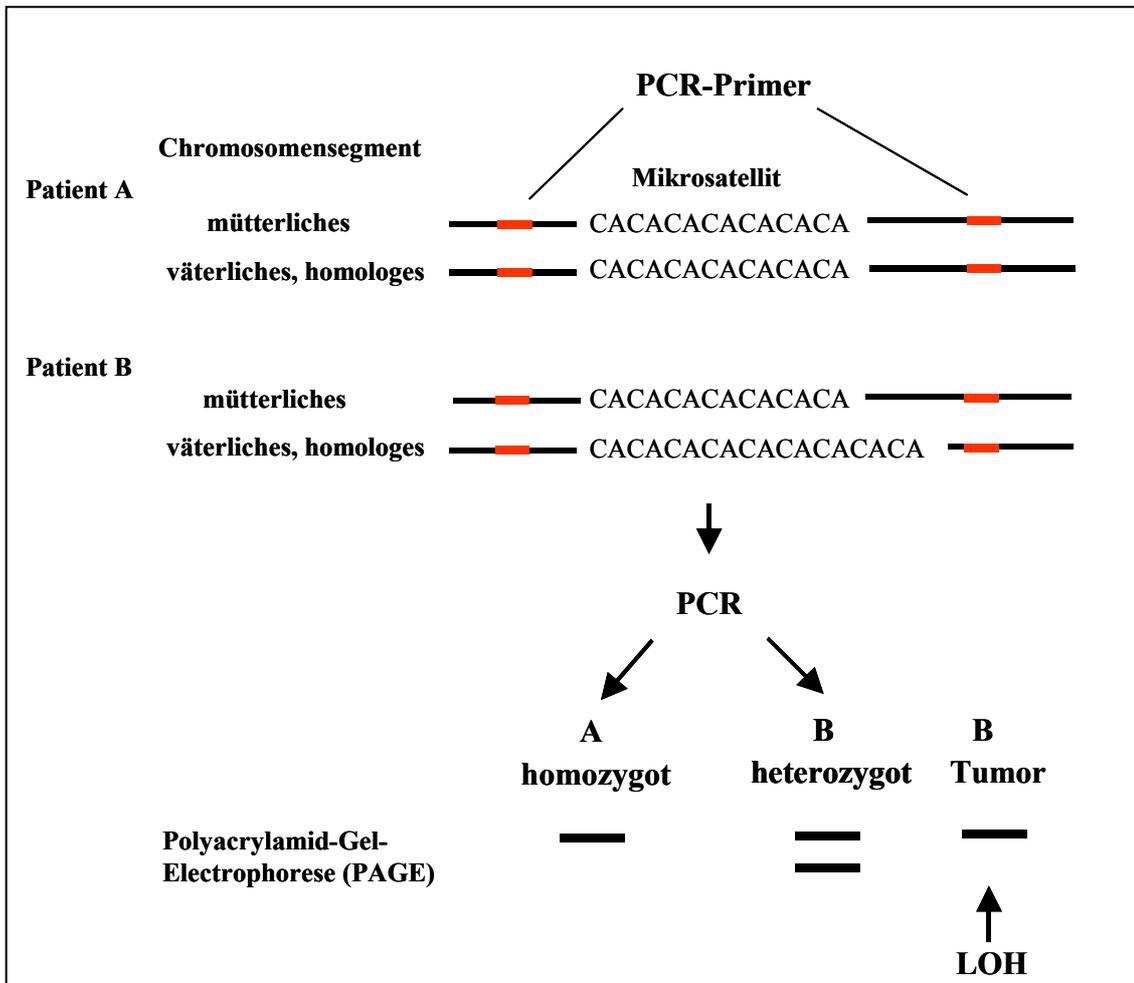


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Genotyps eines spezifischen Mikrosatelliten für die Patienten A und B

Patient A ist für den untersuchten Mikrosatelliten homozygot, das heisst die Anzahl CA-Wiederholungen für diesen Mikrosatelliten sind für das maternale und das paternale homologe Chromosom identisch und nur eine Bande wird nach PCR und Grössenauftrennung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) sichtbar. Für Patient B lassen sich zwei unterschiedlich grosse Banden im Normalgewebe nachweisen. In dem korrespondierenden Tumorgewebe lässt sich nur ein Allel amplifizieren. In diesem Fall muss von dem Verlust genetischen Materials in diesem Bereich für eines der Chromosomen ausgegangen werden. Man spricht dann von Allelverlust oder dem Verlust der Heterozygotie (LOH, englisch: loss of heterozygosity).

1.3.2 Entstehungsmechanismen des Verlusts der Heterozygotie

Nach der Größe des betroffenen, genomischen Abschnittes lassen sich die Mechanismen für das Auftreten von LOH Ereignissen in drei Gruppen einteilen: 1. Der lokalisierte Verlust eines Allels (so genannte interstitielle Deletion), 2. der Verlust eines weiten Bereiches genetischen Materials bis zum Verlust eines ganzen Chromosomarmes und 3. der Verlust eines ganzen Chromosoms (Abbildung 4). Neben mitotischen Rekombinationsereignissen sind grosse, strukturelle Chromosomenaberrationen wie Translokationen oder Chromosomenbruch mit konsekutivem Verlust des Segments,

sowie eine fehlerhafte Chromosomensegregation während der Mitose für das Auftreten von Allelverlusten verantwortlich.

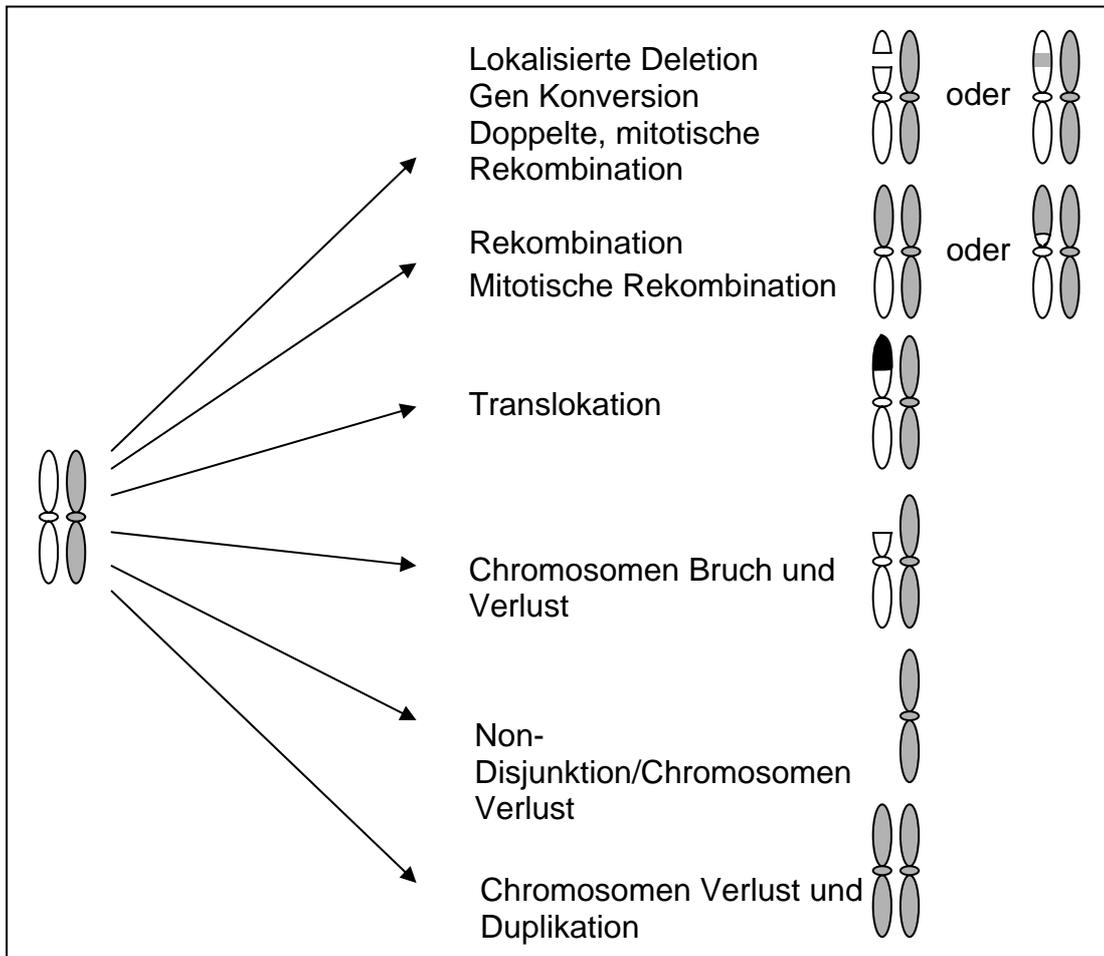


Abbildung 4 Modell zur molekularen Entstehung des Verlustes der Heterozygotie (modifiziert nach Thiagalingam, (Thiagalingam, Laken et al. 2001)).

Der Verlust von Genen innerhalb der betroffenen Regionen kann zur Haploinsuffizienz oder dem Aufdeckens eines rezessiven oder defizienten Allels führen

1.4 Genotypisierung von Primärtumoren des Mammakarzinoms

Eine umfassende Darstellung der Ergebnisse von 118 LOH-Studien an Brustkrebsgewebe liefert die Metaanalyse von Miller-BJ et al. (Miller, Wang et al. 2003), in der die Genotypen von über 15.000 Brusttumoren ausgewertet wurden (Abbildung 5).

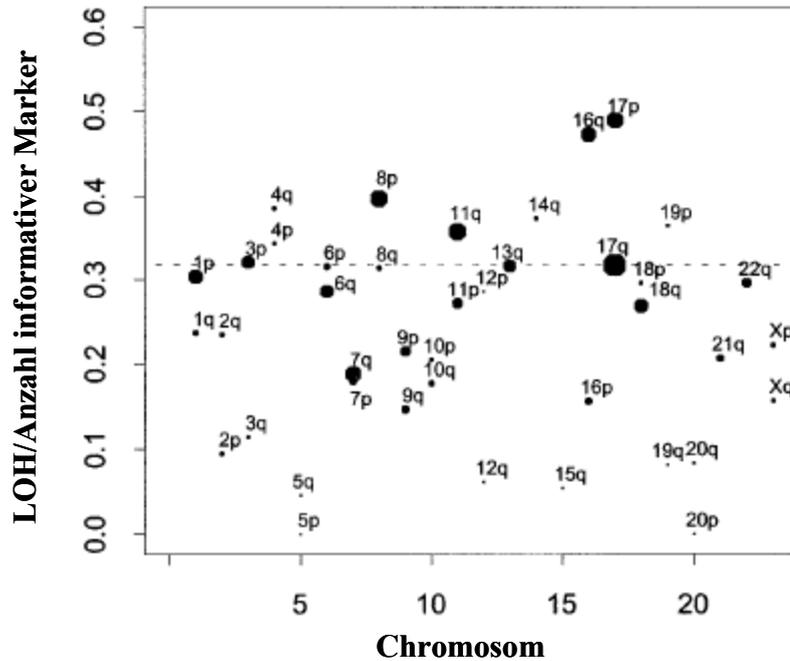


Abbildung 5 Relative Häufigkeit von LOH Ereignissen je Chromosomenarm in 118 Studien an Brustkrebsgewebe (modifiziert nach (Miller, Wang et al. 2003))

Die Fläche jedes Kreises ist proportional zur Anzahl auswertbarer, informativer Marker für den entsprechenden Chromosomenarm aus allen Studien. Die durchschnittliche LOH-Rate für jeden Chromosomenarm beträgt 0,318, (in der Abbildung als gestrichelte Linie markiert).

Demnach weisen bei primären Mammakarzinomen die Chromosomenarme 16q und 17p die häufigsten Allelverluste auf, mit LOH-Ereignissen in über 40% der untersuchten, informativen Marker. Auf dem Chromosomenarm 16q ist unter anderem das Gen für E-Cadherin lokalisiert, auf 17p das Tumorsuppressorgen p53. Die Anzahl an LOH-Ereignissen für die Chromosomenarme 7q und 9p liegt deutlich unter dem Durchschnitt von 31,8%. Unterschiede bestanden auch in der Anzahl auswertbarer, informativer Marker. Für die beiden Arme des Chromosoms 17 wurde die grösste Zahl informativer Marker ausgewertet. Für eine Reihe von Chromosomen liessen sich nur wenige

informative Marker auswerten (zum Beispiel für Chromosom 5 und Chromosom 20). Je größer die Anzahl an informativen, auswertbaren Markern ist, desto Aussagekräftiger sind die Ergebnisse der Genotypisierung.

1.5 LOH-Studien an Primärtumoren und korrespondierenden Brustkrebsmetastasen

Im Gegensatz zu Allelverlust-Studien an Primärtumoren findet sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur eine begrenzte Anzahl an Arbeiten in der Literatur, in denen der Genotyp von Brustkrebsmetastasen, beziehungsweise das Gewebe von primären Brusttumoren und den jeweiligen korrespondierenden Metastasen bestimmt wurde. Überwiegend wurden Lymphknotenmetastasen analysiert. Chen et al. analysierten 12 chromosomale Regionen von 98 primären Brusttumoren und für 17 Fälle zusätzlich in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen: die am häufigsten von LOH betroffenen Regionen der Primärtumoren waren 17p (51% der informativen Fälle), 3p (46%), 22q (38%), 13q (36%) und 1q (26%). Die nachgewiesenen LOHs für einen Primärtumor fanden sich auch in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen wieder. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass diese Veränderungen noch vor der Disseminierung auftraten (Chen, Kuriso et al., 1992). Die entsprechenden Genotypen für die Primärtumoren und die entsprechenden Lymphknotenmetastasen sind aber in der Originalarbeit nicht dargestellt. Klonalitätsanalysen wurden ebenfalls nicht durchgeführt. Bonsing et al. (Bonsing, Dvilee et al., 1993) untersuchten mit 31 polymorphen Markern 23 chromosomale Regionen von 9 primären Brusttumoren und 29 korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. Allelverluste in über 50% der informativen Fälle traten für die Chromosomenarme 1p, 3p, 6q, 8p, 14q, 15q, 16q, 17p, 17q, 18q und Xq auf. Auch in dieser Arbeit sind die Deletionen aus dem Primärtumor in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen nachweisbar gewesen. In Klonalitätsanalysen konnte außerdem der gemeinsame Ursprung von Zellen der Lymphknotenmetastasen und des Primärtumoren nachgewiesen werden.

Driouch et al. bestimmten in ihrer Arbeit den Genotyp von 77 primären Brusttumoren, sowie von 19 Lymphknotenmetastasen und 5 viszerale Metastasen für 15 Mikrosatelliten auf dem Chromosomenarm 16q (Driouch, Dorion-Bonnet et al., 1997). Im Vergleich mit den Ergebnissen an den Primärtumoren wurden für die Metastasen ähnlich häufig der Verlust des gesamten Chromosomenarms, sowie die Häufigkeit an komplexen Deletionen nachgewiesen. Die relative Allelverlusthäufigkeit für den individuellen Marker in metastatischem Gewebe variierte zwischen 44% (D16S303)

und 79% (D16S301). Für die Metastasen mit interstitiellen Deletionen konnte drei überlappende Regionen definiert werden, die häufig von LOH betroffen sind (16q22.1, 16q22.1-q23.2 und 16q24-ter. Ellsworth et al. Analysierten 26 chromosomale Regionen von 25 primären Brusttumoren und deren korrespondierende Lymphknotenmetastasen mit 52 Mikrosatellitenmarkern. Die entsprechenden Proben wurden mit Hilfe eines Lasers aus den Gewebeschnitten gewonnen (Laser-Mikrodissektion). Dabei zeigte sich, daß die durchschnittliche Allelverlusthäufigkeit in den Primärtumoren (0,24) signifikant größer ($P < 0,001$) als in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (0,1) war. Die häufigsten Allelverluste in Lymphknotenmetastasen wurden für die chromosomalen Regionen 11q13.4 (25%), 16q22.3-q24.3 (20%) und 16q24.3 (20%) nachgewiesen. Im Gegensatz zu den früheren Studien zeigten sich aber deutliche Unterschiede in dem Muster der Allelverluste für das Gewebe von Primärtumor und Lymphknotenmetastase. Die Diskordanz für die entsprechenden Proben lag durchschnittlich bei 25% (5%-59%) der informativen Marker. Für 91% der Allelverluste, die sowohl im Primärtumor als auch in der korrespondierenden Lymphknotenmetastase nachgewiesen werden konnten, war das gleiche Allel von Verlust betroffen. Hampl et al. (Hampl, Hampl et al. 1999) bestimmten den Genotyp von 17 primären Brusttumoren und 22 korrespondierenden, peripheren (viszerale, ossäre, intracerebrale) Metastasen. Dazu werteten sie die LOH-Ergebnisse von 29 Mikrosatellitenmarkern für sieben chromosomale Regionen aus. Für alle untersuchten Regionen fand sich ein häufigerer Allelverlust für Metastasen als in dem korrespondierenden Primärtumor (Tabelle 2). Im Vergleich der LOH-Muster metastatischer Läsionen und dem korrespondierenden Primärtumor zeigten sich für 14 von 17 Fällen Unterschiede für mindestens eine der untersuchten Regionen. Zwei Metastasen in Knochen und Gehirn eines Patienten wiesen unterschiedliche LOH-Muster auf, was dafür spricht, so die Autoren, daß sich die metastatischen Vorläuferzellen unabhängig von einander entwickelten. Für alle untersuchten Metastasen fanden sich die, von Allelverlust betroffenen Regionen des korrespondierenden Primärtumoren wieder.

Tabelle 2 Häufigkeit von LOH in primären Brusttumoren und den korrespondierenden peripheren Metastasen (Hampl, Hampl et al. 1999).

Chromosomale Region	Primärtumor LOH (%)	Periphere Metastase LOH (%)	P-Value ^a
16q22.2-23.2	41 (7/17) ^b	73 (16/22)	< 0.05
17p13.1	33 (5/15)	68 (13/19)	<0.05
13q12-13	13 (2/16)	67 (14/21)	<0.05
11q22-23	27 (4/15)	55 (11/20)	NS
17q21	27 (4/15)	44 (8/18)	NS
17q21.3	38 (6/16)	57 (12/21)	NS
1q32-41	41(7/17)	55 (12/22)	NS
15q11	23 (3/13)	38 (7/18)	NS

^a *Chi-Quadrat Test/Fisher`s exakt Test, signifikant wenn $P < 0.05$*

^b *Fälle mit LOH/informative Fälle*

NS, nicht signifikant

1.6 Zell-Zell Kontakte: Gürteldesmosomen (Zonula adhaerens)

Wesentlich für den mechanischen Zusammenhalt epithelialer Zellen ist ein intaktes System von Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 6). Diese sind entscheidend für die Zell- und Gewebsmorphogenese und an zentralen Prozessen wie Motilität der Zelle, Wachstum und Differenzierung beteiligt (Takeichi 1988; Takeichi 1991). Man unterscheidet drei Gruppen von Verbindungen: 1. undurchlässige Verbindungen (tight junctions), 2. kommunizierende Verbindungen (gap junctions) und 3. Haftverbindungen (Desmosomen, Hemidesmosomen). Gürteldesmosomen (Zonula adhaerens) bilden den mechanischen Zusammenhalt zweier benachbarter Epithelzellen durch den homotypen Kontakt zwischen der extrazellulären Domäne, der an der Oberfläche lokalisierten Cadherin-Moleküle benachbarter Zellen, in Gegenwart ionisiertem Calciums (Abbildung 8). Cadherine sind integrale Glykoproteine der Zellmembran. Die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin (CDH1), dem Hauptcadherin von Epithelzellen besteht aus fünf sogenannten Cadherin-Domänen (EC1-EC5). Der zytoplasmatische Anteil von E-Cadherin bindet an die submembranären Plaque-Proteine Beta-Catenin (CTNNB1) oder Plakoglobin (JUP), welche via Alpha Catenin (CTNNA1) mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind (Ben-Ze'ev and Geiger 1998; Nagafuchi 2001;

Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002; Hirohashi and Kanai 2003). Die transmembranäre Kooperation der Cadherin-Moleküle mit dem Zytoskelett ist Voraussetzung für einen stabilen Zell-Zell Kontakt und eine normale Zellphysiologie.

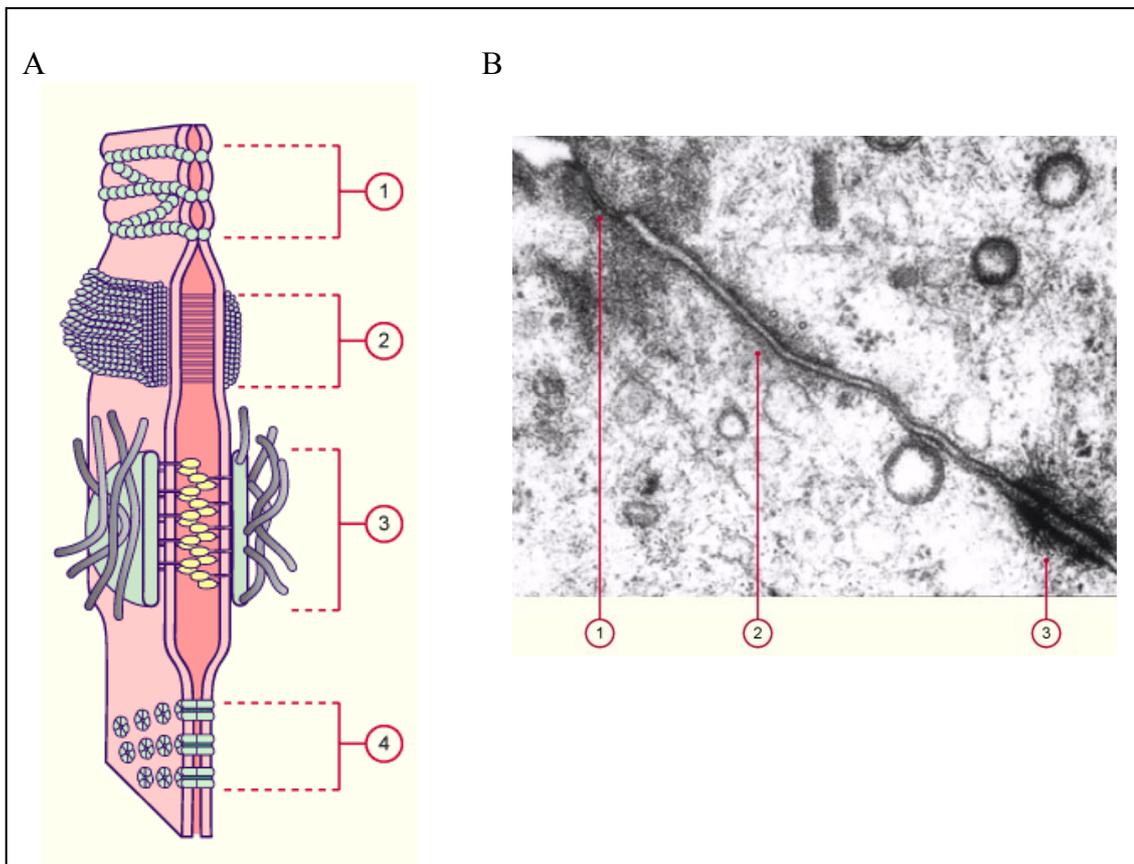


Abbildung 6 Interzelluläre Verbindungen

(A) 1. Tight junctions (zonula occludens) 2. Desmosomen (zonula adhaerens),
3. Desmosomen (macula adhaerens) 4. Gap junctions (Nexus), (B)
Elektronenmikroskopisches Bild der Interzellulären Verbindungen
(<http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/epithel/epithel05.html>)

1.7 Die Rolle des Cadherin-Catenin Zell-Zell Kontakt Systems in der Signaltransduktion und Karzinogenese

Die maligne Transformation einer Zelle ist gekennzeichnet durch Veränderungen des Zytoskeletts, einer veränderten Signaltransduktion, die bei intakten Zell-Zell Kontakten besteht und verminderter Zell-Zell Adhäsion. Ein früher Schritt in der Kaskade der Metastasierung ist der Verlust der Zellkohäsivität benachbarter Tumorzellen. Durch *in vitro* Experimente konnte nachgewiesen werden, daß E-Cadherin invasionssupprimierende Eigenschaften besitzt (Behrens, Mareel et al. 1989; Vleminckx, Vakaet et al. 1991). Für die familiäre Form des diffusen Magenkarzinoms

wurden Keimbahn Mutationen für E-Cadherin nachgewiesen (Guilford, Hopkins et al. 1998). Der Verlust der E-Cadherin Expression verhindert die Bildung von Gürteldesmosomen und ist assoziiert mit der Transition vom Adenom zum Karzinom, sowie mit einer erhöhten Metastasierungstendenz. Die Rekonstitution von Gürteldesmosomen in Tumorzellen durch Reexpression von E-Cadherin führt zu einer Abnahme der Proliferation und Motilität der Zellen (Vleminckx, Vakaet et al. 1991; Perl, Wilgenbus et al. 1998). Mutationen des *E-Cadherin* Gens finden sich neben der familiären Form des diffusen Magenkarzinoms auch für das lobuläre Mammakarzinom. Für Brustkrebs vom lobulären Typ, lassen sich häufig neben der Mutation des einen E-Cadherin-Allels der Verlust des Zweiten durch LOH nachweisen. Diese Sequenz folgt somit dem klassischen Mechanismus des von Knudson postulierten ‚two-hit‘- Modells zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Neben Mutation und Deletion können auch reversible Mechanismen der Gen-Suppression auftreten, welche durch Hypermethylierung des *CDHI*- Promoters verursacht werden (Graff, Gabrielson et al. 2000). Transkriptionelle Inhibierung von *CDHI* findet auch bei veränderter Expression von Transkriptionsfaktoren, wie Snail, E12/E47 und SIP1 statt, wodurch es zu einer verminderten E-Cadherin Expression kommt (Batlle, Sancho et al. 2000; Cano, Perez-Moreno et al. 2000; Comijn, Berx et al. 2001; Perez-Moreno, Locascio et al. 2001). Tumorzellen bedienen sich demnach irreversiblen, als auch reversiblen Mechanismen zur Suppression von E-Cadherin. Als erste Komponente des Wnt-Signalweges, die durch Mutation in ihrer Funktion beeinträchtigt ist, wurde das *APC*-Gen in Familien mit der Erkrankung adenomatöser Polyposis Coli entdeckt. Mitglieder der Familien mit germinaler Mutation des APC-Gens entwickeln im Verlauf ihres Lebens hunderte von kolorektalen Adenomen und haben eine hohe Wahrscheinlichkeit ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. In etwa 80% der sporadischen Darmtumoren lassen sich ebenfalls Mutationen des *APC*-Gens nachweisen. Dabei handelt es sich in erster Linie um Trunkierungsmutationen, die eine Akkumulierung von beta-Catenin im Zytoplasma und Kern der Zellen bewirken (Abbildung 8). Physiologisch ist APC Bestandteil eines Proteinkomplexes, der durch Phosphorylierung von beta-Catenin zu dessen Ubiquitierung und Degradation im 26S-Proteasom führt (Nelson and Nusse 2004). In bis zu 4% der untersuchten Brustkrebsgewebe lassen sich Mutationen des *APC*-Gens nachweisen (<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic>). Mutationen des *beta-Catenin* Gens sind in erster Linie aktivierende Mutationen, die zu einer Stabilisierung und in der Folge Akkumulierung des Proteins im Zytoplasma und Kern führen. (Abbildung 7). *Beta-Catenin* Mutationen sind für eine Vielzahl von Tumorentitäten

beschrieben (beispielsweise in Ovarial- und Endometriumskarzinomen), aber noch nicht in Brustkrebsgewebe nachgewiesen worden. Für die Gene *CTNNA1* und *JUP* sind ebenfalls noch keine Mutationen in primärem Brustkrebsgewebe nachzuweisen gewesen (<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic>).

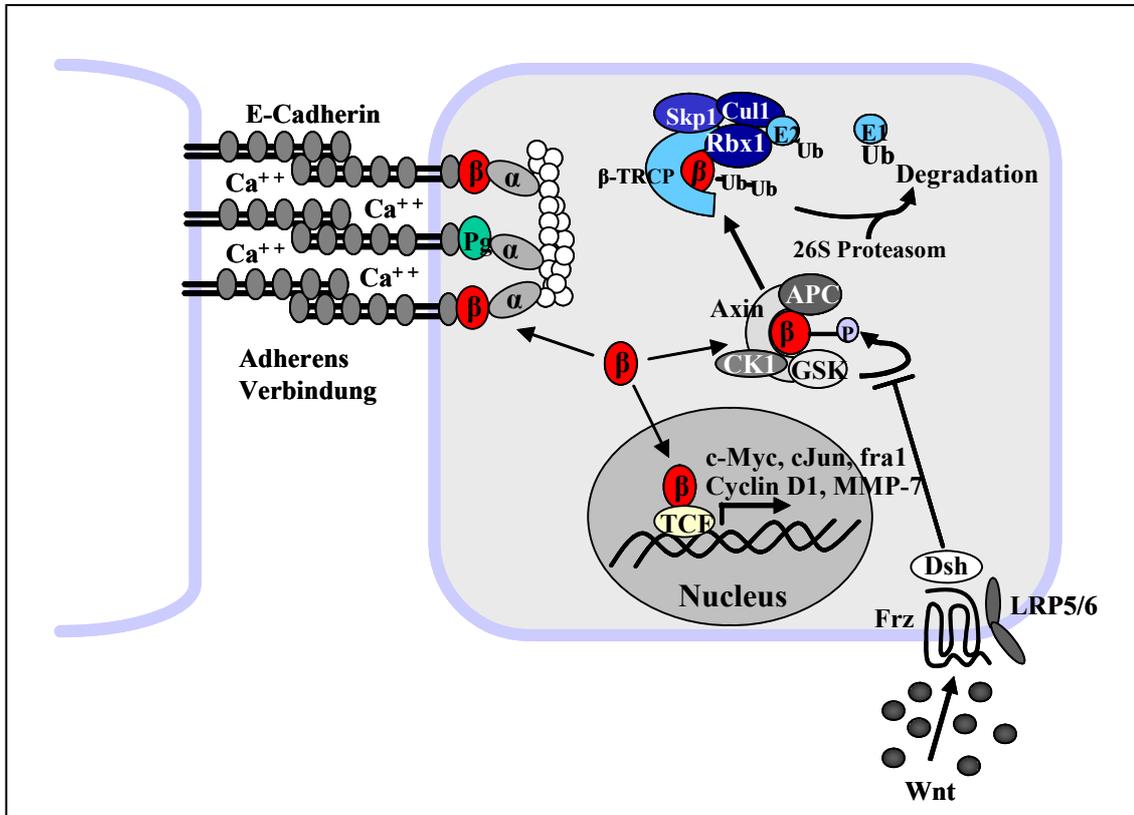


Abbildung 7 Die Doppelrolle von β -Catenin als Strukturkomponente im Aufbau von Zell-Zell Kontakten und als Cofaktor in der Regulation der Transkription spezifischer Gene nach Aktivierung des Wnt-Signalweges (modifiziert nach Nelson JM 2004 und Polakis P 2007)

β -Catenin (β) und Plakoglobin (Pg) binden den cytoplasmatischen Teil von E-Cadherin, α -Catenin stellt die Bindung zum Aktin-Zytoskelett her. Der resultierende Zell-Zell Kontakt wird als Adhärenzverbindung (engl. adherens junction, kurz AJ) bezeichnet. Bei inaktivem Wnt-Signalweg wird freies, zytosolisches β -Catenin in einem Komplex aus Glykogen-Synthase-Kinase (GSK), dem adenomatösen polyposis coli Gen (APC) und Axin gebunden und in der Folge durch die S/T-Kinasen GSK-3 β und Casein Kinase 1 phosphoryliert (P). Dieser Komplex rekrutiert β -TrCP, welches zusammen mit Skp1, Cull, Rbx1 und den Ubiquitinierungs-Komponenten E1 und E2 β -Catenin ubiquitiniert (Ub) und zur Degradation dem 26S-Proteasom zuführt. Die Bindung von Wnt an den Rezeptor Frizzled (Frz), in Assoziation mit einem Corezeptor LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5 oder 6), aktiviert den Wnt-Signalweg. In der Folge wird durch Aktivierung, des an der zytosolischen Plasmamembran lokalisierten Protein Dishevelled (Dsh) die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK inhibiert. Dadurch kommt es zur zytosomatischen Akkumulierung von β -Catenin und der Komplexbildung mit einander T cell factor (TCF) oder lymphoid enhancer factor (LEF). Dieser Komplex wandert in den Kern und führt zur Transaktivierung spezifischer Gene, wie den positiven Zellzyklus-Regulatoren c-Myc und Cyclin D1.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von dem molekularen Aufbau der Gürteldesmosomen und ihrer Rolle für die Aufrechterhaltung der Organarchitektur, entwickelte sich die Ausgangshypothese der vorliegenden Arbeit. Für Zytokeratin-positive Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen sollte untersucht werden, ob die Gene (*CDHI*, *CTNNA1*, *CTNNB1*, *JUP* und *APC*) von Allelverlusten betroffen sind. Der Nachweis von Deletionen sollte durch das Verfahren der Mikrosatellitenanalyse und PCR-RFLP (Genotypisierung) erfolgen. Zunächst galt es zu Beginn der Arbeit, die Methode der Allelverlustanalyse von Einzelzellen an einzelnen, normalen Zellen eines Kontrollkollektivs zu validieren. Für die Untersuchung von Zytokeratin-positiven Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen standen DNA-Proben eines Kollektivs zur Verfügung, die zuvor mit der Methode der comparativen, genomischen Hybridisierung (CGH) charakterisiert wurden (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). Die Allelverluste sollten durch Amplifikation polymorpher Marker und anschließender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) im direkten Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen mit den Zellen des Kontrollkollektivs ermittelt werden. In einem zweiten Schritt sollten die Patienten nach ihrem klinischen Stadium (M0 und M1 gemäß UICC) eingeteilt und die Ergebnisse mit dem Kontrollkollektiv, sowie die Gruppen untereinander analysiert werden. Ziel dieser Unterteilung war es, mögliche Deletionen zu identifizieren, die mit der Tumorprogression hin zu einem metastatischen Phänotyp assoziiert sind. Die Ergebnisse der CGH-Analysen erlaubten die Einteilung der Zytokeratin-positiven Zellen in die drei Gruppen A, B und C. Die Gruppe A umfasst hierbei ausschließlich Zellen, für die keine CGH-Veränderungen nachgewiesen wurden; Gruppe B und C umfassen Zellen mit CGH-Veränderungen; dabei enthält Gruppe B Zellen von Patienten im Stadium M0 und Gruppe C die Zellen von Patienten im klinischen Stadium M1. Ein besonderes Augenmerk sollte auf der Analyse der CGH-normalen Zellen (Gruppe A) liegen. Für diese Zellen fehlt bisher ein Nachweis ihres malignen Ursprungs. Die Allelverlustanalyse der CGH-normalen Cytokeratin-positiven Zellen sollte ihre Identität und Dignität klären.

2. Material

2.1 Geräte

In der linken Spalte sind Art und Name des Gerätes aufgeführt, in der rechten Spalte der Firmenname des Herstellers.

Micromanipulator	Microinjector 5242, Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMXA-RF8
Hybridisierungs-ofen	Shake `n` Stak, Hybaid
Zentrifuge	Hettich Rotixa/RP
Tischzentrifuge	Mikro 22, Hettich
MJ PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler PTC-200
PCR-Maschine	Stratagene
Zweikammer-Gel-System	Pequlab
UV-Transilluminator	INTAS
Sofortbildfilm TYP 667 (ASA 3000)	Polaroid
Spannungsquelle (Agarose-Gel)	EPS 200, Pharmacia Biotech
Spannungsquelle (PAGE)	2297 Macrodrive S, LKB Bromma
Thermocycler	MR 2000, Heidolph
Verticale Gelelektrophorese	peqLab
Horizontale Gelelektrophorese	GIBCO BRL, Life Technologies Inc.
Fluorimager	FluorImager SI Molecular Dynamics
Pipettierhilfe(Pipetboy)	Integra Biosciences
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
pH-Meter	WTW

2.2 Chemikalien

Agarose GTG Seakem	Biozym, Hess. Oldendorf
Acrylamid Stamm-Lsg	BioRad, München
Ammoniumpersulfat	Amersham Biosciences, Freiburg
ATP	Roche, Mannheim

Bind-Silan	Amersham Biosciences, Freiburg
BSA	Sigma, Deisenhofen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Bioscience
DNA-Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA Titriplex III	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Pharmacia
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Orange G	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Sigma, Deisenhofen
Repel-Silan	Amersham Biosciences, Freiburg
SyberGreen	Molecular Probes, Leiden Niederlande
SyberGold	Molecular Probes, Leiden Niederlande
TEMED	Amersham Biosciences, Freiburg
Xylen cyanol FF	Sigma, Deisenhofen

2.3 Lösungen und Puffer

10xTBE (pH 8,0):
0,89 M Tris base
0,89 M Borsäure
0,02 M EDTA

PBS (pH 7,4):
150 mM NaCl
3,0 mM KCl
8,0 mM Na₂HPO₄·2H₂O
1,5 mM KH₂PO₄

Erythrocyten-Lysepuffer (pH7,4):
156 mM NH₄CL
10,0 mM KHCO₃
0,1 mM EDTA

1xTBE:
10xTBE
zehnfach verdünnen

Pickpuffer (pH 8,5):

PBS
1 % Igepal

10-fach PCR Puffer:

100 mM Tris/HCl
500 mM KCl
100 mM MgCl₂

2.4 Enzyme und Antikörper

A45-B/B3	Micromet, München
Anti-Dig-AP F _{ab} (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
Anti-DIG-Flourescein	Roche, Mannheim
APAAP	Dako, Hamburg
Mse I 50 U/μl	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim
Polymerase Expand Long Template	Roche, Mannheim
Msp6I	New England Biolabs, Frankfurt
Alw2I	New England Biolabs, Frankfurt
Proteinase K	Roche, Mannheim
Taq Polymerase	Roche, Mannheim
MOPC21	Sigma, Deisenhofen
Z259-AK	Roche, Mannheim

2.5 Verbrauchsmaterialien

Falcon (10ml, 50ml)	Sarsted
Mikropipetten (P10, P20, P200, P1000)	Eppendorf
Pipetten	Gilson
Transferpipetten	Sarsted
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Brand
Reaktionsgefäße 200 μ	Thermo-Fast 96, Abgene

3. Methoden

3.1 Knochenmarksaufbereitung

Das Knochenmark wird zunächst in einem 50ml Falcon mit Hanks Salt Solution im Volumenverhältnis 1:1 gewaschen und anschliessend 10 min bei 850 Upm zentrifugiert um Anteile von Fett und Thrombozyten abzutrennen. Der Überstand wird verworfen und die resuspendierten Zellen in ein neues Tube mit bereits enthaltenen 7ml 50%iger Percoll-Lösung zugegeben. Nach 20min Zentrifugation bei 2050 Upm wird die entstandene Interphase vorsichtig abgenommen und in einem neuen Falcon-Gefäss mit PBS gewaschen. Anschliessend erneute Abzentrifugation für 10 min bei 1500 Upm. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 1-2 ml PBS aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer wird das Volumen der Zellsuspension soweit erhöht, bis eine Zelldichte von 1 Mio/ml Suspension erreicht wird. Im Anschluß wird je 0,5 ml der Suspension (ca. 500.000 Zellen) auf ein Haft-OT Feld aufgetragen. Nach Einer Stunde Sedimentation wird der Überstand abgekippt und die Haft-Ots über Nacht Luftgetrocknet.

3.2 Immunzytochemie

3.2.1 A45-APAAP-Färbung

In einem ersten Schritt werden die unspezifischen Bindungen durch Inkubation mit 10% AB-Serum/PBS für 20 min blockiert. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper A45 (Pancytokeratin) in einer Konzentration von 2 µg/ml für 45 min bei Raumtemperatur. Die Primär-Antikörper Lösung wurde mit 10% AB/PBS auf 1:100 verdünnt. Insgesamt wurden 250 µl verdünnte Primärantikörper Lösung auf ein Objektträgerfeld aufgetragen. Im Anschluss wird der Objektträger 3x für 3 Minuten mit 1xPBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem Brückenantikörper Z 259, 1:20 mit 10% AB/PBS verdünnt für 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneut 3x Waschen für jeweils 3 min mit 1x PBS, Inkubation mit dem APAAP-Komplex, 1:100 verdünnt mit 10% AB/PBS für 30 Minuten. Danach Waschen mit 1xPBS 3x für jeweils drei Minuten. Anschliessend erfolgt die Inkubation mit der Entwickler-Lösung für 10 Minuten. Als Färbesubstrat wurde BCIP/NBT verwendet.

Blockier-Lösung	
10%AB-Serum	1:10 mit 1xPBS verdünnt
Antikörper-Lösung	
A 45 (2µg/ml)	1:100 mit 10% ABS/PBS
MOPC 21 (2µg/ml)	1:500 mit 10% ABS/PBS
Entwickler-Lösung	
Colon-Reagent A	1:100 mit AP Puffer
Colon-Reagent B	1:100 mit AP Puffer
Blocking-Solution H	1:100 mit AP Puffer

3.2.2 MOPC 21-Färbung

Zur negativ Kontrolle wurde parallel ein MOPC 21 Antikörper gleichen Isotyps (IgG1), 1:500 mit 10% ABS verdünnt, in der Konzentration von 2µg/ml eingesetzt, welcher mit keinem humanen Epitop reagiert. Die Färbung wurde analog der unter 3.2.1., vorbeschriebenen APAAP-Färbung durchgeführt.

3.3 Isolierung der A 45-AK positiven Zellen

Die A 45-AK-positiven Zellen wurden mittels eines Mikromanipulators von den Objektträgern isoliert. Dazu wird der Objektträger unter einem Mikroskop fixiert und mit einer Lösung aus PBS und 0,5% Igepal überschichtet werden. Mit einer feinen Glaskapillare werden die gefärbten Zellen isoliert und in einen separates Objektträger-Feld mit PBS und 0,5% Igepal überführt. Nach Sedimentation wird die Zelle in ein 200 µl Reaktionsgefäß transferiert, in welches ein Mix mit Proteinase K vorgelegt wurde:

One For All Puffer (OFA)	2,0 µl
Tween (10%)	1,3 µl
Igepal (10%)	1,3 µl
Proteinase K /10mg/ml)	1,3 µl
H ₂ O	14 µl

Die anschließende Inkubation für 10 h bei 42 °C dient dem Abauen von zelleigenem Protein. Vor Durchführung der Einzelzell-PCR wird die Proteinase K durch 10 Minuten Inkubation bei 80 °C inaktiviert.

3.4 Einzelzell-PCR

In einem ersten Schritt wird die zelluläre DNS durch eine Endonuklease fragmentiert. Das dazu verwendete Enzym, Mse I, erkennt die Sequenz 5'-TTAA-3' und schneidet unter der Ausbildung eines Überhangs nach der ersten Thymidin-Base. Dem Reaktionsgefäß aus 3.3 wird dazu folgender Mix hinzugefügt:

One For All Puffer (OFA)	0,2 µl
Mse I (high conc.)	0,5 µl
H ₂ O	1,3 µl

Nach Inkubation von 3 h bei 37°C erfolgt die Inaktivierung der Endonuklease bei 65°C für 10 Minuten. Die durch das Enzym Mse I generierten 5'-TA-Überhänge werden im nächsten Schritt mit einem Adapter, bestehend aus den beiden Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11, ligiert. Bevor der Adapter hinzugefügt wird, müssen die beiden Oligonukleotide in einem separaten 200µl-Reaktionsgefäß zusammengefügt werden. Dies wird mit folgendem Ansatz erreicht:

One For All Puffer (OFA)	0,5 µl
LIB1 (Konz. 100µM)	0,5 µl
ddMse11 (Konz. 100µM)	0,5 µl
H ₂ O	1,5 µl

Das Gemisch wird über einen Gradienten (65°C bis 15°C für je 1 min pro Temperaturschritt) inkubiert. Die Inkubation erfolgt in einer MJ-PCR-Maschine. Die anschließende Ligation erfolgt über Nacht bei 15°C durch Zugabe des Adapters sowie von 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) und 1 µl ATP 10 mM in das Reaktionsgefäß aus 3.3 .

Nach der Ligation folgt der Schritt der globalen Amplifikation (primäre PCR) des Genoms der Zelle aus Schritt 3.3. Dazu werden dem Reaktionsgefäß folgender Mix beigefügt:

Expand-Long-Template Puffer 1	3,0 µl
dNTP's (Konz.10 mM)	2,0 µl
Expand-Long-Template PolMix (3,5 U/µl)	1,0 µl
H ₂ O	35,0 µl

Die PCR läuft auf einer MJ-PCR-Maschine und beginnt mit einer Inkubation von 3 Minuten bei 68°C. Während dieser Zeit findet eine Auffüllreaktion der 3' rezessiven Enden der DNS-Fragment-Adapter-Konstrukte statt, woraus in der Folge eine komplementäre LIB1-Primerbindungsstelle resultiert. Das vollständige PCR-Programm entspricht folgendem Algorithmus:

1 Zyklus	14 Zyklen	8 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus
	94°C 40 sec	94°C 40 sec	94°C 40 sec	
	57°C 30 sec	57°C 30 sec + 1°C/Zyklus	65°C 30 sec	
68°C 3 min	68°C 90 sec + 1 sec/Zyklus	68°C 105 sec + 1 sec/Zyklus	68°C 113 sec + 1 sec/Zyklus	68°C 220 sec

Die amplifizierte DNS der Zelle aus 3.3 liegt jetzt in einem Volumen von 50 µl gelöst vor und wird in der Folge als 'primäres PCR-Produkt' bezeichnet.

3.5 Kontroll-PCR

Einen Anhalt für die Vollständigkeit der primären PCR lässt sich durch den Nachweis spezifischer Mse I-Fragmente gewinnen. Im Anschluss an die globale Amplifikation des Einzelzell-Genoms wurde für jede Zelle zwei Kontroll-PCRs mit den Markern p53 Exon 2/3 und CK19 durchgeführt. Zeigte sich in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese die spezifische Bande für mindestens einen Marker, so wurde die

Zelle in die weiteren Analysen eingeschlossen. Der Reaktionsansatz für die Kontroll-PCR, welche auf einer MJ-PCR-Maschine durchgeführt wurde entspricht:

PCR Puffer (10mM MgCl ₂ , 100mM Tris pH 8,5, 500mM KCl) + dNTP's 1mM	1,0 µl
5'-Oligo 8mM	0,5 µl
3'-Oligo 8mM	0,5 µl
BSA	0,25 µl
Taq-Polymerase 5U/µl	0,1 µl
H ₂ O	7,75 µl

Für die beiden Marker galt die Anneling-Temperatur von 58°C. Das entsprechende PCR-Programm lautete:

1 Zyklus	15 Zyklen	24 Zyklen	1 Zyklus
94°C 2 min	94°C 15 sec	94°C 15 sec	94°C 15 sec
58°C 30 sec	58°C 30 sec	58°C 30 sec	58°C 30 sec
72°C 2 min	72°C 20 sec	72°C 30 sec	72°C 2 min

3.6 Agarose-Gelelektrophorese

In einem horizontalen Gelelektrophorese-System lassen sich die PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe auftrennen. Es wurden 1%-1.5%ige Agarose-Gele (1g-1.5g Agarose in 100ml 1xTBE) verwendet. Das Gemisch wird in einem Erlenmeir-Kolben (250 ml) erhitzt, bis die Suspension klar wird. Anschließend wird die Flüssigkeit in einem, mit entsprechenden Kämmen zur Formierung der Lauftaschen versehenen Gelkammer-Tray geladen und aushärten gelassen. Die PCR-Proben werden mit 1 µl Sybr-Gold und 2 µl Dye (0,3% Orange G, 25% Ficoll in TBE) versetzt und in die präformierten Geltaschen geladen. Das Elektrophorese-Netzgerät wird auf 160 V, 400 mA eingestellt und die Proben während 45 min aufgetrennt. Auf einem UV-Schirm werden die PCR-Produkte sichtbar gemacht und mittels einer CCD-Kamera digitalisiert.

3.7 Reamplifikation

Alle folgenden genomischen Analysen wurden mit einem Reamplifikat aus 0,5µl des ursprünglichen primären PCR-Productes durchgeführt. Der PCR-Ansatz zur Reamplifikation lautet wie folgt:

Expand-Long-Template Puffer 1	5,0 µl
LIB 1 (10µM)	5,0 µl
dNTP's (10mM)	1,75 µl
BSA	1,25 µl
Taq-Polymerase 5U/µl	0,5 µl
H ₂ O	36,5 µl

Nach Zusatz von 0,5 µl des Primären PCR-Produktes wurde die PCR auf einer MJ-PCR-Maschine mit folgendem Algorithmus durchgeführt:

1 Zyklus	8 Zyklen	19 Zyklen	1 Zyklus
94°C 2 min	94°C 50 sec	94°C 50 sec	94°C 50 sec
57°C 30 sec	57°C 30 sec	57°C 30 sec	57°C 30 sec
72°C 3 min	72°C 3 min	72°C 3 min + 20 sec/Zyklus	72°C 7 min

Zur Abschätzung der Vollständigkeit der Reamplifikation fanden die gleichen Kriterien wie unter 3.5 beschrieben Anwendung. Nur wenn mindestens eine Kontroll-PCR ein positives Ergebnis erbrachte (Abbildung 8), wurde die Zelle in die weiteren Analysen miteinbezogen.

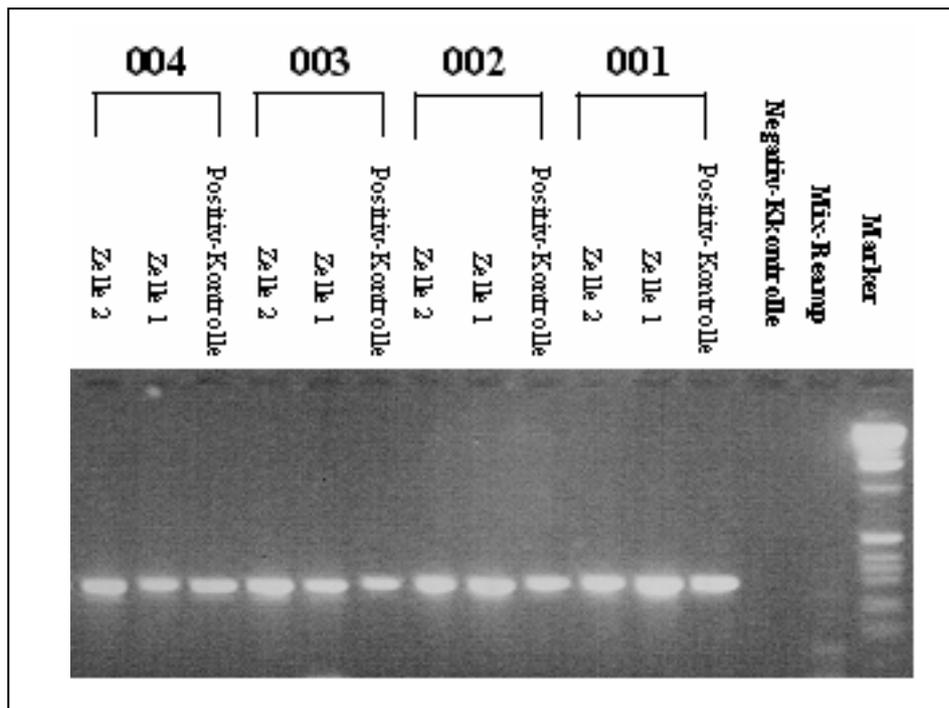


Abbildung 8 **Kontroll-PCR nach Reamplifikation für den Marker p53 Ex 2/3**

Agarose-Gel elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte für Kontroll-Marker p53 Exon 2/3 reamplifizierter Zellen der Kontrollpatienten 001-004 und den entsprechenden Positivkontrollen.

3.8 Generierung der Positivkontrollen (DNS-Extraktion)

Der Nachweis eines Allelverlustes einer Zelle in den folgenden LOH-Studien gelingt nur im Vergleich mit der korrespondierenden Positiv-kontrolle, welcher „gepoolter“ DNS entspricht. Dazu wird die DNS von ca. 10^6 mononukleären Zellen (aus dem Knochenmarks-Aspirat) isoliert, welche der Interphase nach Dichtegradientenzentrifugation aus 3.1 entstammten. Nach den immunzytochemischen Färbeschritten und Isolierung der A45-AK positiven Zellen, wie unter 3.2 und 3.3 beschrieben, werden die beiden zellhaltigen Felder des Objektträgers mit jeweils 160 μ l eines Proteinase K-haltigen Gemisches überschichtet. Die verwendeten Lösungen setzen sich in ihren Konzentrationen wie folgt zusammen:

Solution A	Solution B
100 mM KCl	10 mM Tris/HCL pH 8,3
10 mM Tris/HCL pH 8,3	2,5 mM MgCl ₂
2,5 mM MgCl ₂	1% Tween 20
	1% NP 40
	Proteinase K (Konz. 120 µg/ml)

Nach Anbringen der Abdeckschalen, welche zur Generierung von Zytospinpräparaten verwendet werden auf dem Objektträger, werden jeweils 80 µl von Solution A und Solution B auf ein zellhaltiges Feld aufgetragen und die Abdeckschale mit Parafilm verschlossen um die Verdunstung in der darauffolgenden Inkubation in einem Hybaid-Ofen bei 42°C für 12 h zu minimieren. Anschließend werden die Objektträger mit den Abdeckschalen bei 2000 Upm für 1 min abzentrifugiert und die Lösung von den Haft-OTs in ein separates 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. In einem nächsten Schritt erfolgt die Inaktivierung der Proteinase K bei 80°C für 10 Minuten in einem Heizblock. Nach Abzentrifugation mit 20.000 Upm für 30 min wird der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl 1xPBS eluiert. Es folgen die identischen Schritte der unter 3.4 beschriebenen Einzelzell-PCR mit 1µl der generierten Lösung. Das Gelingen der DNS-Extraktion wurde mit den unter 3.5 beschriebenen Kontroll PCR-Reaktionen bestätigt.

3.9 Auswahlkriterien für die verwendeten Marker

Wie einleitend ausgeführt, ist es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, in wieweit der Verlust genomischen Materials im Bereich von Genen, welche an dem Aufbau und der Regulation von Zell-Zell Kontakten beteiligt sind eine Rolle für die Disseminierung einzelner Tumorzellen spielt. Ausgehend von dieser Überlegung galt für die Auswahl der Marker, daß diese im Bereich der entsprechenden Gene (E-Cadherin, alpha-, beta-Catenin, Plakoglobin und APC) lokalisiert sind. Dazu wurden die allgemein zugänglichen Datenbanken des GDB <http://www.gdb.org>, und NIH <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview> verwendet. Die Primersequenzen des intragenetischen Markers für beta-Catenin wurde freundlicherweise von Frans van Roy (Departement for molecular biomedical research, Universität Gent, Belgien) für die Studie zur Verfügung gestellt.

In einem nächsten Schritt wurden die DNS-Sequenzen, welche die polymorphen Regionen enthalten auf evtl. Schnittstellen (T^vTAA) der in der Primären PCR verwendeten Endonuklease Mse I untersucht, um entsprechend die Lokalisation der 5'- und 3'-Oligonukleotid-Primer (16-26 Nukleotide) für die spezifischen PCR-Reaktionen zu wählen. Die Zusammensetzung der Oligonukleotide an Purin- und Pyrimidin-Basen wurde so gewählt, das rechnerisch [(Anzahl Cytedin + Guanin-Basen)x4 + (Anzahl Adenin + Thymin-Basen)x2 = theoretische Annealing-Temperatur] eine Annealing-Temperaturen zwischen 54 und 64 °C für die einzelnen Marker resultierte. Alle Oligonukleotide wurden von Metabion, München synthetisiert, in lyophilisierter Form versendet und zu einer Konzentration von 100µM in H₂O eluiert. Für die spezifischen PCR-Reaktionen wurden die Oligos in einer Konzentration von 8µM eingesetzt (Endkonzentration von 380nM in der PCR-Reaktion). Zur Bestimmung der Verwendbarkeit und Optimierung der Annealing-Temperatur der Marker wurden PCR-Reaktionen in einer Robocycler-PCR-Maschine (Statagene) für die Temperaturstufen 50°C -55°C - und 60°C getestet. Der Ansatz für die PCR-Reaktion entsprach dem unter 3.5 beschriebenen. Der Algorithmus des verwendeten PCR-Programmes lautete:

1 Zyklus	14 Zyklen	29 Zyklen	1 Zyklus
94°C 2 min	94°C 40 sec	94°C 40 sec	94°C 40 sec
50°C/55°C/60°C 30 sec	50°C/55°C/60°C 30 sec	50°C/55°C/60°C 30 sec	50°C/55°C/60°C 30 sec
72°C 2 min	72°C 20 sec	72°C 30 sec	72°C 2 min

Bei der Auswahl der Oligonukleotidprimer für die PAGE-Analysen wurde zudem aus handhabersichen Gründen darauf geachtet, daß die entsprechenden PCR-Produkte eine Gesamtlänge von 300bp nicht überschritten. In den meisten Fällen handelte es sich um Dinukleotid-Polymorphismen. Bei den beiden Markern rs42427 und D3S32 handelt es sich jeweils um einen Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP), welcher sich durch den Austausch einer Base im Bereich der Schnittstelle einer entsprechenden Endonuklease definiert. Die genomischen Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer können der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3 Oligo-Sequenzen

Marker	5'-Primer	3'-Primer
D16S3019	5'-CAACTCATTCCCTGTGTGAC-3'	5'-AACCAAGTGGGTTAGGTCAG-3'
D16S3095	5'-TCAGTTGGAAGATGAGTTGG-3'	5'-TATAGTTTGTGTCCCCCGAC-3'
D16S485	5'-AGTAATAATGTACCTGGTAAAC-3'	
D16S3066	5'-GCTGTTAATATGAAACAATTGCC-3'	5'-GGGGTCTAATGGTTCAGCC-3'
D16S3138	5'-GATTACAGGCATGAGCCACTG-3'	5'-TTAGAAATGTCTGCATGTATGAG-3'
D16S3040	5'-CTGCAACAAGAAAGATACTCC-3'	5'-AGTGCCTCACAGGCTGCC-3'
D16S511	5'-TGCTACATAAAGAGGGAGGC-3'	5'-CAGAGGCCTCATTCTTAACC-3'
D5S346	5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3'	5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'
rs42427	5'-CAAGGAAACCAAGTCAGCTGC-3'	5'-GCTTTATTGTTCATCCAATTGAC-3'
D5S299	5'-GCT ATTCTCTCAGGATCTTG-3'	5'-GTAAGCCAGGACAAGATGACAG-3'
D5S471	5'-GTTTTACACATTTTCCCAGC-3'	5'-GTTACAACAAATAGCAACAGC-3'
D5S592	5'-GTCAACAAAGTAATGTAAAGACAG-3'	5'-TGGAGTGGAGAGCTGCTCAG-3'
D5S615	5'-GGTAAACCCCTCAAGCAGTC-3'	5'-AACCAGTTTCTTATTATAAGCC-3'
D5S2117	5'-CCAGGTGAGAACCTAGTCAG-3'	5'-ACTGAGTCCCTCCAACCATGG-3'
D5S816	5'-TTGCCACTGAAAATCATATCC-3'	5'-CAGTGTCCCAGACTCAGAC-3'
D5S399	5'-ACGGAACCTTCAATTGACCTC-3'	5'-GCAGGCTGTGGCCTCAAC-3'
D5S500	5'-CACCTATTCGACCTAATGAC-3'	5'-TGAAGTCCTCTCCAACGTG-3'
D5S1360	5'-ACAAACAAAACCAAGAGTGC-3'	5'-TGGCTCATGTATCCCTATGT-3'
D3S3518	5'-TCTACAAGGCTCCTTTCGG-3'	5'-CATGGTTGATTTGTGCAGGG-3'
β-Cat	5'-TAGGTGGGTTACTGAAAGGAG-3'	5'-GAATAGATGGTTTGTACTAGG-3'
D3S3624	5'-CCAGTGGGATATGACTGCC-3'	5'-CTTACTACTGTTACTTCAGCC-3'
D3S32	5'-GTGTCCAGGGTTCTCCTAG-3'	5'-GCAGCCATGTGCTTCCTGC-3'
D3S1514	5'-GGCAACAGAGCAAGATGC-3'	5'-CAGCCAGCAGAATTATGA-3'
D17S800	5'-CTTATGGTCTCATCCATCAGG-3'	5'-GACAGAAAGATGGATAAGACAAG-3'
D17S1322	5'-CTAGCCTGGGCAACAAACGA-3'	5'-GCAGGAAGCAGGAATGGAAC-3'
D17S855	5'-GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG-3'	5'-ACACAGACTTGTCTACTGCC-3'
D17S1868	5'-TCAACTGAATTGAGGATGTCG-3'	5'-CCTAGGAGTCAAATTCAGCC-3'
D17S943	5'-CACGTTGGCTGCAATGCC-3'	5'-CTGTCTCATTCCAACCATCG-3'
D17S1161	5'-CAGTTAGCCAAGATAATGCC-3'	5'-CTCATAAGGGGATAAAGGAC-3'
p53 ex2/3	5'-GAAGCGTCTCATGCTGGATC-3'	5'-CAGCCCAACCCTGTCCCTTA-3'
LIB1	5'-AGTGGGATTCTGCTGTCAGT-3'	
ddMse11	5'-TAACTGACAG-dideoxy C-3'	
D3S1540	5'-AAAGGGGGCTAGAATGAGAG-3'	5'-CCAGACTTTGGGGTCAACTAG-3'
D3S1581	5'-CCAGTCCTGACAGAACTGC-3'	5'-CTAATGGCTATAAACCCAGG-3'
D3S1100	5'-GGTTTCATATAACCATCAATCC-3'	5'-GTACACCATCATGAGGAGTC-3'
D3S1497	5'-TGTTTACCCTCACACCTCC-3'	5'-GAATTATGCCAGCAAACCTG-3'
D3S1568	5'-GCTAACCCTTGGCTTTGCTG-3'	5'-GAGAACCAGCAAGTTCATCAG-3'
D3S643	5'-CATGATTGCACTATGTGCTCC-3'	5'-CCACCCGATTCTTCTGGCC-3'
D3S663	5'-CTGGCTCTGTGAGGGACC-3'	5'-CAGTCACAGGCAGGTGGC-3'
D3S1210	5'-GGCTATTTTGCAACTTACTCG-3'	5'-GGCAATATGAAATGAAATACAGG-3'
D3S1542	5'-GACAAACACCTGTGGTCC-3'	5'-ATTGCAGTAGCTGAACTATC-3'
D3S3722	5'-GTACATAGGCATACGTGCGC-3'	5'-CTTGCTCAGCCAGGGAACC-3'
D3S3721	5'-GAAACCTCCTGACCATCTG-3'	5'-GGCAAATACAAGTCCCAGGG-3'
D3S3472	5'-CCTCCTGTCTGTCTGTC-3'	5'-CCAAAGAGGAAGGCAAGCC-3'
D3S3593	5'-CTCCACCATCTTGGCTGG-3'	5'-GGTCGAGATAGAGAGGGC-3'

Fortsetzung Tabelle 3

Marker	5'-Primer	3'-Primer
alpha-cat	5'-GTGTCCAAATGGGACGACAG-3'	5'-CCTGGATCCTGCCTCAGC-3'
D5S1983	5'-GGGTTTGTACTTGTCTGGC-3'	5'-CTACATTTGGGATAGCAGG-3'
D5S479	5'-GAACTGGGATCTTGCCACTG-3'	5'-GGAAAAATTTACTCTTGCAATC-3'
D5S415	5'-AGCTGCTAAACTCCTTAGC-3'	5'-GCTAAATGAATGGGGTACAGG-3'
D5S2049	5'-CTGGCACACAGAAAATGCC-3'	5'-CCCAGGCTGACAACGGC-3'
D5S2014	5'-CCAGCAGCATTCTCTACCC-3'	5'-CTACATTATTATTATTGTGTGTCCG-3'
D5S671	5'-GGAATGGGTGGGCATCTCC-3'	5'-GCTGTGAGACAAAAAATTGCAC-3'
D5S2001	5'-GCTTGGAAACAAGAGTGG-3'	5'-CGTGTGAGCCTCACCCAG-3'
D5S487	5'-CAATTTTCTGAATGACTATTTTCC-3'	5'-CTGGCCTTGAAAATTAGACC-3'
D5S2011	5'-GCTTGGAAACAAGAGTGG-3'	5'-CGTGTGAGCCTCACCCAG-3'
D16S310	5'-GGCAGAGGTTGCAGTGAGC-3'	5'-CCGTCATTCTCTCTCTCCA-3'
D5S1384	5'-AACAGTAGCAAAGACAAAGTGC-3'	5'-CATCCATTACCTACCTATATGC-3'
D5S594	5'-CTCCAGCCTGGGTGACAG-3'	5'-CAGACATGGGCAGGTTACAG-3'
D5S178	5'-GAGAGTCGATTTACATAAGCTG-3'	5'-TCAGGAGGCCGTTTGCCAG-3'
D16S492	5'-CTCCTGTGAGTAGCGACAG-3'	5'-CAGTCAGTATTTGACACCAGG-3'
D16S3140	5'-GTCTCCCTTTGACTAACTGG-3'	5'-GATGAATACATTTGCTTCTGG-3'
D16S505	5'-GGCCCTAAATCCAGTGCTG-3'	5'-CTGCCTCCATACGTGGAGG-3'
D16S3051	5'-GGTGGTGTGCGTGTGCG-3'	5'-CCACATATGCCAGCCTGGG-3'
D16S681	5'-GGTGACAGAGTGAGACCC-3'	5'-CTTTGGTCTATTTGGCGCC-3'
D16S3053	5'-ACTAGATAATCTCAGTTGACC-3'	5'-GTTTGGCGCAGGGTATCACC-3'
D16S526	5'-GGGCAACAAGGAGAGACT-3'	5'-TTGATGGGGAATAGAAAAGCC-3'
D16S3050	5'-CTTCGTCTAGAAGGCCTGCG-3'	5'-CAACTCCATTTGCAAAGTGG-3'
D16S490	5'-TGACTGAATCCTAGTCTG-3'	5'-AAAATAAACAGAGGATAGG-3'
D16S3145	5'-GTCTCTCTGAGTGTCCGC--3'	5'-AGAGAGGGGGAAAGTCCC-3'
D16S3116	5'-TGGCCCATGCCTATAATC-3'	5'-AGGTGTGCACTACTATGCC-3'
D16S672	5'-TGCAGAGAGCTGAATCAAGC-3'	5'-ATTCAGCAGGTCTGGGGTG-3'
D16S3131	5'-GGATGGTTACCCATGATGG-3'	5'-CAGACTGCTTCCATCTTGC-3'
D16S3100	5'-GTGCTTTTGCCTGGATGC-3'	5'-GCCTGAGCAGTAGTCAGC-3'
D16S769	5'-GCCTGAGCAGTAGTCAGC-3'	5'-CGCAATAGCATTCAAAGTAGG-3'
D16S3116	5'-TGGCCCATGCCTATAAT-3'	5'-GAACTACTATGCCAGCTAA-3'
ecadex13	5'-CCCAAGAATCTATCATTTTGAAGC-3'	5'-ACACGCTGACCTCTAAGGTG-3'
D17S917	5'-GGTGTAGGTCTTCTATTCCC-3'	5'-AGGAATGACTAGAAGTGTGAC-3'
D17S1827	5'-AGTGGAGATTGCXACCATTGC-3'	5'-GATTGGCATTGGGAGAAGGG-3'
D17S1851	5'-CTCATCTCAGTCCCTGCCC-3'	5'-CGCCACTGCACTCCAGCC-3'
D17S966	5'-TGCCACTGCACTCCAGCC-3'	5'-CAAAGAGCAGGTGGTGGGC-3'
D17S932	5'-GCTAAAAATACACGGATGGCC-3'	5'-GCGACAGTGCAAGACTGCG-3'
D17S907	5'-CCACTGCACTCCAACGTGG-3'	5'-TCCCAGTCCATAAGAGGCG-3'
D17S846	5'-GTTGCAGATTTCTCAATACAG-3'	5'-AGCACAGGTCGTCGAGGCTGC-3'

Die in der Studie verwendeten Marker, ihre chromosomale Lokalisation, die Länge zwischen den zwei MseI-Schnittstellen, die sie einschliessenden Polymorphismen, die für die spezifische PCR notwendige Annealing-Temperatur und die resultierende PCR-Produkt Grösse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Lokalisation der Gene und Marker, sowie die Markercharakteristika

	Marker und Gene ^a	Lokalisation (bp) ^a	Mse-Fragment-Länge (bp)	Polymorphismus	Annealing-Temp.(°C)	PCR-Produkt (bp)	
Chromosom 16	D16S3019	64686681	605	dinukleotid-	50-55	245	
	E-Cadherin (CDH1)	67328696-67426945					
	D16S3095	68503731	520	dinukleotid-	50-55	164	
	D16S485	70292497	179	tetranukleotid-	50-55	150	
	D16S3066	71887336	565	dinukleotid-	50-55	198	
	D16S3138	76161268	559	dinukleotid-	53	170	
	D16S3040	78209120	302	dinukleotid-	50	146	
	D16S511	80258795	450	dinukleotid-	50-55	198	
	D5S299	101675106	550	dinukleotid-	50-55	170	
	Chromosom 5	rs42427 (intragenetisch von APC V)	112204224	618	RFLP	50-55	330
APC V		112101483-112209835					
D5S346		112241523	350	dinukleotid-	50	110	
D5S471		119076934	188	dinukleotid-	50-60	136	
D5S592		119129568	365	tetranukleotid-	50-60	186	
D5S615		125191192	641	tetranukleotid-	50	265	
D5S2117		133065027	1376	dinukleotid-	50-60	140	
D5S816		135329409	307	tetranukleotid-	55	170	
D5S399		135991437	657	dinukleotid-	50-60	178	
D5S500		137874849	157	dinukleotid-	50-55	134	
α-Catenin (CTNNA1)		138117006-138298622					
D5S1360		144877829	515	dinukleotid-	55	130	
D3S3518		33662359	322	dinukleotid-	50	190	
Chromosom 3		β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron 7)	41231926	253	dinukleotid-	50	130
		β-Catenin (CTNNB1)	41216004-41256938				
		D3S3624	44588821	375	dinukleotid-	55	168
	D3S32	46515925	394	RFLP	55-60	300	
	D3S1514	58193152	1145	tetranukleotid-	60	212	
	D17S800	36309949	333	dinukleotid-	55	140	
Chromosom 17	Plakoglobin (JUP)	37164390-37196475					
	D17S855 (BRCA1 Intron 20)	38458270	594	dinukleotid-	60	150	
	D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	38468875	1034	trinukleotid-	55	130	
	D17S1868	44539852	402	dinukleotid-	55-60	136	
	D17S943	45195357	260	dinukleotid-	55	176	
	D17S1161	53686418	316	tetranukleotid-	50-55	200	

^a Die Marker und Gene sind gemäß der chromosomalen Lokalisation in bp aufgeführt. Grundlage ist die humane DNA-Sequenz NCBI Build 35.1 (August 2004; online zugänglich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.10 Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)

Zur Identifizierung der Informativität und Beurteilung, ob ein Allelverlust für einen informativen Marker vorliegt oder nicht, wurden die PCR-Produkte der Mikrosatelliten-Marker über ein 7%iges Polyacrylamidgel in einem vertikalen Elektrophorese System der Grösse nach aufgetrennt. Je kleiner das PCR-Produkt ,beziehungsweise ein Allel ist, desto schneller durchwandert es das Gel entlang eines elektrischen Gradienten. In einem ersten Schritt werden die beiden Glasplatten im Format 30x20 cm und 23x20 cm mit 80% Ethanol gereinigt. Im Anschluss wird die grössere der beiden Platten auf der geltragenden Seite mit einer Binde-silane-enthaltenden Lösung (500µl) fein beschichtet. Die Binde-Silan Lsg. setzt sich wie folgt zusammen:

Ethanol 100%	50ml
Binde-Silane	188 µl
Acetat	5,6ml

Die zweite Glasplatte wird von einer Seite mit 500µl einer Repell-Silane beschichtet. Die beiden Glasplatten werden mit den beschichteten Seiten nach Innen gewandt, durch seitlich eingelegte Spacer am direkten Kontakt gehindert und mit von Aussen angebrachten Klammern zusammengefügt und fixiert. Im nächsten Schritt wird die 7%-ige Polyacrylamid-Lösung bereitet. Dazu werden 25ml einer Gel-Stammlösung, 250µl Ammoniumpersulfat und 20µl TEMED in einem Glasbehälter zusammengegeben und vermischt. Die Gel-Stammlösung setzt sich wie folgt zusammen:

Acrylamid-Lösung 30%	116,5 ml
Formamid 100%	160,0 ml
Urea (ultra rein)	168,0 g
5xTBE	100,0 ml

Die mit Ammoniumpersulfat und TEMED versetzte Gel-Stammlösung wird mit einer 20ml-Spritze zwischen die beiden fixierten Glasplatten gleichmässig verteilt. Ein 36-zähliger Kamm wird zur Präformierung der Proben-Taschen an der Oberseite, zwischen die Glasplatten eingelegt. Das Gel polymerisiert binnen 60 Minuten aus. Anschließend

werden die Glasplatten in einem vertikalen Elektrophorese-System fixiert, deren obere und untere Kammer mit 1xTBE als Laufpuffer gefüllt werden. Der Kamm wird entfernt und die Proben-Taschen (ca. 10µl Fassungs-Volumen) mit 1xTBE gespült. In einem nächsten Schritt werden die Proben präpariert. 10µl PCR-Produkt der spezifischen PCR werden im Volumenb 1:1 mit dem Laufpuffer versetzt, bei 94°C für 5 Minuten in einem vorgeheizten MJ-PCR-Block einzelsträngig gemacht und anschließend auf Eis gestellt. Der verwendete Laufpuffer setzt sich wie folgt zusammen:

Formamid 100%	5,0 ml
EDTA 0,5 M	100 µl
Laufpuffer Stamm-Lsg.	250 µl

Laufpuffer Stamm-Lsg.	
Bromphenolblau	10 mg
Xylencyanol	10 mg
H ₂ O	1,0 ml

Die Taschen werden vorsichtig mit den Proben beladen und das Gel zwischen den beiden Elektrophorese-Kammern auf 1500 Volt Spannung, ausgehend von einem Macrodrive-Spannungswandler genommen. Die Laufzeit des Gels ist Abhängig von der Länge des PCR-Produktes und beträgt für ca. 130 bp grosse Proben ca. 45 Minuten, während Proben von 240 bp grösse bis zu 150 Minuten Laufzeit benötigen. Nach entsprechender Laufzeit wird die mit Repell-Silane beschichtete Glasplatte entfernt und das Gel mit 10 ml einer Entwickler-Lösung (10ml 1xTBE + 2,0 µl Sybre Green[®]) für mindestens 10 Minuten unter abgedunkelten Bedingungen inkubiert. Die Digitalisierung und Visualisierung der aufgetrennten DNA-Banden erfolgte mittels eines Flourimagers (SI Molecular Dynamics).

3.11 Mikrosatelliten spezifische PCR

Als spezifische PCR werden in der vorliegenden Arbeit die PCR-Reaktionen mit den in der Tabelle 8 aufgeführten Markern bezeichnet. Darin sind sowohl die Marker für Mikrosatelliten, als auch für die beiden RFLPs enthalten. Für die PCR-Reaktionen gilt derselbe Ansatz, wie für die unter 3.5 beschriebenen Kontroll-PCRs:

PCR Puffer (10mM MgCl ₂ , 100mM Tris pH 8,5, 500mM KCl) + dNTP's 1mM	1,0 µl
5'-Oligo	0,5 µl
3'-Oligo	0,5 µl
BSA	0,25 µl
Taq-Polymerase 5U/µl	0,1 µl
H ₂ O	7,75 µl

In ein 200 µl-Reaktionsgefäss werden 9,5 µl des Mixes vorgelegt und 1 µl Template zugegeben. Die anschliessende PCR-Reaktion wurde mit einer Robocycler-PCR-Maschine durchgeführt. Das PCR-Programm entsprach folgendem Algorithmus:

1 Zyklus	14 Zyklen	29 Zyklen	1 Zyklus
94°C 2 min	94°C 40 sec	94°C 40 sec	94°C 40 sec
Annealing Temperatur 30 sec	Annealing Temperatur 30 sec	Annealing Temperatur 30 sec	Annealing Temperatur 30 sec
72°C 2 min	72°C 20 sec	72°C 30 sec	72°C 2 min

Die Annealing-Temperatur der Reaktion ist abhängig von dem verwendeten Marker und ist Tabelle 3.-1 zu entnehmen.

3.12 Enzym-Verdau der Restriction-Fragment-Längenpolymorphismen

Bei den Restriktions-Fragment Längen Polymorphismen macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass einzelne Basen innerhalb einer Schnittstelle eines Restriktionsenzymes (Endonuklease) einer hohen Mutationsrate unterliegen, so dass nach Verdau der spezifischen PCR-Produkte der Marker rs42427 und D3S32 und Auftrennung der Fragmente in einem 2%-igen Agarose Gel drei Mögliche Ergebnisse für die

Positivkontrolle eines Patienten denkbar sind: i) sowohl das maternale, als auch das paternale Allel werden von dem Enzym in zwei Fragmente geschnitten. Es resultieren in diesem Fall zwei Banden unterschiedlicher Länge, welche in der Summe die Länge des ungeschnittenen PCR-Produkts ergeben würden, ii) nur ein Allel wird von dem Enzym geschnitten. Demnach werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung drei Banden sichtbar: Eine grosse Bande entsprechend dem Ungeschnittenen Allel, und das in die zwei kürzeren Fragmente geschnittene zweite Allel. In diesem Fall lassen sich die Allele diskriminieren und der Patient wird als informativ hinsichtlich des Markers beurteilt, iii) keines der Allele wird von dem Enzym geschnitten. Es resultiert nach gelelektrophoretischer Auftrennung nur eine einzelne Bande, so dass sich, wie im Falle von a) keine Aussage über einen etwaigen Allelverlust machen liesse. Für den Verdau des PCR-Produkts des Markers rs42427 wird das Enzym Alw2I verwendet. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 330 bp und wird bei intakter Schnittstelle von dem Enzym in zwei Fragmente von 220 pb und 110 bp geschnitten. Der PCR-Ansatz und die spezifische PCR-Reaktion für die Marker rs42427 und D3S32 erfolgt analog den Ausführungen in Abschnitt 3.11. Der Enzym-Verdau wird in einem separaten Reaktionsgefäss durchgeführt. Für den Marker rs42427 werden in einem 2ml-Tube folgender Mix vorgelegt:

Alw2I-Verdau	
H ₂ O	20,5 µl
Reaktions-Puffer (vom Hersteller mitgeliefert)	3,0 µl
Enzym	1,5 µl

Nach Zugabe von 5 µl des PCR-Produktes wird das Gemisch in einem Heitzblock oder Wasserbad bei 37°C für 3 h inkubiert. Die Proben werden anschließend mit 5 µl Dye und 2 µl Sybr Gold[®] versetzt und Agarosegel-elektrophoretisch wie unter 3.6 beschrieben aufgetrennt. Für den Verdau des PCR-Produktes des Markers D3S32 wird das Restriktionsenzym Csp6I verwendet. Der Enzym-Verdau wird in einem separaten 2 ml-Reaktionsgefäss durchgeführt in welches folgender Mix vorgelegt wird:

Csp6I-Verdau	
H ₂ O	38,5 µl
Reaktions-Puffer (vom Hersteller mitgeliefert)	5,0 µl
Enzym	1,5 µl

Nach Zugabe von 5 µl des PCR-Produktes wird das Gemisch in einem Hitzeblock bei ebenfalls 37°C für 3 h inkubiert. Den Proben werden anschliessend 5 µl Dye und 2 µl Sybr Gold[®] beigemischt und Agarosegel-elektrophoretisch wie unter 3.6 beschrieben aufgetrennt.

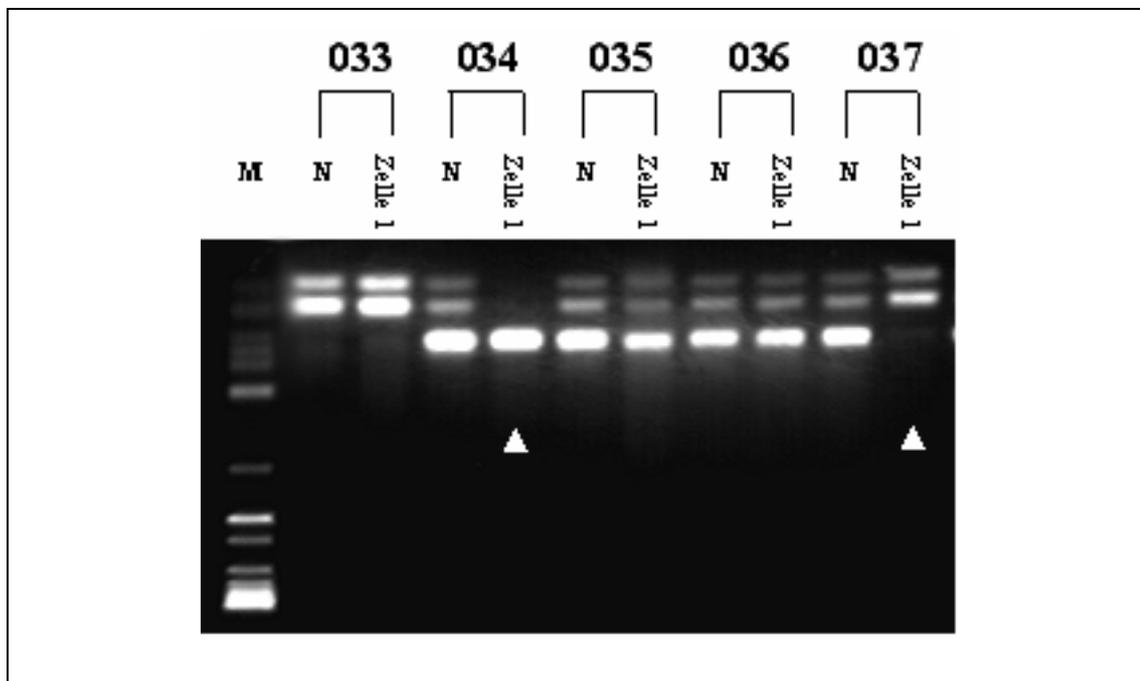


Abbildung 9 Agarose-Gel Elektrophorese des Markers D3S32 nach Csp6I-Verdau, 3h bei 37 Grad Celsius für Zytokeratin-positive Zellen. (Die Pfeile makieren die Zellen mit Allelverlust).

3.13 Klinikopathologische Charakteristika der Patienten

Tabelle 5 Klinische und pathologische Charakteristika der Patienten

Die Patienten 001 bis 020 sind ausschließlich im Kontrollkollektiv enthalten.

Die Abkürzung NA bedeutet nicht erhältlich, Ca steht für Karzinom, IDC für invasiv ductales Karzinom, ILC für invasiv lobuläres Karzinom.

Patienten	Tumor-Typ	Histologie	pT	pN	M	G	Östrogen-R	Progesteron-R	Her2/neu	Stadium (AJCC)
001	colon carcinoma					3				
002	esophageal carcinoma	SCC	3	1	0	3				
003	pancreatic carcinoma	Adeno-Ca	c4		0	2				
004	esophageal carcinoma	SCC	3	1	0	3				
005	NA	NA	NA	NA	NA	NA				
006	gastric carcinoma	Adeno-Ca	2	1	0	3				
007	lung carcinoma	SCC	2	2	0	2				
008	Papillen-Ca	Adeno-Ca	2	0	0	2				
009	Cardia-Ca	Adeno-Ca	2	1	0	2				
010	pancreatic carcinoma	Adeno-Ca	4	1	1	3				
011	colorectal carcinoma	Adeno-Ca			1	2				
012	rectum carcinoma	Adeno-Ca	2	0	0	2				
013	colon carcinoma	Adeno-Ca	1	0	0					
014	rectum carcinoma	Adeno-Ca	3	0	0	2				
015	colon carcinoma	Adeno-Ca	3	2	1	2				
016	CUP	NA	NA	NA	NA	NA				
017	NA	NA	NA	NA	NA	NA				
018	NA	NA	NA	NA	NA	NA				
019	NA	NA	NA	NA	NA	NA				
020	NA	NA	NA	NA	NA	NA				
021	MC	IDC	3	1biii	1	3	negativ	negativ	positiv	IV
022	MC	NA	NA	NA	1	NA	positiv	positiv	negativ	IV
023	MC	IDC	y0	y0	0	0	negativ	negativ	NA	NA
024	MC	IDC	2	1a	0	3	positiv	positiv	negativ	II B
025	MC	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA
026	MC	IDC	1c	0	0	2	positiv	positiv	positiv	I
027	MC	IDC	1c	0	0	2	positiv	positiv	negativ	I
028	MC	IDC	1c	0	0	2	NA	NA	NA	I
029	MC	IDC	3	0	0	3	NA	NA	NA	II B
030	MC	IDC	2	1b	0	2	NA	NA	NA	II B
031	MC	Adeno-Ca	NA	1bix	0	NA	NA	NA	NA	NA
032	MC	IDC	2	1b	0	2	NA	NA	NA	II B
033	MC	IDC	2	1b	0	3	negativ	negativ	negativ	II B
034	MC	ILC	2	2	0	2	positiv	negativ	negativ	III A
035	MC	IDC	2	0	0	3	NA	NA	NA	II A

Fortsetzung Tabelle 5

Patienten	Tumor-Typ	Histologie	pT	pN	M	G	Östrogen-R	Progesteron-R	Her2/neu	Stadium (AJCC)
036	MC	NA	y3	y1	0	1	NA	NA	NA	III A
037	MC	ILC	2	0	0	1	pos	negativ	NA	II A
038	MC	ILC	y2	y0	0	3	pos	positiv	NA	II A
039	MC	IDC	1b	1	1	2	positiv	positiv	NA	IV
040	MC	IDC	1	0	0	1	positiv	positiv	positiv	I
041	MC	IDC	2	1bi	0	2	positiv	positiv	positiv	II B
042	MC	IDC	1c	0	0	2	negativ	negativ	positiv	I
043	MC	IDC		0	0		positiv	positiv	negativ	NA
044	MC	IDC	1b	0	0	1	negativ	positiv	positiv	I
045	MC	IDC	1b	0	0	2	positiv	positiv	negativ	I
046	MC	IDC	1c	1	1	2	NA	NA	NA	IV
047	MC	ILC	2	0	0	2	positiv	positiv	positiv	II A
048	MC	IDC	2	0	0	2	positiv	positiv	positiv	II A
049	MC	IDC	2	1	0	2	positiv	positiv	NA	II B
050	MC	ILC	2	1biii	0	2	negativ	negativ	negativ	II B
051	MC	IDC		1b	0	3	positiv	positiv	positiv	NA
052	MC	IDC	1c	1	0	2	positiv	positiv	NA	II A
053	MC	IDC	2	0	0	3	positiv	positiv	positiv	II A
054	MC	IDC	1a	0	0	2	positiv	positiv	NA	I
055	MC	IDC	1c	0	0	3	negativ	negativ	NA	I
056	MC	IDC	1	0	0	2	positiv	positiv	negativ	I
057	MC	IDC	1by	x	0	3	negativ	negativ	NA	NA
058	MC	ILC	1bm	0	0	2	negativ	negativ	negativ	I
059	MC	ILC	2	1biii	0	2	positiv	negativ	negativ	II B
060	MC	IDC	2	1b	0	2	positiv	positiv	NA	II B
061	MC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	IV
062	MC	ILC	2	2	1	NA	positiv	positiv	NA	IV
063	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	IV
064	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	IV
065	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	IV
066	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	IV
067	MC	NA	2	1	1	2	NA	NA	NA	IV
068	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	IV
069	MC	IDC	1	1	1	NA	NA	NA	NA	IV
070	MC	NA	2	1	1	2	NA	NA	NA	IV

Tabelle 6 bietet eine Zusammenfassung der klinischen und histopathologischen Charakteristika des in der vorgelegten Arbeit analysierten Patientenkollektivs.

Tabelle 6 Zusammenfassung der klinischen Patientendaten und den histopathologischen Charakteristika

	Anzahl Patienten	Anzahl Zellen
Stadium (AJCC)		
I	10	14
II A	4	9
II B	11	18
III A	2	3
III B	1	1
IV	12	41
nicht erhältlich	10	15
T-Status		
T 1	13	19
T 2	15	25
T 3	3	12
T 4	2	4
nicht erhältlich	17	41
N-Status		
N = 0	17	23
N >= 1	20	39
nicht erhältlich	13	39
M-Status		
M 0	38	60
M 1	12	41
z.ZP der Punktion M0	35	52
z.ZP der Punktion M1	15	49
Histologie		
duktal	29	46
lobulär	11	16
andere/ nicht erhältlich	10	39
Grading		
G 1	2	3
G 2	23	36
G 3	7	20
nicht erhältlich	18	42
Östrogen-Rezeptor		
positiv	23	34
negativ	10	26
nicht erhältlich	17	41
EGF-Rezeptor (Her2/Neu)		
positiv	11	26
negativ	12	20
nicht erhältlich	27	55

3.14 Kooperationspartner

Klinik

Dr. Angela Daskalakis	Zentralklinikum Augsburg Medizinische Klinik II 86156 Augsburg
PD Dr. Andre Ahr	Universitäts Frauenklinik Frankfurt 60 590 Frankfurt
Dr. Detlev Harich	Klinik Bad Trissl 83080 Oberaudorf

Pathologie

Prof. Dr. Hans Arnholdt	Zentralklinikum Augsburg Institut für Pathologie 86156 Augsburg
Prof. Dr. Joachim Diebold	Institut für Pathologie Ludwig-Maximilians-Universität 80337 München

3.15 Statistik

Zum Vergleich der Allelverlusthäufigkeit eines Marker zwischen zwei Gruppen wurde der Chi-quadrat Test, im Falle kleiner Anzahlen der Fisher`s exakt Test angewandt. Die errechneten P-Werte wurden anschließend korrigiert für multiples Testen mittels der Benjamini- Hochberg Kalkulation (False discovery rate). Für den Vergleich von Mittelwerten zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney Rangsummen Test verwendet. Die P-Werte wurden mit der Software SigmaStat 3.0 errechnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für einen P-Wert $< 0,05$ angenommen. Die Diagramme wurden mit der Graphpad Prism 4.0 Software erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Erweiterung des Kontrollzellkollektivs

In der vorliegenden Arbeit wurden 54 Zytokeratin-negativen Kontrollzellen von 22 Patienten genotypisiert. Das genetische Material für 35 der 54 Kontrollzellen wurde von M. Petronio für die Studie zur Verfügung gestellt und entstammt von Patienten mit überwiegend gastrointestinalen Tumoren., das Material der 4 Kontrollzellen von Patient 016 von O. Schmidt-Kittler (beide zum damaligen Zeitpunkt Mitarbeiter der AG Klein , Institut für Immunologie, LMU München). Zur Erweiterung des Kontrollzellkollektivs auf 54 Zellen wurden zusätzlich 17 Einzelzellen der Patienten 017-020 von einem Haft-Objektträger isoliert und das Einzelzellgenom durch das primäre PCR-Verfahren und anschließender Reamplifikation amplifiziert. Die korrespondierenden Positiv-Kontrollen wurden in analoger Weise angefertigt mit dem Unterschied, daß 1µl gepoolter DNA, im Gegensatz zur Einzelzell-DNA als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Die gepoolte DNA wurde von einem Haft-Objektträger der Patienten in der in Kapitel 3.8 beschriebenen Weise generiert. Die Reamplifikate wurden anschließend mit einer Kontroll-PCR auf p53Exon2/3 (Abb. 10) oder den Cytokeratin 19 Locus getestet.

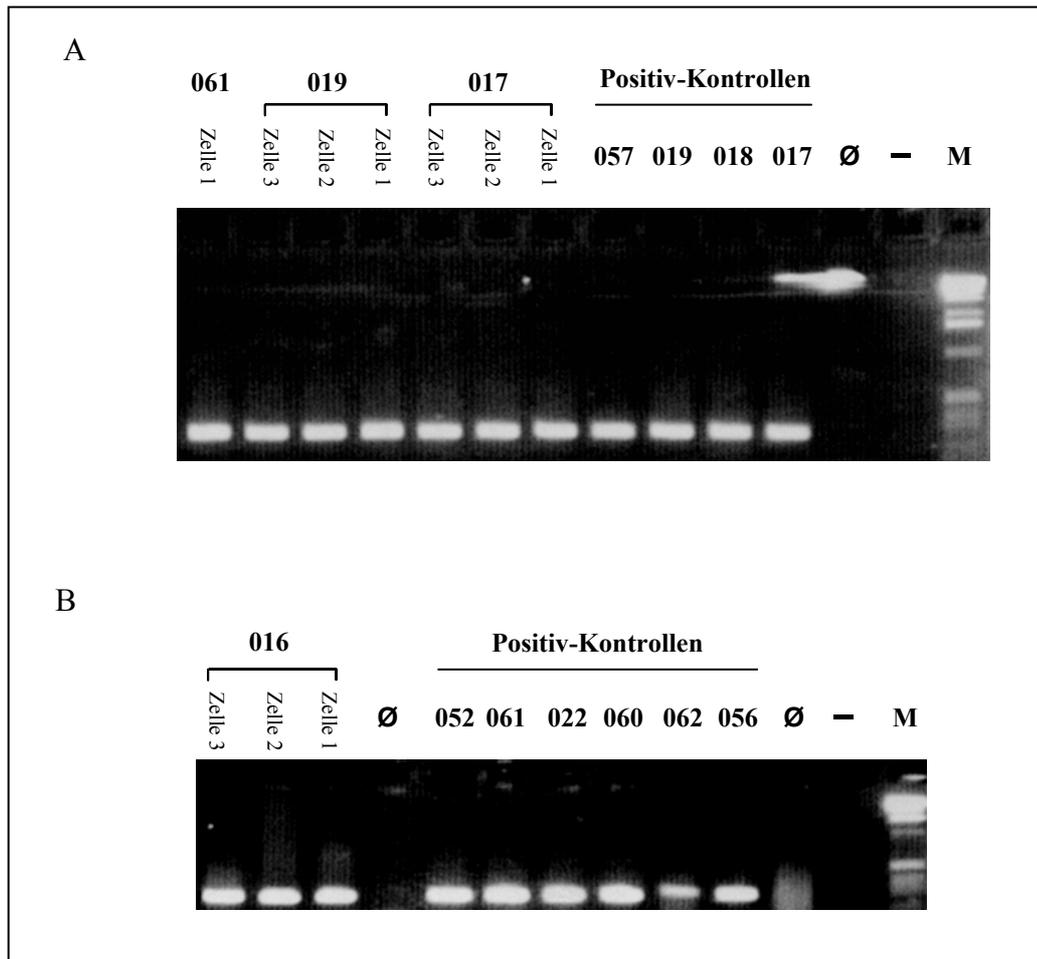


Abbildung 10 Kontroll-PCR für Positiv-Kontrollen und Einzelzellen

Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte des Markers p53 Exon2/3 nach erfolgreicher primärer PCR und Reamplifikation für Zytokeratin-negative (016, 017, 019), Zytokeratin-positive Einzelzellen (061) und Positiv-Kontrollen (A, B); - = negativ-Kontrolle der spezifischen PCR; Ø = negativ-Kontrolle der Reamplifikations-PCR; die Patienten sind durch einen dreistelligen Zahlen-Code gekennzeichnet.

15 der 17 zusätzlich generierten Kontrollzellen zeigten nach primärer PCR und Reamplifikation für die Kontroll-PCR Reaktionen ein positives Ergebnis und wurden in die Studie zur Komplettierung des Kontrollzellkollektivs aufgenommen (Tabelle 7).

Tabelle 7 Ergebnisse der Kontroll-PCRs für die zusätzlich generierten Kontrollzellen

	Anzahl	Kontroll-PCR positiv nach primärer PCR	Kontroll-PCR positiv nach Reamplifikation	In Studie aufgenommen
Neue Kontrollzellen	17	15	15	15

Die übrigen 39 Zytokeratin-negativen Zellen des Kontrollkollektivs, sowie die 101 Zytokeratin-positiven Patientenzellen wurden von Primären PCR-Produkten ausgehend reamplifiziert, für die bereits ein positives Ergebnis der Kontroll-PCRs vorlag, da diese Zellen aus Patientenkollektiven von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klein (Oleg Schmidt-Kittler, Bernhard Polzer und Marco Petronio) stammten. Diese Zellen zeigten auch nach Reamplifikation für die Kontroll-PCR Marker ein positives Resultat (Tabelle 8).

Tabelle 8 Ergebnisse der Kontroll-PCRs nach Reamplifikation der nach primärer PCR-Reaktion positiv getesteten Einzelzellen

	Anzahl	Kontroll-PCR positiv nach Reamplifikation	In Studie aufgenommen
Nach primärer PCR positiv getestete Kontrollzellen	39	39	39
Nach primärer PCR positiv getestete Patientenzellen	101	101	101

Eine Stichprobe von 15 Kontrollzellen wurde von B. Polzer, M. Petronio und O. Schmidt-Kittler (zum damaligen Zeitpunkt Mitarbeiter der AG Klein, Institut für Immunologie, LMU, München) mit der Technik der comparativen, genomischen Hybridisierung (CGH) analysiert (Tabelle 9).

Tabelle 9 Ergebnis der CGH analysierte Kontrollzellen

Patienten	untersuchte Zellen	CGH-Veränderungen
003	1	keine
016	1	keine
	2	keine
	3	keine
	4	keine
017	1	keine
	2	keine
018	1	keine
	2	keine
019	2	keine
020	1	keine
021	1	keine
	2	keine
	3	keine
022	1	keine

Die Analyse ergab für keine der untersuchten Zytokeratin-negativen Zellen ein verändertes CGH-Profil (Abbildung 11).

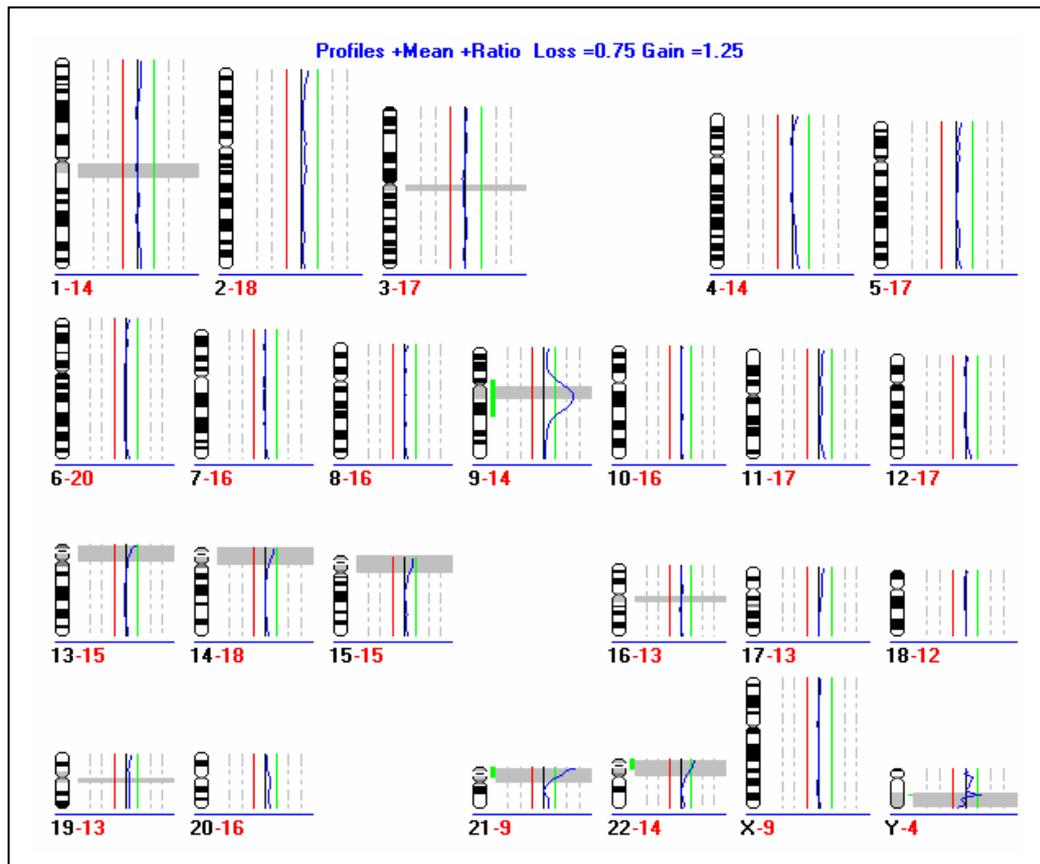


Abbildung 11 CGH-Profil einer Zytokeratin-negativen Kontrollzelle

Das CGH-Profil der Zytokeratin-negativen Zelle 2 der Patientin 021 zeigt für keines der untersuchten Chromosomen signifikante Deletionen oder Amplifikationen. (Die Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von M. Petronio, Institut für Pathologie der Universität Regensburg).

4.2 Etablierung der spezifischen Mikrosatelliten-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden vier chromosomale Regionen (3p21.1-14.2, 5q21-31.3, 16q22.1-23.1 und 17q21.3-22) mit 29 hochpolymorphen Markern analysiert. Zu Beginn der Arbeit galt es die entsprechenden Mikrosatelliten in der Nachbarschaft der Gene CDH1, CTNNA1, CTNNA1, JUP und APC auszuwählen. Dazu wurden die Datenbanken des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) und *The GDB Human*

Genome Database (<http://www.gdb.org>) verwendet (Abb. 12). Insgesamt 76 Mikrosatelliten wurden zur Evaluation bestimmt (Tab. 10).

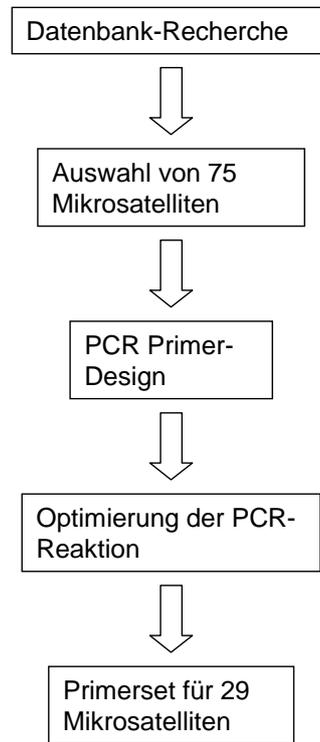


Abbildung 12 Flußdiagramm der einzelnen Schritte zur Etablierung der Mikrosatelliten-Marker für die spezifischen PCR-Reaktionen

In einem nächsten Schritt wurden die Nukleotid-Primer für die spezifischen PCR-Reaktionen designt. Im wesentlichen wurden dabei fünf Kriterien berücksichtigt: 1. Das PCR-Produkt enthält keine MseI-Schnittstellen. Dies ist eine notwendige Voraussetzung, da in der primären PCR-Reaktion zur globalen Amplifikation des Einzelzell-Genoms die DNA zu Beginn mit der Endonuklease MseI inkubiert wird. 2. Die Primer wurden so gewählt, daß die Länge des PCR-Produktes zwischen 100 und 200 Basenpaaren liegt. 3. Die Primer sollten zwischen 17 und 25 Nukleotiden lang sein. 4. Die Primer sollten an ihrem 3`-Ende mit einer der Basen C oder G endigen und keine längeren Einzelnukleotid-Wiederholungen aufweisen. 5. Die primer wurden so ausgewählt, daß deren theoretische Annealing-Temperatur (T_m) auf Basis der Kalkulation $T_m = 4x(G+C)+2x(A+T)$ zwischen 52 und 64 °C liegt.

Tabelle 10 Liste der zur Etablierung bestimmten Mikrosatelliten

Chromosomenarm			
3p	5q	16q	17q
Mikrosatelliten			
D3S932	D5S1360	D16S492	D17S932
D3S663	D5S1975	D16S3051	D17S943
D3S643	D5S1983	D16S511	D17S1827
D3S624	D5S2001	D16S3053	D17S1851
D3S3722	D5S2014	D16S3140	D17S966
D3S3722	D5S2049	D16S505	D17S917
D3S3721	D5S2117	D16S681	D17S907
D3S3685	D5S299	D16S3066	D17S579
D3S3624 *	D5S346	D16S3040	D17S1868
D3S3593	D5S399	D16S526	D17S855
D3S3593	D5S415	D16S398	D17S1322
D3S3518	D5S471	D16S397	D17S1161
D3S3472	D5S479	D16S496	D17S800
D3S1581	D5S487	D16S485	
D3S1568	D5S500	D16S3019	
D3S1542	D5S574	D16S3095	
D3S1540	D5S592	D16S3138	
D3S1518	D5S615	D16S769	
D3S1514	D5S671		
D3S1497	D5S816		
D3S1210	rs4227		
D3S1100			
β-Catenin Marker			
D3S32			

* Die in der Studie verwendeten Marker sind mit Fettdruck hervorgehoben

Zur Optimierung der PCR-Reaktion wurde eine Gradienten-PCR mit variabler Annealing-Temperatur (T_m) durchgeführt. Dabei wurden drei unterschiedliche Temperaturstufen ($T_m-5^\circ\text{C}$ - T_m - $T_m+5^\circ\text{C}$) an einzelnen Kontrollzellen und Positiv-Kontrollen getestet (Abb. 13). Insgesamt wurden Primer für 76 verschiedenen Mikrosatelliten designt und in beschriebener Weise getestet. Nur diejenigen Primer, die für eine Temperaturstufe ein einzelnes, adäquates PCR-Produkt zeigten wurden für die Studie verwendet.

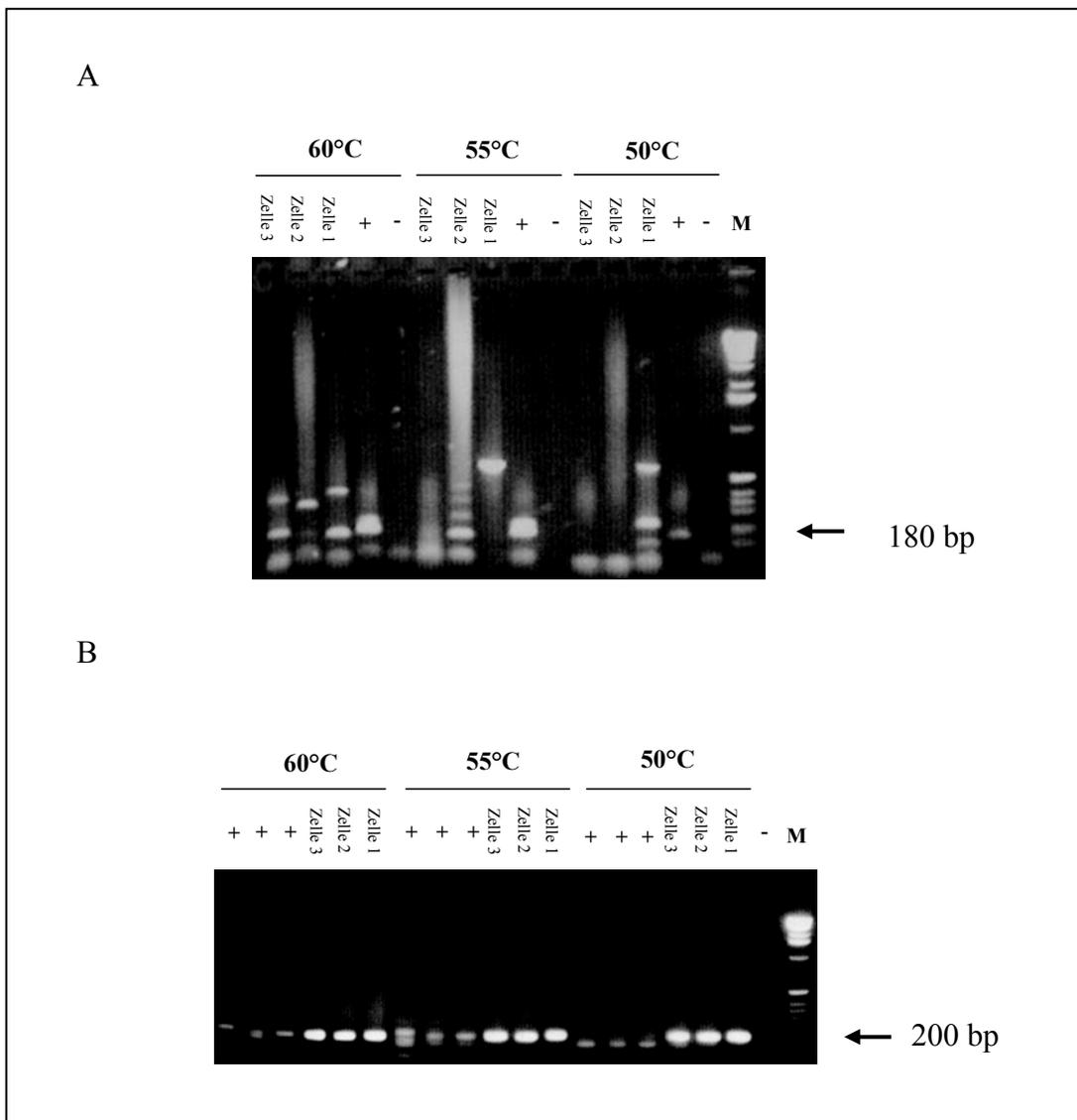


Abbildung 13 Gelelektrophorese der PCR-Produkte zur Optimierung der Annealing-Temperatur für die Marker D16S769 (A) und D16S511 (B) an drei Einzelzellen und Positiv-Kontrollen

— = negativ-Kontrolle der spezifischen PCR, + = Positiv-Kontrollen (aus gepoolter DNA). Für den Marker D16S769 (A) lässt sich durch den Temperatur-Gradienten weder für die Positiv-Kontrolle, noch für die Reamplifikate der Einzelzellen ein spezifisches PCR-Produkt der erwarteten Größe von ca. 180 bp gewinnen. Der Marker D16S769 wurde daraufhin nicht in den weiteren Analysen verwendet. Für den Marker D16S511(B) hingegen, findet sich in allen Temperaturstufen nur eine, spezifische Bande auf der zu erwartenden Höhe von ca. 200 bp und wurde deshalb in den Analysen an Einzelzellen verwendet.

Trotz Anwendung der vorbeschriebenen Kriterien zum Design der Primer, zeigten sich Unterschiede in der erfolgreichen Etablierung der PCR-Reaktionen für die einzelnen Chromosomenarme (Tab. 11). Insbesondere für den Chromosomenarm 3p konnten nur 5 der 24 getesteten Marker (21%) für die Studie etabliert werden. Für die Marker der Chromosomenarme 5q, 16q und 17q zeigte sich eine Erfolgsquote von 52%, 39% und

46% respektive. Dabei ist zu berücksichtigen, daß für die Optimierung der PCRs nur die Annealing-Temperatur als Variable benutzt wurde.

Tabelle 11 Anzahl getesteter und etablierter Marker für die einzelnen Chromosomenarme

	Chromosomenarm			
	3p	5q	16q	17q
Anzahl getesteter Mikrosatelliten	24	21	18	13
Anzahl etablierter Marker für Studie	5	11	7	6
	21%	52%	39%	46%

Für 29 (38%) der 76 getesteten Marker konnte die PCR-Reaktion optimiert werden (Abb. 14).

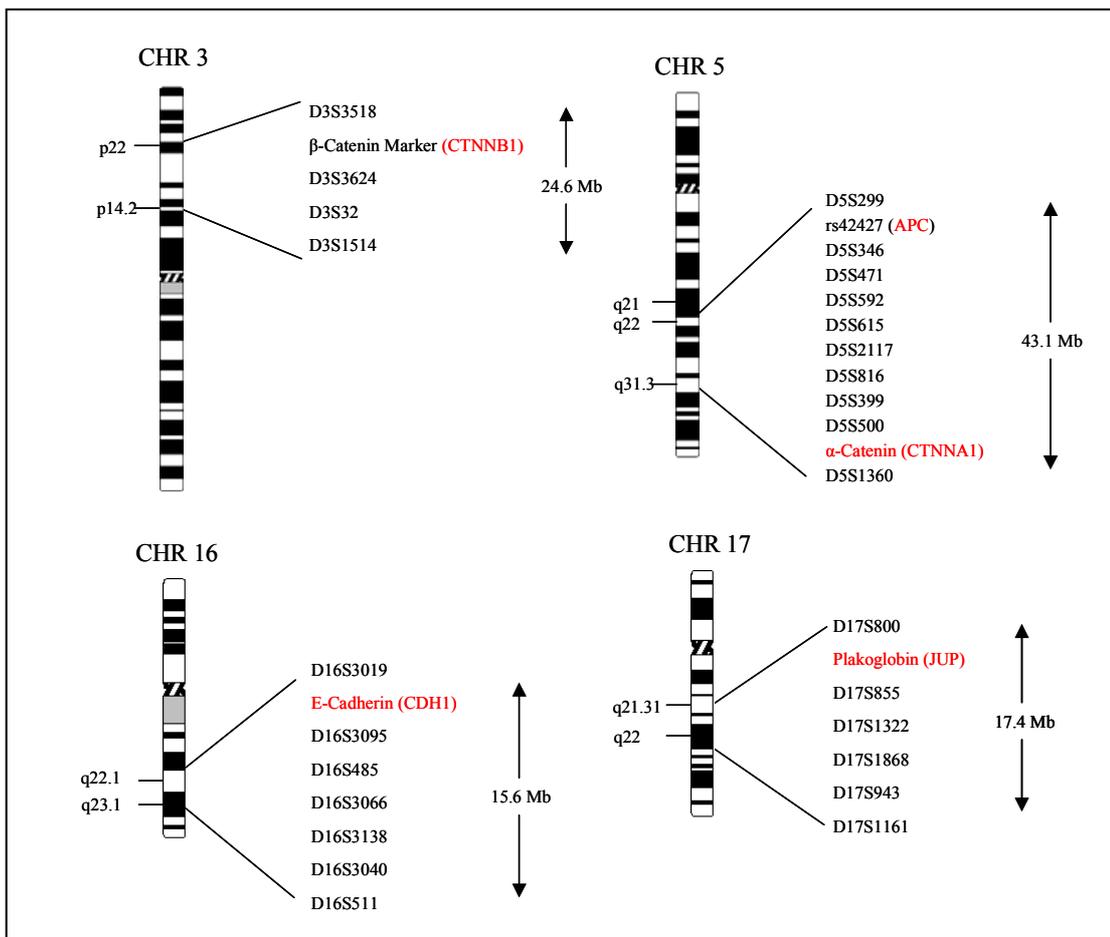


Abbildung 14 Idiogrammmatische Darstellung der Marker und untersuchten Gene (rot); Mb=Megabsen

4.3 Ergebnisse der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)-Experimente an Einzelzellen

Im Folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)-Experimente der Kontrollzellen und der Zytokeratin-positiven Zellen, sowie deren statistische Auswertung dargestellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten, Zytokeratin-positiven Einzelzellen entstammen der in der Studie von Schmidt-Kittler et al. (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003) beschriebenen Patienten-Kohorte. In dieser Studie wurden für 99 der untersuchten 386 Brustkrebs-Patientinnen Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen. 189 der Zytokeratin-positiven Einzelzellen wurden in der Folge mit der Technik der comperativen genomischen Hybridisierung (CGH) analysiert. 101 dieser Zellen, welchen von 50 Brustkrebspatientinnen isoliert werden konnten stellen das Ausgangsmaterial zur Genotypisierung dar (Abb. 15). Zunächst wurden die Zytokeratin-positiven Zellen als eine Gruppe analysiert und mit den Ergebnissen des Kontrollkollektivs verglichen. In einem zweiten Schritt wurden die Patienten gemäss ihrem klinischen Stadium M0 oder M1 (nach UICC) in zwei Gruppen unterteilt und mit den Kontrollzellen, sowie die beiden Gruppen untereinander verglichen. Ziel dieser Subgruppenbildung ist es, Mutationen zu identifizieren, die für die Progression in einen metastatischen Phänotyp der Tumorerkrankung charakteristisch sind. Eine weitere Unterteilung der Gruppen basiert auf den Ergebnissen der CGH-Analysen in Verbindung mit dem klinischen Stadium der Patienten (M0 und M1): Zu Beginn wurden die Zytokeratin-positiven Zellen entsprechend ihres CGH-Profiles in zwei Gruppen unterteilt: Zellen ohne Veränderungen im CGH-Profil (Gruppe A) und Zellen mit CGH-Veränderungen (Gruppen B + C). Die Gruppen der Zellen mit nachweisbaren Veränderungen in ihrem CGH-Profil wurden gemäss dem klinischen Stadium der Patientinnen in die Gruppen B (M0) und C (M1) weiter unterteilt. Hintergrund für diese zusätzliche Stratifizierung ist die Überlegung, dass großen, chromosomalen Veränderung, wie sie in CGH-Analysen nachweisbar sind (Gruppen B + C), Mutationen vorausgehen, welche nur bei höherer Auflösung, wie beispielsweise durch LOH-Analysen erkannt werden können.

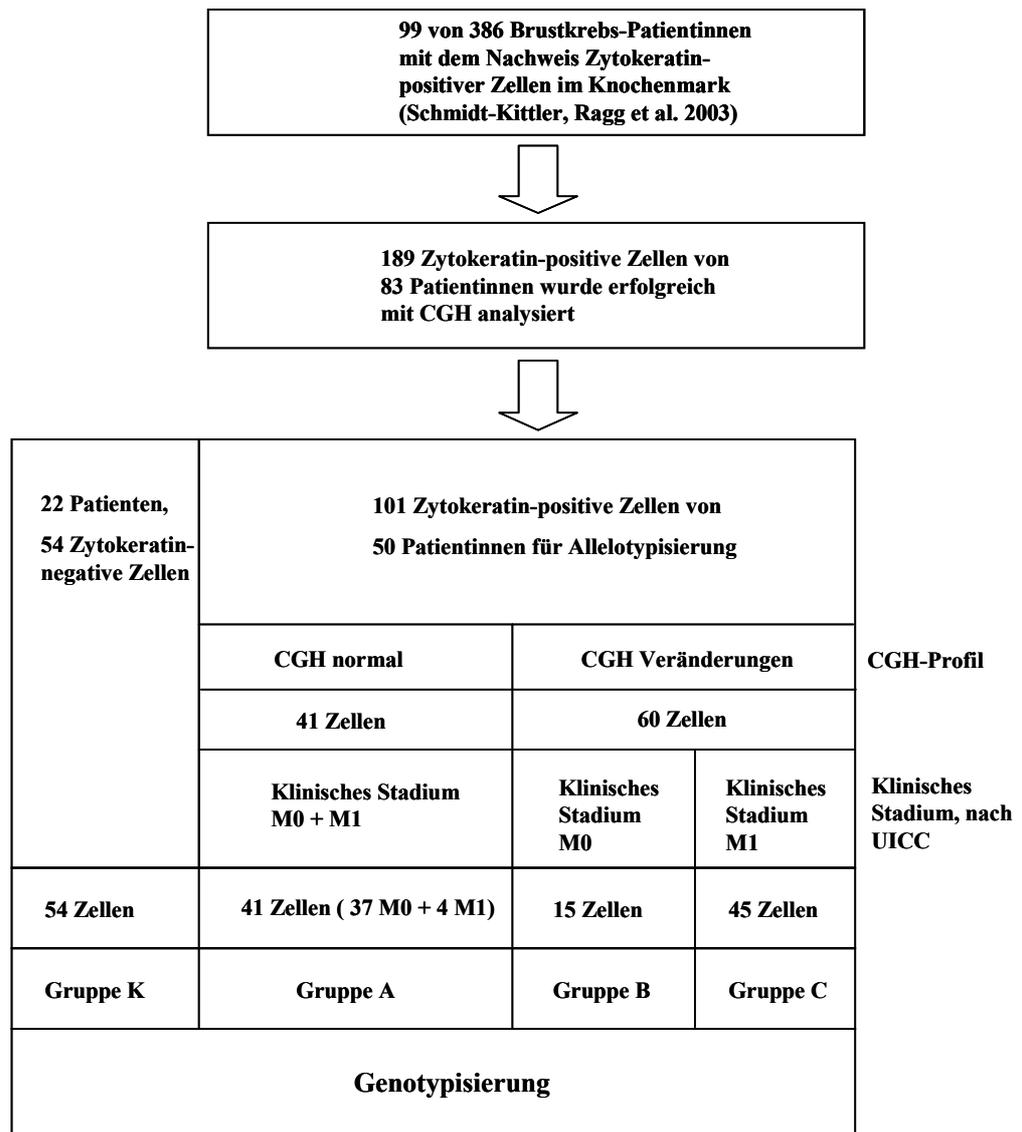


Abbildung 15 Schema zur Einteilung der Zytokeratin-positiven Zellen in die Gruppen A, B und C

Vor der statistischen Analyse der Ergebnisse an Zytokeratin-positiven Zellen, wurde die Methode zur Genotypisierung an einem Kontrollzellkollektiv validiert. Daran anschließend werden die vergleichenden Ergebnisse der einzelnen Subgruppen dargestellt.

4.3.1 Ergebnisse der PAGE-Analysen des Kontrollzell-Kollektivs und Validierung der Methode

Für das Kontrollzell-Kollektiv wurden 54 Zytokeratin-negative Zellen aus dem Knochenmark von 22 Patienten mit überwiegend gastrointestinalen Tumoren isoliert. Von den Patienten 021 und 022 wurden sowohl Zytokeratin-negative Kontrollzellen, als auch Zytokeratin-positive Zellen isoliert und in die weitere Analysen mit aufgenommen. Für die Auswertung der Ergebnisse der PAGE-Experimente (Abb. 16) wurden diese in eine dreifarbige, tabellarische Form überführt (Abb. 17). Unter der Annahme, daß die primäre PCR-Reaktion und die anschließende Reamplifikation vollständig sind, würden für einen informativen Mikrosatelliten-Marker beide Allele des Genoms amplifiziert werden. Für die Zellen des Kontrollzellkollektivs konnten 788 auswertbare Ereignisse analysiert werden. Als ein auswertbares Ereignis ist das Ergebnis des PAGE-Experiments eines informativen Markers für eine einzelne Zelle definiert.

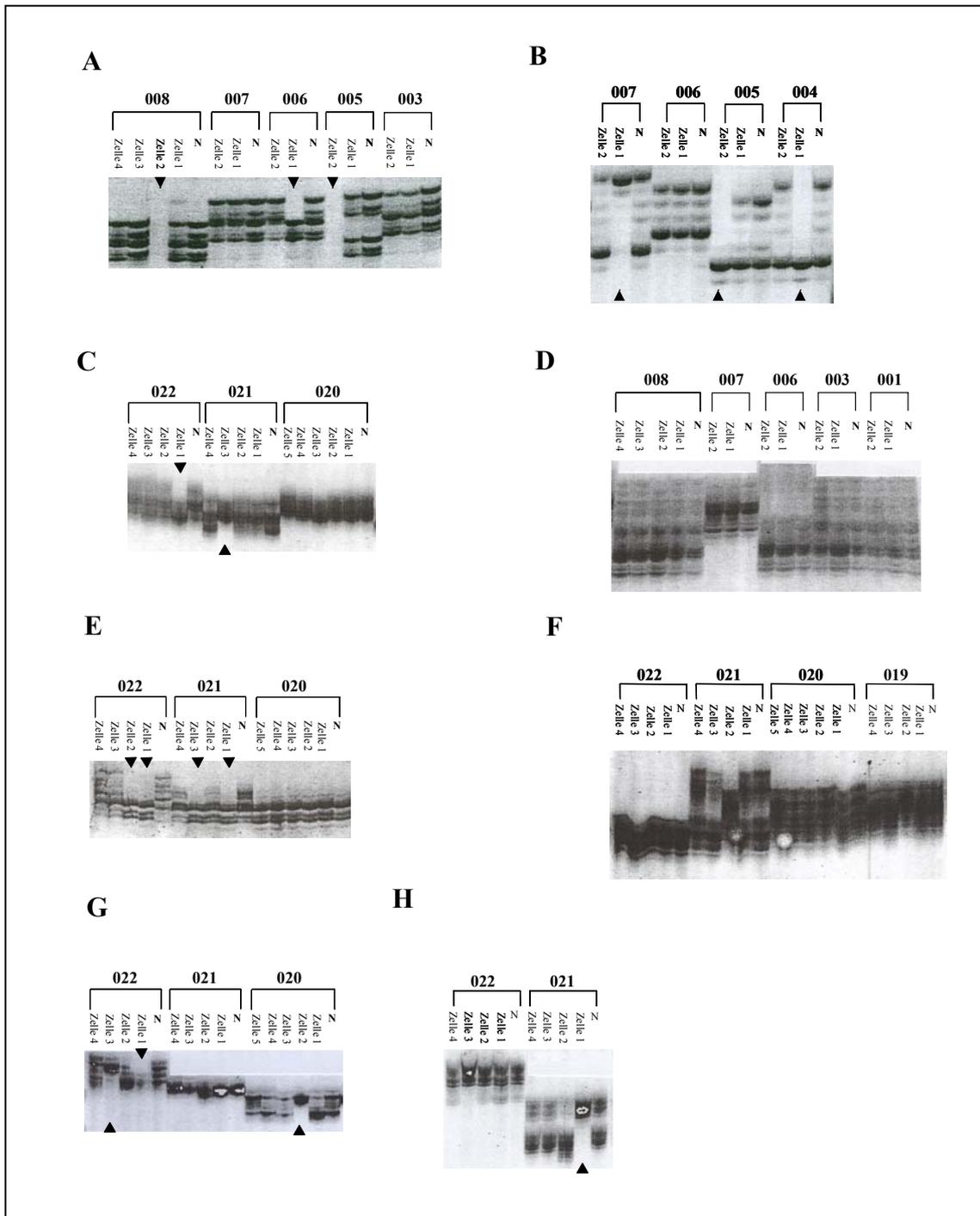


Abbildung 16 Beispiele von Polyacrylamid-Gel Elektrophorese Experimenten (PAGE) für Kontrollzellen

Exemplarisch sind die PAGE-Resultate für die Marker D16S485 (A), D5S592 (B), D17S943 (C), D3S3624 (D), D17S1322 (E), D5S500 (F), D3S1514 (G) und D17S1161 (H) abgebildet; die Patienten sind durch einen Nummern-Code gekennzeichnet, N bezeichnet den normalen Allelotyp des Patienten für den entsprechenden Marker, die Pfeile Markieren die Zellen mit Allelverlust.

Rechnerisch sollten demzufolge für 788 auswertbare Ereignisse 1576 Allele amplifiziert werden können. Tatsächlich wurden aber nur 1435 Allele in den spezifischen PCR-Reaktionen für die einzelnen Marker nachgewiesen (Tab. 12). Dies entspricht einer relativen Häufigkeit P von 0,91, daß ein Allel amplifiziert wird, sofern dieses vorlag. Anders formuliert, für 129 auswertbare Ereignisse werden nicht beide Alle amplifiziert. Dies bedeutet, das mit einer relativen Häufigkeit von $P=0,16$ (129/788), für ein Auswertbares Ereignis mit einem durch die Methode bedingten Allelverlust zu rechnen ist. Da für die Zytokeratin-negativen Kontrollzellen kein maligner Ursprung angenommen wird und demnach keine genomischen Aberrationen erwartet werden, muss in diesem Fall davon ausgegangen werden, daß die Allelverluste artifiziieller Natur und durch die Methode bedingt sind. Um in den späteren Analysen der Patientenzellen klare Aussagen bezüglich eines tatsächlichen Allelverlustes treffen zu können, war es immanent wichtig, die Möglichkeit artifiziieller Allelverluste an einem ausreichend großen Kontrollkollektiv bestimmen zu können.

Tabelle 12 Zusammenfassung der Genotypisierung des Kontrollzell-Kollektivs

	Kontrollzell-Kollektiv (Gruppe K)	P-Wert (relative Häufigkeit)
Anzahl auswertbarer PCR-Experimente	788	
Erwartete Anzahl amplifizierter Allele	1576	
Anzahl amplifizierter Allele	1435	0.91
Anzahl auswertbarer PCR-Experimente mit Allelverlust	129	0.16

Es stellte sich als nächstes die Frage, ob alle verwendeten Marker in demselben Maß, oder aber einzelne Marker präferentiell von artifiziiellen Allelverlusten betroffen sind. Die Allelverlust-Häufigkeit eines Markers errechnet sich aus dem Quotienten der relativen Häufigkeiten für das Ereignis „nicht beide Allele amplifiziert“ durch die Anzahl aller auswertbaren Ereignisse für den betreffenden Marker. Im Durchschnitt beträgt die Allelverlust-Häufigkeit $P = 0,16$ für einen Marker. Dabei bestehen aber deutliche Unterschiede in der Allelverlust-Häufigkeit für den einzelnen Marker. Diese variiert zwischen $P = 0,05$ (für die Marker D3S3624, D3SS3518, D17S1868 und den intragenetischen β -Catenin Marker) und $P = 0,32$ (für den Marker D5S2117). Stoecklein

et al. wiesen in ihrer Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Länge der genomischen MseI-Fragmente und der Wahrscheinlichkeit der Allel-Amplifikation aus paraffinfixiertem Gewebe nach (Stoecklein, Erbersdobler et al. 2002). Je größer die MseI-geschnittenen DNA Fragmente waren, desto häufiger trat ein artifizieller Allelverlust auf. Es ist naheliegend einen solchen Zusammenhang auch für die in der vorliegenden Arbeit analysierten Einzelzellen anzunehmen, auch wenn diese nicht paraffinfixiert wurden. Weitere, mögliche Einflußgrößen, die für die unterschiedlichen Allelverlust-Häufigkeiten eine Rolle spielen können, sind die Länge des PCR-Produktes und die Art des Nukleotid-Polymorphismus, sowie nicht bekannte Charakteristika des jeweiligen, spezifischen DNA-Abschnittes. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen wurden die Marker zunächst in zwei Gruppen unterteilen: Die Marker, die in ihrer Allelverlust-Häufigkeit über dem Durchschnitt von $P = 0,16$ liegen bilden die Gruppe 1, diejenigen Marker, deren Allelverlust-Häufigkeit unter $P = 0,16$ liegen die Gruppe 2 (Tab.13).

Tabelle 13 Allelverlust-Häufigkeit der einzelnen Marker in absteigender Reihenfolge für das Kontrollzell-Kollektiv

Marker	Allelverlust Häufigkeit	MseI-Fragment (bp)	PCR-Produkt (bp)	Polymorphismus	
D5S2117	0,32	1376	140	dinukleotid-	
D5S816	0,30	307	170	tetranukleotid-	
D3S1514	0,27	1145	212	tetranukleotid-	
D5S592	0,26	365	186	tetranukleotid-	
D5S1360	0,25	515	130	dinukleotid-	
D5S399	0,22	657	178	dinukleotid-	
D16S485	0,21	179	150	tetranukleotid-	
D5S471	0,21	188	136	dinukleotid-	Gruppe 1 $P > 0.16$
D5S615	0,19	641	265	tetranukleotid-	
D16S3066	0,19	565	198	dinukleotid-	
D16S3138	0,19	559	170	dinukleotid-	
D16S3095	0,18	520	164	dinukleotid-	
D16S511	0,18	450	198	dinukleotid-	
D17S800	0,18	333	140	dinukleotid-	
D16S3019	0,17	605	245	dinukleotid-	
D5S346	0,15	350	110	dinukleotid-	
D17S855	0,15	594	150	dinukleotid-	
D3S32	0,14	394	300	RFLP	
D17S1161	0,13	316	200	tetranukleotid-	
D5S299	0,13	550	170	dinukleotid-	
D17S943	0,13	260	176	dinukleotid-	Gruppe 2 $P < 0.16$
D16S3040	0,12	302	146	dinukleotid-	
D17S1322	0,12	1034	130	trinukleotid-	
rs42427 (intragenetisch APC)	0,09	618	330	RFLP	
D5S500	0,08	157	134	dinukleotid-	
β -Catenin Marker (Intron7)	0,05	253	130	dinukleotid-	
D17S1868	0,05	402	136	dinukleotid-	
D3S3518	0,05	322	190	dinukleotid-	
D3S3624	0,05	375	168	dinukleotid-	
Mittelwert	0,16	494	178		

Für den Marker mit der höchsten Allelverlust Häufigkeit (D5D2117) gilt tatsächlich, daß der Mikrosatellit auf dem längsten Mse1-Fragment im Vergleich zu den anderen Markern liegt. Statistisch besteht aber im Vergleich der Gruppen 1 und 2 kein signifikanter Unterschied ($P=0.169$, Wilcoxon Rangsummen Test) zwischen der Allelverlust-Häufigkeit und der Länge der Mse1-Fragment (Abb. 18 A).

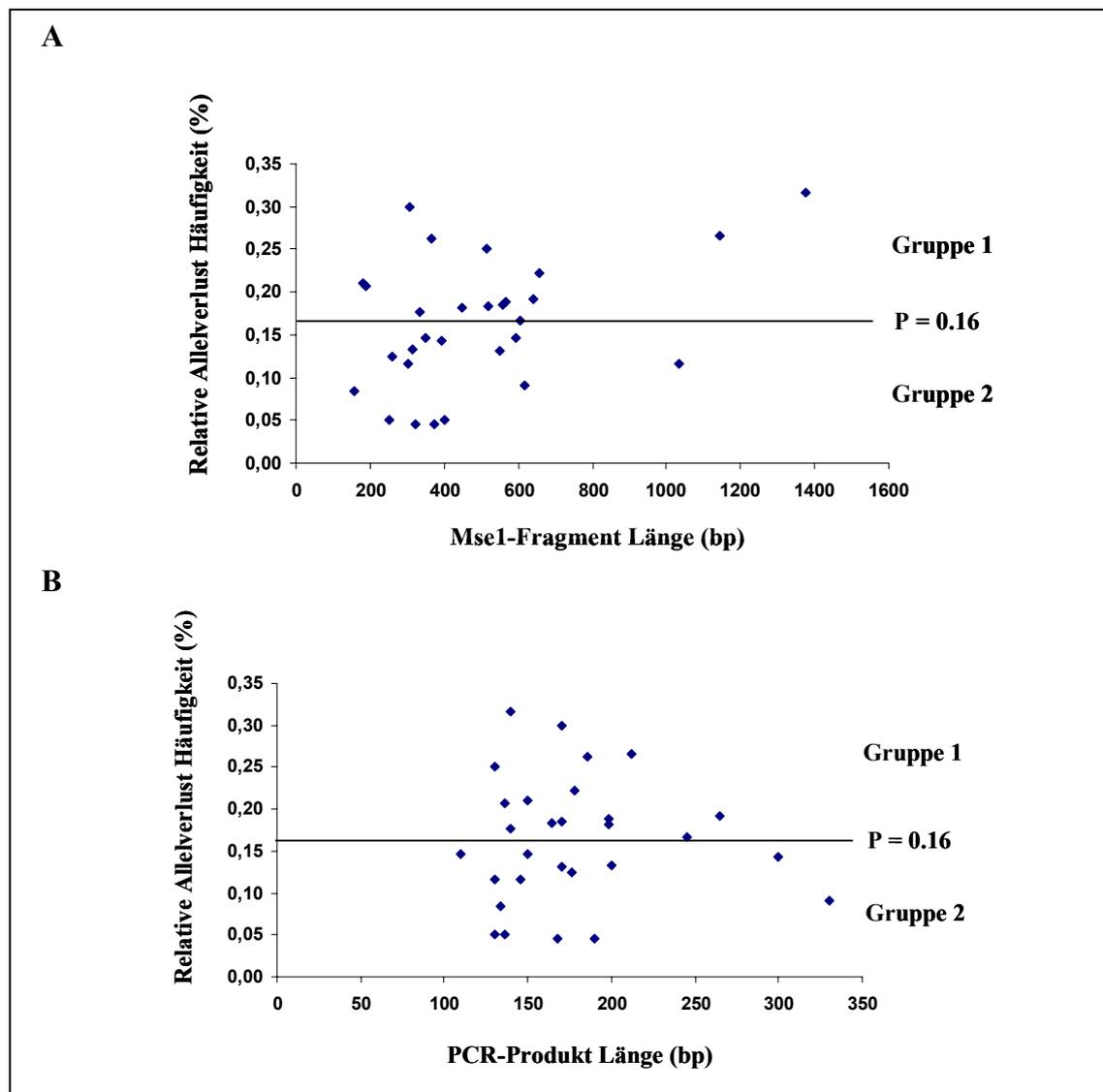


Abbildung 18 Scatterplot für die relative Allelverlust-Häufigkeit in Abhängigkeit der Mse1-Fragment Länge (A) und der PCR-Produkt Länge (B)

Die einzelnen Marker werden durch die Punkte symbolisiert.

Die durchschnittliche Länge der PCR-Produkte beträgt für Gruppe 1 179 Basenpaare (bp) und für Gruppe 2 176 Basenpaare (Abb. 18 B).

Auch in diesem Fall, läßt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dieser Größe und der Allelverlust-Häufigkeit ermitteln ($P=0,905$, Wilcoxon Rangsummen Test). Der auffälligste Unterschied beider Gruppen besteht in der Verteilung der Nukleotid-Polymorphismen. Von den 29 Markern sind sechs Tetranukleotid-, 21 Dinukleotid und zwei Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs). Fünf der sechs Tetranukleotid-Polymorphismen finden sich in Gruppe 1. Beide RFLPs finden sich in Gruppe 2. Der Unterschied sowohl für die Verteilung der Tetranukleotid-Polymorphismen, als auch der RFLPs erricht statistisch keine Signifikanz ($P=0,169$ bzw. $P=0,224$, Fisher`s exakt Test; Tab. 14). Abschließend läßt sich die Frage nach den Gründen für die unterschiedlichen Allelverlust-Häufigkeiten der Marker nicht vollständig beantworten. Keiner der untersuchten Faktoren erreicht statistische Signifikanz. Mit ein Grund dafür mag in der kleinen Anzahl verwendeter Marker liegen. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß bei der Analyse eines größeren Marker-Sets, für eine der Untersuchten Größen ein statistisch signifikanter Unterschied besteht.

Tabelle 14 Allelverlust-Häufigkeit in Abhängigkeit möglicher Einflussfaktoren

	Mittelwerte		P-Werte
	Gruppe 1	Gruppe 2	
Mse1-Fragment Länge (Mittelwert)	560	423	0.169^a
PCR-Produkt Länge (Mittelwert)	179	176	0.905^a
Anzahl Marker mit Tetranukleotid-Polymorphismus	5/15	1/14	0.169^b
Anzahl RFLPs	0/15	2/14	0,224^b

^a Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon Rangsummen Test berechnet

^b Der P-Wert wurden mit dem Fisher`s exakt Test berechnet

4.3.2 Vergleich der Markerinformativitäten für die untersuchten Gruppen

Wesentlich für die weitere Analyse zur Genotypisierung ist die Vergleichbarkeit der untersuchten Gruppen hinsichtlich der Informativität der verwendeten Marker. Bei statistisch signifikanten Unterschieden in der durchschnittlichen Markerinformativität der Gruppen besteht die Möglichkeit einer Fehlinterpretation der Ergebnisse: die Gruppe mit erhöhter Markerinformativität liefert mehr auswertbare Ereignisse als die Vergleichsgruppe mit niedrigerer, durchschnittlicher Informativität und kann somit bei kleiner Probenzahl die statistische Auswertung beeinflussen. Im Vergleich der

durchschnittlichen Markerinformativitäten für die einzelnen Gruppen mit dem Kontrollkollektiv lässt sich aber kein signifikanter Unterschied nachweisen (Tab. 15).

Tabelle 15 Vergleich der einzelnen Gruppen mit dem Kontrollkollektiv hinsichtlich der durchschnittlichen Markerinformativität

Gruppe	Durchschnittliche Marker-Informativität	P-Werte ^a
K (Kontrollzellkollektiv)	0.50	
Alle Patienten mit Zytokeratin-positiven Zellen	0.53	0.575
M0-Patienten	0.54	0.29
M1-Patienten	0.51	0.858
A (CGH normal)	0.50	0.87
B (CGH-Veränderungen und klinisch M0)	0.49	0.808
C (CGH-Veränderungen und klinisch M1)	0.56	0.181

^a Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon Rangsummen Test berechnet

Die durchschnittliche Markerinformativität der einzelnen Gruppen variiert in einem Bereich von minimal 0,487 (Gruppe B) und maximal 0,56 (Gruppe C). Für die in der späteren Analysen untereinander verglichen Gruppen besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Markerinformativität (Tab. 16).

Tabelle 16 Vergleich der durchschnittlichen Markerinformativität für die einzelnen Subgruppen

Gruppen	M0	M1
M0-Patienten	x	0.618 ^a
M1-Patienten	0.618	x

Gruppen	A	B	C
A (CGH normal)	x	0.901	0.139
B (CGH-Veränderungen und klinisch M0)	0.901	x	0.191
C (CGH-Veränderungen und klinisch M1)	0.139	0.191	x

^a Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon Rangsummen Test berechnet

4.3.3 Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen mit dem Kontrollzellkollektiv

Eine zentrale Frage der Arbeit galt dem Nachweis möglicher Allelverluste im Bereich der Gene CTNNA1, CTNNB1, JUP, CDH1 und APC. Betrachten wir dabei zunächst die Ergebnisse für die Zytokeratin-positiven Zellen als eine Gruppe im Vergleich zum Kontrollzellkollektiv (Abb. 19).

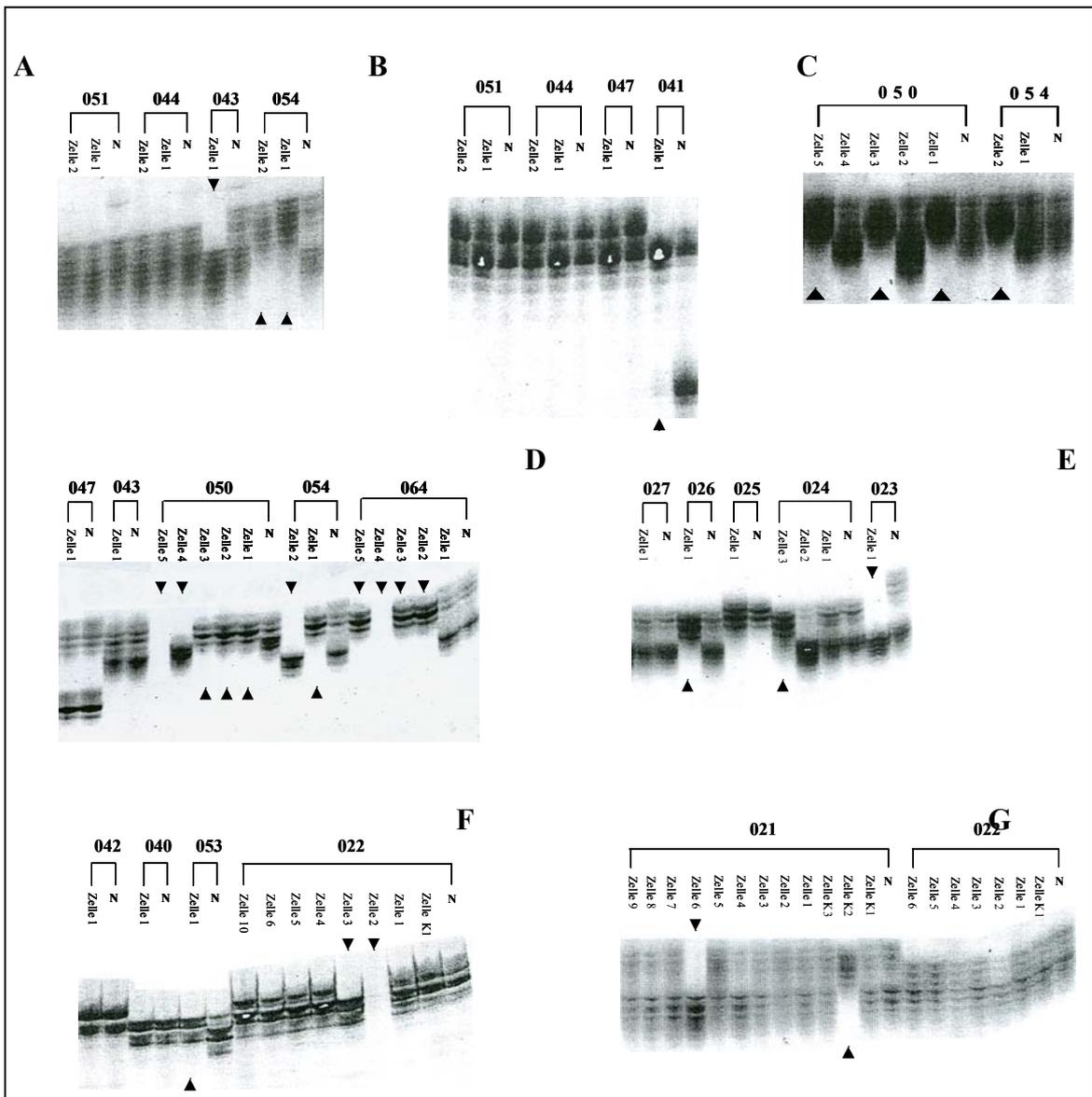


Abbildung 19 Beispiele von Polyacrylamid-Gel Electrophorese Experimenten (PAGE) der Zytokeratin-positiven Zellen

Die Patienten sind durch Nummern-Code gekennzeichnet, N = Positiv-Kontrolle aus gepoolter DNS, die Pfeile Markieren die Zellen mit Allelverlust. Marker (A) D17S1868, (B) D17S1161, D17S943, (C) D17S943, (D) D16S3066, (E) beta-Catenin Marker (intragenetisch), (F) D5S615, (G) D3S3518

Für die Auswertung der PAGE-Experimente wurden die Ergebnisse, wie schon für das Kontrollzellkollektiv, in eine farbenkodierte, tabellarische Form überführt (Abb. 20).

Für die Zytokeratin-positiven Zellen traten in 46% (689 /1511) der auswertbaren PCR-Experimente Allelverluste auf, während dies für das Kontrollzellkollektiv in 17% (129/788) der informativen Marker der Fall war (Tab. 17).

Tabelle 17 Zusammenfassung der Genotypisierung für die Zellen des Kontroll-Kollektivs und den Zytokeratin-positiven Zellen

	Kontrollzell-Kollektiv	Zytokeratin-positive Zellen
Anzahl Patienten je Gruppe	22	50
Anzahl Zellen je Gruppe	54	101
Anzahl auswertbarer PCR-Experimente	788	1511
Anzahl amplifizierter Allele	1435	2366
Anzahl auswertbarer PCR-Experimente mit Allelverlust	129	689

Ein Maß für die relative Häufigkeit von Allelverlusten innerhalb einer Gruppe ist der prozentuale Allelverlust der individuellen Zelle. Als „prozentualer Allelverlust“ (PLOH) einer Zelle ist definiert der Quotient aus der Häufigkeit des Ereignisses „nicht beide Allele amplifiziert“ durch die Anzahl informativer Marker für den einzelnen Patienten. In dem hypothetischen Fall, daß ein Patient in allen 29 untersuchten Mikrosatelliten und RFLPs informativ ist und für jeden dieser Marker ein Allelverlust nachgewiesen werden kann beträgt die prozentuale Allelverlusthäufigkeit 1 (29/29). Zwischen den Zellen des Kontrollkollektivs (PLOH $0,2 \pm 0,2$ (Mittelwert; SD)) und den Zytokeratin-positiven Zellen (PLOH $0,45 \pm 0,3$ (Mittelwert; SD)) besteht ein hoch signifikanter Unterschied in der prozentualen Allelverlust-Häufigkeit ($P=0,001$, Mann-Whitney Rangsummen Test; Abb. 21).

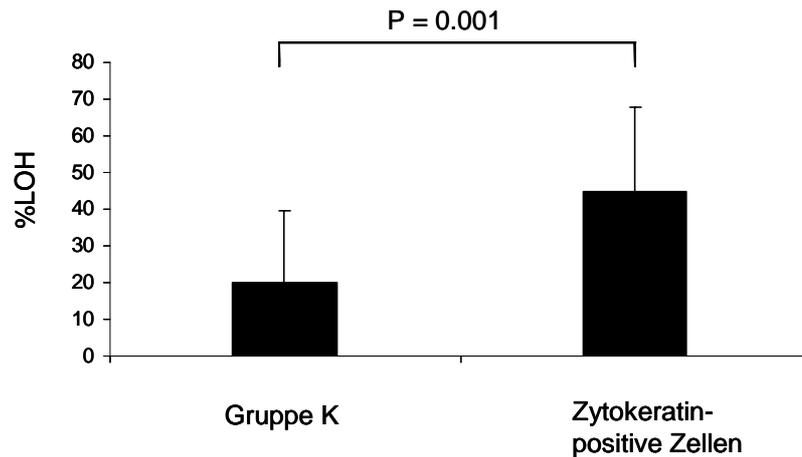


Abbildung 21 Durchschnittliche, prozentuale Allelverlust-Häufigkeit der Zellen der Gruppe K und der Zytokeratin-positiven Zellen

Im Vergleich der einzelnen Marker für die Zytokeratin-positiven Zellen läßt sich feststellen, daß 15 der 29 untersuchten Marker signifikant häufiger von LOH betroffen sind als die entsprechende Marker im Kontrollkollektiv. Dies gilt für 6 der 7 Markern auf Chromosom 16, 3/11 Markern für Chromosom 5, für 3/5 Markern auf Chromosom 3 und 3 der 7 Marker auf Chromosom 17 (Tab. 18 und 19). Auf Grund der bekannten Lokalisation der entsprechenden Marker, lassen sich für die Zytokeratin-positiven Zellen die chromosomalen Regionen definieren, die statistisch signifikant häufig von Allelverlusten betroffen sind. Für den Chromosomenarm 16q erstreckt sich dieser Bereich, ausgehend von dem Marker D16S3095 bis zum Marker D16D511. Für den Chromosomenarm 5q lassen sich zwei nicht zusammenhängende Regionen, rs42427-D5S346 und der Bereich um den Marker D5S615 definieren. Die Marker D3S3518-D3S3624 sind für den Chromosomenarm 3p signifikant häufig deletiert. Die gesamte untersuchte Region telomer des Markers D17S1322 ist für den Chromosomenarm 17q signifikant häufig von LOH betroffen.

Tabelle 18 Statistischer Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen mit dem Kontrollkollektiv bezüglich der Allelverlust-Häufigkeit für die einzelnen Marker

Marker und Gene ^a	Lokalisation (bp) ^a	P-Werte ^b
		Zytokeratin-positiv Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen
Chromosom 16	D16S3019	0.124
	E-Cadherin (CDH1)	
	D16S3095	0.029 **
	D16S485	0.015 **
	D16S3066	0.010 **
	D16S3138	0.006 **
	D16S3040	0.007 **
	D16S511	0.006 **
Chromosom 5	D5S299	0.119
	rs42427 (intragenetisch von APC)	0.009 **
	APC	
	D5S346	0.027 **
	D5S471	0.090
	D5S592	0.299
	D5S615	0.024 **
	D5S2117	0.308
	D5S816	0.163
	D5S399	1.000
	D5S500	0.065
	α -Catenin (CTNNA1)	
	D5S1360	0.276
Chromosom3	D3S3518	0.033 **
	β -Catenin (CTNNB1) Marker (Intron 7)	0.005 **
	β -Catenin (CTNNB1)	
	D3S3624	0.004 **
	D3S32	0.173
	D3S1514	0.065
Chromosom 17	D17S800	0.269
	Plakoglobin (JUP)	
	D17S855 (BRCA1 Intron 20)	0.311
	D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	0.110
	D17S1868	0.004 **
	D17S943	0.031 **
	D17S1161	0.029 **

^a Die Reihenfolge der Marker entspricht ihrer chromosomalen Lokalisation gemäß Build 35.1 des humanen Genoms [August 2004]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen).

^b Die P Werte wurden mit dem Chi-Quadrat Test berechnet und für multiples Testen korrigiert (FDR)

** kennzeichnet die P-Werte, die unter einem Signifikanzniveau von 0.05 liegen

Am häufigsten sind die Marker D16S3095 (64% der informativen Patientenzellen), D16S485 (67%) und D16S3066(63%) auf dem Chromosomenarm 16q von Allelverlust betroffen. Insbesondere sind die intragenetischen Marker für die Gene *APC* (52% der informativen Patientenzellen vs. 9% der Kontrollzellen) und *beta-Catenin* (57% der Patientenzellen vs. 5% der Kontrollzellen), sowie die Marker, die dem Gen *E-Cadherin* (D16S3095 1,2Mb telomer von E-Cadherin, 64% vs. 18%) am nächsten liegen, signifikant häufiger deletiert, als dies für das Kontrollzellkollektiv der Fall gewesen ist. Für die Ausgangshypothese der Arbeit bedeutet dies, das zumindest ein Allel der Gene *APC* und *CTNNB1* und mit hoher wahrscheinlichkeit auch ein Allel des Gens für *CDH1*, in den Zytokeratin-positiven Zellen signifikant häufig deletiert ist, nicht aber für *CTNNA1* (D5S500 1,2Mb centromer von *CTNNA1*) und *JUP* (Marker D17S800 0,8Mb zentromer

von JUP). Am wenigsten häufig ist der Marker D5S399 (20%) auf 5q und die Marker D17S855 (27%) und D17S1322 (32%) auf 17q von Allelverlust betroffen.

Tabelle 19 Chromosomale Regionen der statistisch signifikant häufiger deletierten Marker für die Zytokeratin-positiven Zellen im Vergleich zum Kontrollkollektiv

	Region	
	Marker ^a	bp ^a
Chromosom 16	D16S3095-D16S511	68503731-80258795
Chromosom 5	rs42427 - D5S346 D5S615	112204224-112241523 125191192
Chromosom 3	D3S3518-D3S3624	33662359-46515925
Chromosom 17	D17S1868-D17S1161	44539852-53686418

^a Die Reihenfolge der Marker entspricht ihrer chromosomalen Lokalisation gemäß Build 35.1 des humanen Genoms [August 2004]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen; bp = Basenpaare

Eine definitive Aussage über den Funktionsverlust eines Gens für die Zelle ist durch LOH-Studien nur für den Fall des Verlustes beider Allele, einen so genannten homozygoten Allelverlust zu treffen. Bei homozygoter Deletion für einen intragenetischen Marker besitzt die Zelle keine vollständige Kopie des Gens mehr. Für keinen der analysierten Marker lässt sich aber für die Zytokeratin-positiven Zellen eine statistisch signifikante Zunahme der homozygoten Deletionen für einen Marker nachweisen (Tab. 20). Inwieweit sich der Verlust einer Kopie der untersuchten Gene auf Expressionsebene und Proteinebene, im Sinne einer Haploinsuffizienz auswirken, müssen weitere Studien zeigen.

Tabelle 20 Anteil homozygoter Deletionen an der Anzahl informativer Zellen für Kontroll- und Zytokeratin-positiven (Zk+) Zellen

Marker ^a	homozygote Deletionen		P-Wert ^b	
	Kontrollzellen	Zk+ Zellen		
relative Häufigkeit				
Chromosom 16	D16S3019	0/12	2/30	ns
	D16S3095	0/38	1/36	ns
	D16S485	2/38	13/78	ns
	D16S3066	2/37	2/67	ns
	D16S3138	1/27	1/66	ns
	D16S3040	1/26	1/49	ns
	D16S511	0/33	4/60	ns
Chromosom 5	D5S299	1/23	1/42	ns
	rs42427 (intragenetisch APC)	0/22	2/31	ns
	D5S346	1/34	1/61	ns
	D5S471	0/29	4/52	ns
	D5S592	0/19	4/65	ns
	D5S615	0/26	6/58	ns
	D5S2117	0/19	5/61	ns
	D5S816	2/30	3/93	ns
	D5S399	0/18	4/44	ns
	D5S500	1/24	0/45	ns
	D5S1360	1/32	3/53	ns
Chromosom3	D3S3518	0/22	0/55	ns
	β-Catenin Marker	0/20	0/28	ns
	D3S3624	0/22	0/49	ns
	D3S32	0/21	0/39	ns
	D3S1514	1/30	3/50	ns
Chromosom 17	D17S800	0/17	1/45	ns
	D17S855 (BRCA1 Intron 20)	0/34	1/48	ns
	D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	0/26	1/34	ns
	D17S1868	0/40	0/56	ns
	D17S943	0/24	2/59	ns
	D17S1161	1/45	2/81	ns

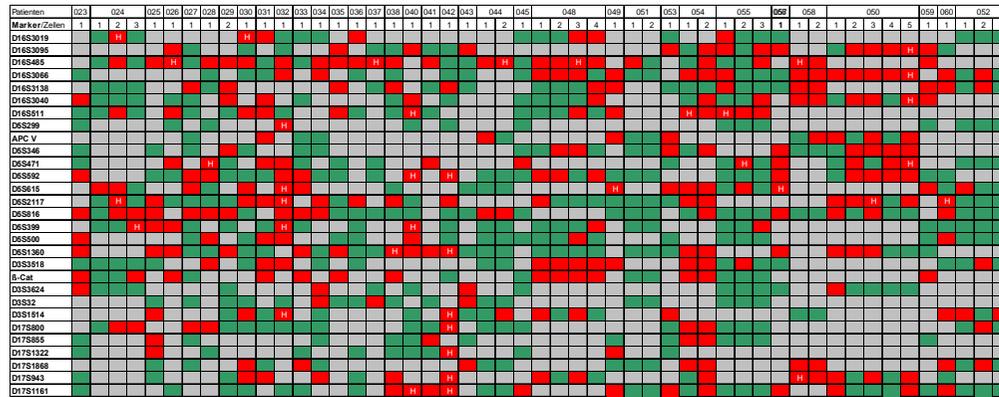
^a Die Reihenfolge der Marker entspricht ihrer chromosomalen Lokalisation gemäß Build 35.1 des humanen Genoms [August 2004]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen).

^b Die P Werte wurden mit dem Fisher`s exact Test berechnet und für multiples Testen korrigiert (FDR), ns=P>0.05

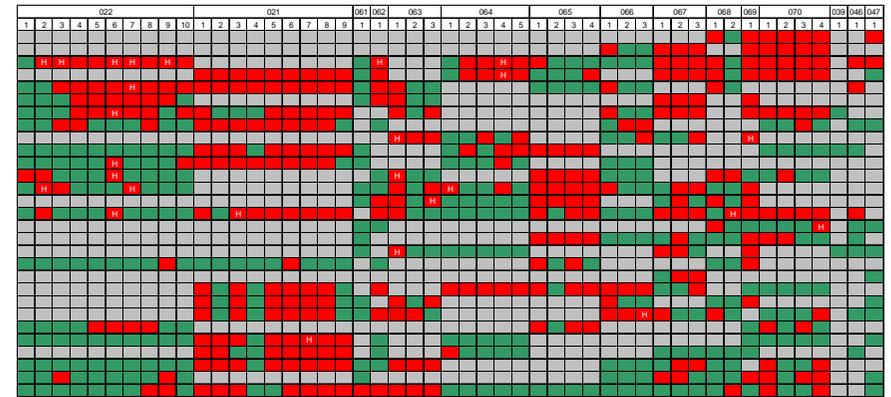
4.3.4 Analyse der Einzelzellen von Patienten im klinischen Stadium M0 und M1

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die Einzelzellen der Patienten im klinischen Stadium M0 und M1 (gemäß UICC) in ihrem Genotyp voneinander unterscheiden. Die Gruppe M0 setzt sich aus 52 Zellen von 35 Patienten, die Gruppe M1 aus 49 Zellen von 15 Patienten zusammen (Klinikopathologische Charakteristika Tab. VIII des Appendix). Für die Auswertung wurde die farbenkodierte Tabelle für die Zytokeratin-positiven Zellen (Abb. 20) entsprechend den klinischen Stadien (M0, M1) der Patienten angepaßt (Abb. 22).

M0-Patienten



M1-Patienten



■ Marker informativ und beide Allele amplifiziert

■ Marker nicht informativ

■ Marker informativ und nur ein Allel amplifiziert

■ H Marker informativ und kein Allel amplifiziert

Abbildung 22 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Polyacrylamid-Gel Electrophorese Experimente für die Zellen der Gruppen M0 und M1

Für die beiden Gruppen konnten 769 (M0), respektive 742 (M1) auswertbare Ereignisse bestimmt werden (Tab. 21).

Tabelle 21 Zusammenfassung der Genotypisierung für die Zellen der Gruppen K (Kontrollzell-Kollektiv), M0 und M1

	Kontrollzell-Kollektiv	Gruppe M0	Gruppe M1
Anzahl Patienten je Gruppe	22	35	15
Anzahl Zellen je Gruppe	54	52	49
Anzahl auswertbarer PCR-Experimente	788	769	742
Anzahl amplifizierter Allele	1435	1170	1096
Anzahl auswertbarer PCR-Experimente mit Allelverlust	129	327	362

Vergleicht man die Gruppen bezüglich der prozentualen Allelverlust-Häufigkeit, so findet sich für die Zellen der Gruppen M0 und M1 ein hochsignifikanter Unterschied im Vergleich zum Kontrollkollektiv: M0=0,43 ± 0,21 (Mittelwert, SD), M1=0,47 ± 0,25 (Mittelwert, SD) und K=0,2 ± 0,199 (Mittelwert, SD), P=0,001 (Mann-Whitney Rangsummen Test). Für M1 Zellen lässt sich zwar eine größere, relative Allelverlust-Häufigkeit als für M0 Zellen nachweisen, der Unterschied erreicht aber statistisch keine Signifikanz (P=0,427, Mann-Whitney Rangsummen Test; Abb. 22).

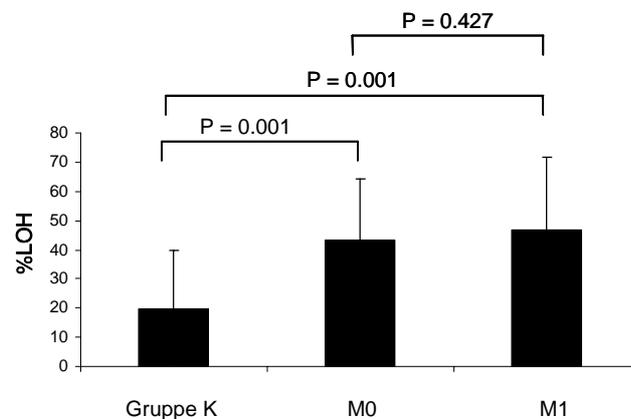


Abbildung 22 Prozentuale Allelverlust-Häufigkeit der Gruppe K, sowie der Gruppen M0 und M1

Die P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney Rangsummen Test berechnet

Betrachten wir nun die Ergebnisse der individuellen Marker: Sieben Marker sind sowohl für M0 Zellen, als auch für M1 Zellen signifikant häufiger deletiert, als dies für das Kontrollkollektiv der Fall ist (Tabelle 22). Die durch diese Marker definierten, chromosomalen Bereiche umfassen für den Chromosomenarm 16q die von den Markern D16S3019 und D16S3138 flankierten Bereich und die untersuchte Region telomer des Markers D16S3138 (D16S3040 und D16S511). Für 5q ist nur der intragenetische Marker für das *APC*-Gen (rs42427), für den Chromosomenarm 17q der Marker D17S1868 signifikant häufig in beiden Gruppen deletiert. Für den untersuchten Bereich auf Chromosomenarm 3p lassen sich keine gemeinsamen, deletierten Regionen definieren. Für die in beiden Gruppen gemeinsam deletierten Regionen der Chromosomenarme 16q, 5q und 17q darf angenommen werden, daß sich diese Mutationen vor der Progression der Erkrankung in einen metastatischen Phänotyp (M1) manifestierten. Die Marker D5S615, D3S1518, der intragenetische beta-Catenin Marker, sowie der Marker D17S943 sind ausschließlich nur in der Gruppe der M0-Zellen deletiert. Für M1 Zellen sind neben den beschriebenen, gemeinsamen Deletionen mit der Gruppe M0 zusätzlich die Marker D16S3019, D16S3138, D5S299, D5S346, die Marker auf Chromosomenarm 3p D3S3624 und D3S32, sowie der Marker D17S1161 auf Chromosomenarm 17q signifikant häufiger deletiert, als dies im Kontrollkollektiv der Fall ist. Der Unterschied in der Allelverlust-Häufigkeit erreicht aber für keinen der untersuchten Marker im Vergleich der Gruppen M0 und M1 statistische Signifikanz ($P > 0.05$, Fisher's exakt Test, korrigiert für multiples Testen (FDR), Tabelle 22).

Tabelle 22 Statistischer Vergleich der M0 und M1 Zellen mit dem Kontrollkollektiv bezüglich der Allelverlust-Häufigkeit für die einzelnen Marker

Marker und Gene ^a		Lokalisation (bp) ^a	P-Werte ^b			
			Zellen von M0-Patienten im Vergleich mit Kontrollzellen	Zellen von M1-Patienten im Vergleich mit Kontrollzellen	Zellen von M0-Patienten im Vergleich zu Zellen von M1-Patienten	
Chromosom 16	D16S3019	64686681	0.509	0.016 **	0.174	
	E-Cadherin (CDH1)	67328696-67426945				
	D16S3095	68503731	0.022 **	0.029 **	0.626	
	D16S485	70292497	0.029 **	0.015 **	1.000	
	D16S3066	71887336	0.029 **	0.010 **	0.181	
	D16S3138	76161268	0.108	0.007 **	0.568	
	D16S3040	78209120	0.042 **	0.006 **	0.643	
	D16S511	80258795	0.038 **	0.005 **	0.622	
	D5S299	101675106	1.000	0.024 **	0.145	
	rs42427 (intragenetisch von APC)	112204224	0.035 **	0.017 **	1.000	
Chromosom 5	APC	112101483-112209835				
	D5S346	112241523	0.051	0.036 **	1.000	
	D5S471	119076934	0.149	0.204	1.000	
	D5S592	119129568	0.371	0.571	1.000	
	D5S615	125191192	0.033 **	0.094	1.000	
	D5S2117	133065027	0.365	0.386	1.000	
	D5S816	135329409	0.422	0.099	0.649	
	D5S399	135991437	1.000	1.000	1.000	
	D5S500	137874849	0.242	0.031 **	0.719	
	α-Catenin (CTNNA1)	138117006-138298622				
	D5S1360	144877829	0.152	1.000	0.647	
	Chromosom3	D3S3518	33662359	0.017 **	0.247	0.387
		β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron 7)	41231926	0.010 **	0.093	1.000
		β-Catenin (CTNNB1)	41216004-41256938			
		D3S3624	44588821	0.250	0.004 **	0.203
D3S32		46515925	1.000	0.039 **	0.238	
D3S1514		58193152	0.232	0.095	1.000	
Chromosom 17	D17S800	36309949	0.535	0.115	0.682	
	Plakoglobin (JUP)	37164390-37196475				
	D17S855 (BRCA1 Intron 20)	38458270	0.356	0.397	1.000	
	D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	38468875	0.431	0.119	1.000	
	D17S1868	44539852	0.015 **	0.004 **	1.000	
	D17S943	45195357	0.015 **	0.216	0.558	
	D17S1161	53686418	0.067	0.033 **	1.000	

^a Die Reihenfolge der Marker entspricht ihrer chromosomalen Lokalisation gemäß Build 35.1 des humanen Genoms [August 2004]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen).

^b Die P Werte wurden mit dem Fisher's exact Test berechnet und für multiples Testen korrigiert (FDR)

** kennzeichnet die P-Werte, die unter einem Signifikanzniveau von 0.05 liegen

Durch die bekannte, genomische Lokalisation der Mikrosatellitenmarker lassen sich chromosomale Regionen definieren, die für Zytokeratin-positve Zellen der Patientinnen im Klinischen Stadium M0 oder M1 signifikant häufig deletiert sind (Tabelle 23).

Tabelle 23 Chromosomale Bereiche der signifikant häufig deletierten Marker (im Vergleich zum Kontrollkollektiv) für die Zellen der Gruppen M0 und M1

		Region	
		Marker ^a	bp ^a
gemeinsame Aberrationen	Chromosom 16	D16S3095-D16S3066 D16S3040-D16S511	68503731-71887336 78209120-80258785
	Chromosom 5	rs42427(intragenetisch APC)	112204224
	Chromosom 3	keine gemeinsamen Deletionen	
	Chromosom 17	D17S1868	44539852
signifikant häufiger für M1	Chromosom 16	D16S3019-D16S3095 D16S3066-D16S3040	64686681- 68503731 71887336-78209120
	Chromosom 5	D5S299 - rs42427 rs 42427 - D5S471 D3S5399-D5S1360	101675106-112204224 112204224-119076934 135991437-144877829
	Chromosom 3	β-Catenin (CTNNB1) Marker-D3S32	41231926-46515925
	Chromosom 17	D17S1161	53686418
	Chromosom 5	D5S615	125191192
signifikant häufiger für M0	Chromosom 3	D3S3518-β-Catenin (CTNNB1) Marker	33662359-41231926
	Chromosom 17	D17S943	45195357

^a Die chromosomalen Lokalisation der Marker ist gemäß Build 35.1 des humanen Genoms (August 2004) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen; bp = Basenpaare

4.3.5 Analyse der Einzelzellen entsprechend ihres CGH-Profiles

Die Ergebnisse der CGH-Analysen (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003) der untersuchten Einzelzellen und das klinische Stadium der Patienten zum Zeitpunkt der Knochenmarkspunktion (M0, M1), ermöglichten eine weitere Unterteilung der Zytokeratin-positiven Zellen in die drei Gruppen A, B und C (Abb. 15). Hintergrund dieser Unterteilung ist die Fragestellung gewesen, ob sich für die Zytokeratin-positiven Einzelzellen, für die ein normales CGH-Profil bestimmt wurde durch das hochauflösende Verfahren der Mikrosatellitenanalyse Deletionen nachweisen lassen, die ein deutlicher Hinweis auf die maligne Natur dieser Zellen wäre. Ein breiter Konsens besteht darüber, daß es während der Tumorentwicklung zur Akkumulation von Mutationen kommt. Insbesondere nach einem als „telomere Krise“ bezeichneten Punkt der Entwicklung, kommt es zum vermehrten Auftreten von strukturellen Chromosomenaberrationen, die sich mit der Methode der CGH nachweisen lassen. Sollten sich für die CGH-normalen Zellen subchromosomale Veränderungen nachweisen lassen, würde man diese als frühe Mutationen auf der Zeitachse der Tumorentwicklung betrachten. Die Ergebnisse der PAGE-Analysen der Zellen für die einzelnen Gruppen wurde wieder in der farbkodierten Darstellung aufbereitet (Abb. 23).

Gruppe A

Gruppe B

Gruppe C



■ Marker informativ und beide Allele amplifiziert

□ Marker nicht informativ

■ Marker informativ und nur ein Allel amplifiziert

■ H Marker informativ und kein Allel amplifiziert

Abbildung 23

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Polyacrylamid-Gel Electrophorese Experimente für die Patienten-Zellen der Gruppen A, B und C

Neben 788 auswertbaren Ereignissen für das Kontrollzellkollektiv, konnten für die Gruppe A 590, für die Gruppe B 220 und für die Gruppe C 701 auswertbare Ereignisse analysiert werden (Tab. 24).

Tabelle 24 Zusammenfassung der Genotypisierung für die Zellen, der Gruppen K, A, B und C

	Kontrollzell-Kollektiv	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Anzahl Patienten je Gruppe	22	33	9	12
Anzahl Zellen je Gruppe	54	41	15	45
Anzahl auswertbarer PCR-Experimente	788	590	220	701
Anzahl amplifizierter Allele	1435	920	322	1035
Anzahl auswertbarer PCR-Experimente mit Allelverlust	129	233	105	351

Betrachtet man die durchschnittliche, prozentuale Allelverlust-Häufigkeit der Zellen, so lassen sich sowohl für CGH-normale Zellen (Gruppe A), als auch für die Zellen mit verändertem CGH-Profil (Gruppe B+C) signifikant häufiger Allelverluste nachweisen, als dies für das Kontrollzellkollektiv der Fall ist ($K=0,2 \pm 0,199$ (Mittelwert; SD), $A=0,376 \pm 0,174$ (Mittelwert; SD); $B+C=0,51 \pm 0,268$ (Mittelwert; SD); $P<0,05$, Mann-Whitney Rangsummen Test)(Abb. 24 A). Während im Vergleich der Zellen von Patienten im klinischen Stadium M0 und M1 keine signifikante Zunahme der Allelverlust-Häufigkeit je Zelle insgesamt nachgewiesen werden konnte (durchschnittliche PLOH M1 vs. M0, $P=0,427$ Mann-Whitney Rangsummen Test), lassen sich mit dem Auftreten größerer, struktureller Chromosomenaberrationen, die u.a. in den CGH-Analysen nachzuweisen sind, signifikant häufiger Allelverluste nachweisen als dies für CGH-normale Zellen der Fall ist.

Separiert man die Zellen mit CGH-Veränderungen gemäss dem klinischen Stadium der Patienten (M0 und M1) in die Gruppen B und C, so weisen diese ebenfalls eine signifikant größere, durchschnittliche prozentuale Allelverlust-Häufigkeit auf, als die Zellen des Kontrollkollektivs (Mittelwerte: Gruppe $K=0,2$, $B=0,521$, $C=0,499$; $P<0,05$, Mann-Whitney Rangsummen Test; Abb. 24 B). Im Paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen finden sich für die Zellen der Gruppen B und C signifikant häufiger Allelverluste ($P<0,05$, Mann-Whitney Rangsummen Test), als für Zellen der Gruppe A.

Die Zellen der Gruppe B und C unterscheiden sich hinsichtlich der prozentualen Allelverlust-Häufigkeit statistisch nicht signifikant von einander ($P=0,769$, Mann-Whitney Rangsummen Test, Abb. 24 C).

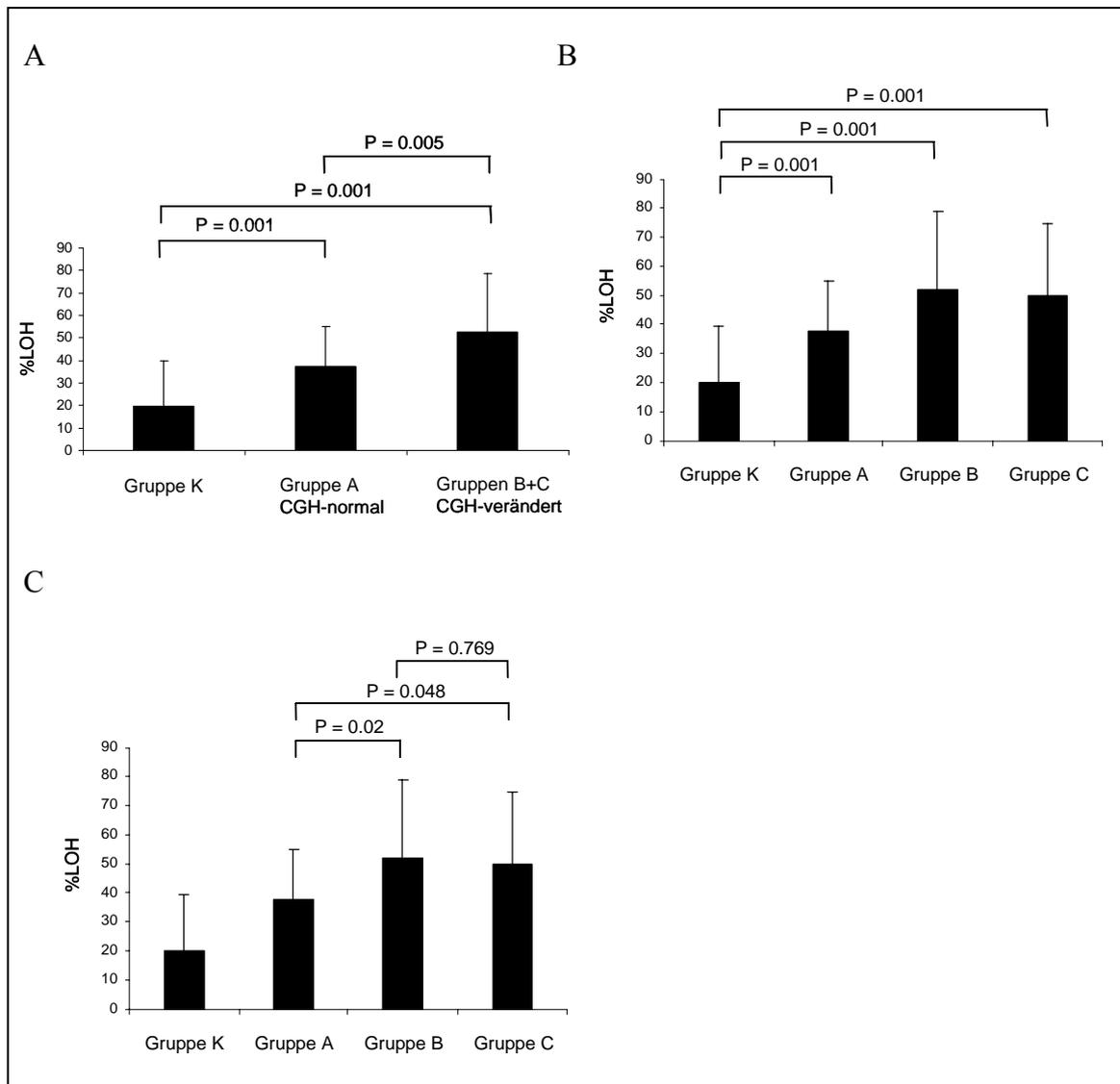


Abbildung 24 Vergleich der durchschnittlichen, prozentualen Allelverlust-Häufigkeit der Gruppe K, der CGH-normalen Zellen(Gruppe A) und den Zellen mit CGH-Veränderungen (Gruppen B+C)

Die Zellen mit CGH-Veränderungen zeigen eine signifikant größere, durchschnittliche Allelverlusthäufigkeit als die Gruppe der CGH-normalen Zellen (A). Die Gruppen A, B und C weisen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant größere, durchschnittliche Allelverlusthäufigkeit auf (B). Die Allelverlusthäufigkeit der Gruppen B und C unterscheidet sich nicht signifikant von einander (C). Die P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney Rangsummen Test berechnet

Betrachtet man die Ergebnisse für den einzelnen Marker, so zeigt sich, daß für die Gruppen A,B und C gemeinsam nur der Marker D16S485 auf Chromosomenarm 16q signifikant häufiger deletiert ist, als dies für das Kontrollkollektiv der Fall gewesen ist. Für die Zellen der Gruppe A weisen außerdem nur noch die beiden Marker D3S3518 und der intragenetische beta-Catenin Marker signifikant häufige Deletionen auf. Für die Zellen der Gruppe B sind auf dem untersuchten Abschnitt des Chromosomenarms 16q zwei diskontinuierliche Bereiche (D16s3485 bis D16S485 und D16S3040 bis D16S511), für sie Zellen der Gruppe C alle untersuchten Marker für 16q signifikant häufig deletiert. Die Zellen der Gruppe B weisen nur noch für die Marker D5S346 und D17S1868 signifikant häufige Deletionen auf. Für die Zellen der Gruppe C lassen sich zusätzlich zu den in Gruppe B beschriebenen Abberationen signifikante Deletionen für die Marker D5S299, rs42427 und D5S500 auf dem Chromosomenarm 5q, sowie für die Marker D3S3624 und D3S32 auf dem Chromosomenarm 3p nachweisen. Für keinen der untersuchten Marker besteht statistisch eine signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen A, B und C zueinander (Tab. 25). Der P-Wert (korrigiert für multiples Testen) für den Marker D17S943 ($P=0,05$) erreicht in der Gruppe B im Vergleich zum Kontrollkollektiv fast statistische Signifikanz. In der Gruppe C liegen die P-Werte (korrigiert für multiples Testen) für den beta-Catenin Marker ($P=0,058$), D3S1514 ($P=0,053$) und D17S1161 ($P=0,05$) nur wenig über dem vordefinierten Signifikanzniveau von $P<0,05$.

Tabelle 25 Statistischer Vergleich der Gruppen A, B und C mit dem Kontrollkollektiv bezüglich der Allelverlust-Häufigkeit für die einzelnen Marker

Chromosom	Marker und Gene ^a	Lokalisation (bp) ^a	P-Werte ^b						
			Gruppe A im Vergleich mit Gruppe K	Gruppe B im Vergleich mit mit Gruppe K	Gruppe C im Vergleich mit Gruppe K	Gruppe A im Vergleich mit Gruppe B	Gruppe A im Vergleich mit Gruppe C	Gruppe B im Vergleich mit Gruppe C	
Chromosom 16	D16S3019	64686681	0,424	1,000	0,017 **	1,000	0,283	0,280	
	E-Cadherin (CDH1)	67328696-67426945							
	D16S3095	68503731	0,321	0,029 **	0,029 **	0,718	0,247	1,000	
	D16S485	70292497	0,029 **	0,029 **	0,015 **	1,000	1,000	1,000	
	D16S3066	71887336	0,198	0,051	0,010 **	1,000	0,261	1,000	
	D16S3138	76161268	0,203	0,161	0,007 **	1,000	0,712	0,978	
	D16S3040	78209120	0,449	0,015 **	0,006 **	0,522	0,236	0,864	
	D16S511	80258795	0,297	0,017 **	0,005 **	0,338	0,109	1,000	
	Chromosom 5	D5S299	101675106	1,000	1,000	0,010 **	1,000	0,135	0,348
		rs42427 (intragenetisch von APC)	112204224	0,203	0,097	0,016 **	1,000	1,000	1,000
APC		112101483-112209835							
D5S346		112241523	0,605	0,015 **	0,017 **	0,406	0,426	0,874	
D5S471		119076934	0,327	0,350	0,194	1,000	1,000	1,000	
D5S592		119129568	0,643	0,393	0,389	1,000	1,000	1,000	
D5S615		125191192	0,160	0,196	0,078	1,000	1,000	1,000	
D5S2117		133065027	0,818	0,194	0,386	0,632	0,899	0,895	
D5S816		135329409	0,472	0,973	0,081	1,000	0,881	0,944	
D5S399		135991437	0,815	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
D5S500		137874849	0,278	0,760	0,022 **	1,000	0,858	1,000	
α-Catenin (CTNNA1)		138117006-138298622							
D5S1360		144877829	0,583	0,087	0,747	0,546	1,000	0,928	
Chromosom3		D3S3518	33662359	0,015 **	0,321	0,398	0,986	0,160	1,000
	β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron 7)	41231926	0,010 **	0,189	0,058	1,000	1,000	1,000	
	β-Catenin (CTNNB1)	41216004-41256938							
	D3S3624	44588821	0,174	1,000	0,004 **	0,888	0,316	0,087	
	D3S32	46515925	1,000	1,000	0,035 **	1,000	0,238	0,916	
	D3S1514	58193152	0,536	0,431	0,053	1,000	0,773	1,000	
Chromosom 17	D17S800	36309949	0,606	1,000	0,104	1,000	0,763	1,000	
	Plakoglobin (JUP)	37164390-37196475							
	D17S855 (BRCA1 Intron 20)	38458270	0,773	0,426	0,278	1,000	1,000	1,000	
	D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	38468875	0,551	1,000	0,069	1,000	0,899	1,000	
	D17S1868	44539852	0,094	0,010 **	0,004 **	1,000	1,000	0,943	
	D17S943	45195357	0,081	0,050	0,212	1,000	0,807	0,996	
	D17S1161	53686418	0,150	0,350	0,050	1,000	1,000	1,000	

^a Die Reihenfolge der Marker entspricht ihrer chromosomalen Lokalisation gemäß Build 35.1 des humanen Genoms [August 2004]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen).

^b Die P Werte wurden mit dem Fisher's exact Test berechnet und für multiples Testen korrigiert (FDR)

** kennzeichnet die P-Werte, die unter einem Signifikanzniveau von 0.05 liegen

Durch die Lokalisation der einzelnen Marker lassen sich die chromosomalen Bereiche definieren, die für Zellen der einzelnen Gruppen A, B und C signifikant häufiger von Allelverlust betroffen sind, als dies für das Kontrollzellkollektiv der Fall gewesen ist (Tab. 26).

Tabelle 26 Chromosomale Regionen mit den, im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant häufiger deletierten Markern der Gruppen A, B und C

		Region	
		Marker ^a	bp ^a
Gruppe A	Chromosom 16	D16S485	70292497
	Chromosom 3	D3S3518 - beta-Catenin (intragenetisch CTNNB1)	33662359-41231926
Gruppe B	Chromosom 16	D16S3095-D16S485	68503731-70292497
		D16S3040-D16S511	78209120-80258795
	Chromosom 5	D5S346	112241523
	Chromosom 3	keine signifikanten Deletionen	
	Chromosom 17	D17S1868	44539852
Gruppe C	Chromosom 16	D16S3019-D16S511	64686681- 80258795
	Chromosom 5	D5S299 - D5S346	101675106-112241523
		D5S500	137874849
	Chromosom 3	D3S3624-D3S32	44588821-46515925
Chromosom 17	D17S1868	44539852	
gemeinsame Aberrationen der Gruppen A, B und C	Chromosom 16	D16S485	70292497

^a Die chromosomalen Lokalisation der Marker ist gemäß Build 35.1 des humanen Genoms (August 2004) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen; bp = Basenpaare

Die Ergebnisse der Genotypisierung für die einzelnen untersuchten Gruppen (Zusammenfassung Tab. 27) soll im Folgenden Kapitel im Kontext der relevanten Literatur diskutiert werden.

Tabelle 27 Zusammenfassung der signifikanten Allelverluste der analysierten Patientengruppen

Marker ^a	Lokalisation (bp) ^a	Zytokeratin-positive Zellen	Gruppen				
			M0	M1	A	B	C
Chromosom 16 D16S3019 E-Cadherin (CDH1) D16S3095 D16S485 D16S3066 D16S3138 D16S3040 D16S511	64686681	○	○	●	○	○	●
	67328696-67426945						
	68503731	●	●	○	●	●	
	70292497	●	●	●	●	●	
	71887336	●	●	○	○	●	
	76161268	●	○	○	○	●	
	78209120	●	●	○	○	●	
	80258795	●	●	○	●	●	
Chromosom 5 D5S299 rs42427 (intragenetisch APC) D5S346 D5S471 D5S592 D5S615 D5S2117 D5S816 D5S399 D5S500 α-Catenin (CTNNA1) D5S1360	101675106	○	○	●	○	○	●
	112204224	●	●	○	○	●	●
	112241523	●	○	○	●	○	●
	119076934	○	○	○	○	○	○
	119129568	○	○	○	○	○	○
	125191192	●	●	○	○	○	○
	133065027	○	○	○	○	○	○
	135329409	○	○	○	○	○	○
	135991437	○	○	○	○	○	○
	137874849	○	○	○	○	○	○
	138117006-138298622						
	144877829	○	○	○	○	○	○
	Chromosom 3 D3S3518 β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron7) D3S3624 D3S32 D3S1514	33662359	●	●	○	●	○
41231926		●	●	○	●	○	○
44588821		●	○	○	○	○	●
46515925		○	○	○	○	○	○
58193152		○	○	○	○	○	○
Chromosom 17 D17S800 Plakoglobin (JUP) D17S855 (BRCA1 Intron 20) D17S1322 (BRCA1 Intron 19) D17S1868 D17S943 D17S1161	36309949	○	○	○	○	○	
	37164390-37196475						
	38458270	○	○	○	○	○	
	38468875	○	○	○	○	○	
	44539852	●	●	○	○	○	
	45195357	●	○	○	○	○	
	53686418	●	○	○	○	○	

^a Die Reihenfolge der Marker entspricht ihrer chromosomalen Lokalisation gemäß Build 35.1 des humanen Genoms [August 2004]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen).

- bezeichnet eine signifikant grössere Allelverlust-Häufigkeit (P<0.05, korrigiert für multiples Testen) im Vergleich zum Kontrollkollektiv
- Allelverlust-Häufigkeit erreicht im Vergleich mit dem Kontroll-Kollektiv keine statistische Signifikanz

5. Diskussion

Zu Beginn der Arbeit wurden die geeigneten Marker zur Genotypisierung bestimmt und die spezifischen PCR-Bedingungen für die entsprechenden Mikrosatelliten und RFLPs (*Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen*) etabliert. Ein wesentliches Kriterium zur Auswahl der Marker ist die Lokalisation in der Nachbarschaft der zu analysierenden Gene *CTNNA1*, *CTNNB1*, *CDH1*, *JUP* und *APC* gewesen. Für das in der Studie verwendete Markerkollektiv wurden insgesamt 76 Marker für die vier chromosomalen Regionen 5q21-31.3 (*APC* und *CTNNA1*), 3p14.3-22 (*CTNNB1*), 16q22.1-23.1 (*CDH1*) und 17q21.31-22 (*JUP*) getestet. Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde jeder Marker mit drei verschiedenen Annealing-Temperaturen für Einzelzellen und Positiv-Kontrollen (gepoolte DNA) getestet. Für 29 Marker konnten die Bedingungen soweit optimiert werden, daß nur ein spezifisches PCR-Produkt nachweisbar gewesen ist. Dabei zeigte sich, daß insbesondere die Etablierung der Marker für den Chromosomenarm 3p vergleichsweise schwierig war. Bei nur fünf von 21 getesteten Markern gelang die Testentwicklung. Für alle Primer wurden die in Kapitel 4.2 beschriebenen Kriterien zum Primerdesign berücksichtigt. Der genaue Grund für die geringe Effizienz der Markeretablierung auf dem Chromosomenarm 3p konnte in der Arbeit nicht eindeutig eruiert werden.

Der nächste Schritt bestand in der Validierung der Methode. Dazu wurde der Genotyp der 29 Marker für 54 Zytokeratin-negative Kontrollzellen bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die Amplifikation des Einzelzellgenoms in der Primären PCR und anschließenden Reamplifikation nicht vollständig erfolgte. Unter der Annahme, daß es sich bei den Zytokeratin-negativen Zellen um normale Zellen, ohne genetische Abberationen handelt, betrug die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit P für einen artefiziellen, durch die Methode bedingten Allelverlust 0,16. Der Nachweis eines Allelverlustes für einen spezifischen Marker in einer Zytokeratin-positiven Zelle ist demzufolge immer mit einer relativen Fehlerwahrscheinlichkeit behaftet. Diese variiert für den individuellen Marker im Kontrollkollektiv zwischen 0,05 (Marker D3S3624 und D3S3518) und 0,32 (Marker D5S2117). Als mögliche Ursachen für diese Variabilität wurden die Länge des PCR-Produktes, die Länge des genomischen *MseI*-Fragmentes, welches den Polymorphismus enthält und die Art des Polymorphismus (Di-, Tri-, Tetranukleotid-, oder RFLP) untersucht. Für keine dieser Einflußgrößen konnte aber ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der relativen Allelverlusthäufigkeit des betreffenden Markers hergestellt werden. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen

Allelverlusthäufigkeiten der Marker könnte darin bestehen, daß die genomischen Abschnitte, die den entsprechenden Marker beinhalten, heterochromatisch bzw. mit reichlich DNA-bindenden Proteinen besetzt sind und nicht vollständig von Proteinase K im Verfahren der primären PCR verdaut werden. In diesem Fall wären die MseI-Schnittstellen für die Endonuklease MseI nur schwer zugänglich. Die Folge wären große MseI-Fragmente, die in der primären PCR schlechter amplifiziert werden. Dies mag bei Methoden mit geringerer Auflösung wie der comparativen genomischen Hybridisierung (Nachweis von Deletionen und Amplifikationen ab 10Mb) weniger ins Gewicht fallen, ist aber für das hochauflösende Verfahren zur Genotypisierung von Relevanz. Welche Gründe letztlich für die unterschiedlichen Häufigkeiten an artifiziellen Allelverlusten der Marker eine Rolle spielen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Trotz der eingeschränkten Aussagekraft, den Allelverlust einer individuellen Zelle zweifelsfrei festzustellen, lassen sich unter der Berücksichtigung der Ergebnisse am Kontrollkollektiv valide Aussagen über die Häufigkeit von Allelverlusten für die individuellen Marker innerhalb der analysierten Gruppen für die Zytokeratin-positiven Zellen treffen.

Eine wichtige Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der untersuchten Gruppen mit dem Kontrollkollektiv war, daß sich die Gruppen bezüglich der Informativität der Marker, nicht wesentlich unterscheiden. Bei über- beziehungsweise unterdurchschnittlicher Markerinformativität zweier zum Vergleich bestimmter Gruppen würde man im ersteren Fall deutlich mehr Ereignisse zur Auswertung erhalten als für Letzteren, was die statistische Analyse und die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen könnte. Keine der untersuchten Gruppen zeigte aber im Vergleich zum Kontrollkollektiv einen statistisch signifikanten Unterschied in der durchschnittlichen Markerinformativität. Diese variiert im Mittel zwischen 0,49 (Gruppe B) und 0,56 (Gruppe C) für die einzelnen Gruppen. Die Kontrollgruppe zeigt eine durchschnittliche Markerinformativität von 0,50. Für die Gruppen M0 und M1 besteht kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Markerinformativität (0,54 und 0,51 respektive; $P=0,618$, Wilcoxon Rangsummen Test), eben so wenig wie für die Gruppen A, B und C. Alle untersuchten Patientengruppen sind Bestandteil der Gruppe der Zytokeratin-positiven Zellen. Als Gesamtgruppe betrachtet unterscheidet sich diese in der durchschnittlichen Markerinformativität nicht signifikant vom Kontrollkollektiv (0,53 vs. 0,50; $P=0,575$, Wilcoxon Rangsummen Test).

Für die individuellen Marker besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Informativität zwischen den Gruppen. Die Erkenntnisse aus den Experimenten

am Kontrollkollektiv und die Vergleichbarkeit der Gruppen hinsichtlich der Markerinformativität ermöglichten die Analyse der Zytokeratin-positiven Patientenzellen und die statistische Auswertung der Ergebnisse zur Genotypisierung.

5.1 Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen mit dem Kontrollzellkollektiv

LOH für E-Cadherin, alpha-, beta-Catenin , Plakoglobin und APC

Vor dem Hintergrund, daß Gürteldesmosomen entscheidend für die Organarchitektur und den mechanischen Zusammenhalt epithelialer Gewebe sind, stellte sich als Ausgangsfrage der Arbeit, ob Verluste genetischen Materials im Bereich der Gene (*CDH1*, *CTNNA1*, *CTNNB1*, *JUP* und *APC*), die an dem Aufbau und der Regulation von Gürteldesmosomen beteiligt sind, in den einzelnen Zytokeratin-positiven Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen nachzuweisen sind. Dies würde einen Hinweis dafür liefern, daß dieser Typ des Interzellulärkontaktes, in den Zytokeratin-positiven Zellen möglicherweise gestört ist und somit ursächlich an der Disseminierung der Zellen beteiligt sein könnte.

Neben den intragenetischen Markern für *APC* (rs42427) und *CTNNB1* (beta-Catenin Marker) besitzen die Marker in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Genen *CDH1* (D16S3095, 1,2 Megabasen telomer gelegen), *CTNNA1* (D5S500, 0,3 Megabasen zentromer) und *JUP* (D17S800, 0,8 Megabasen zentromer gelegen) die größte Aussagekraft über das mögliche Fehlen eines Allels der bezeichneten Gene. Tatsächlich sind die intragenetischen Marker für *CTNNB1* und *APC*, sowie der in der Nachbarschaft zum *CDH1* gelegene Marker D16S3095 für die Zytokeratin-positiven Zellen, im Vergleich zum Kontrollzellkollektiv signifikant häufiger deletiert.

Die Marker, in Nachbarschaft zu den Genen *CTNNA1* (D5S500) und *JUP* (D17S800) sind hingegen nicht signifikant häufig deletiert. *JUP* ist in den Gürteldesmosomen durch *CTNNB1* physiologischer Weise austauschbar. In Brustkrebskrebsgewebe mit Deletion des Chromosomenarms 17q konnten weder Mutationen noch eine Promoterhypermethylierung des verbliebenen Allels für *JUP* nachgewiesen werden. Dennoch zeigten Bukholm et al, daß Plakoglobin in metastatischem Brustkrebsgewebe immunhistochemisch nicht mehr nachweisbar gewesen ist (Bukholm, Nesland et al. 1998; Bukholm, Nesland et al. 2000).

Über die möglicherweise eingeschränkte Funktion der Gene ist allein auf Grund des Verlustnachweises einer Genkopie noch keine definitive Aussage zu treffen. Am sichersten ist eine Aussage im Falle einer homozygoten Deletion der betreffenden, chromosomalen Region zu machen. Weder für die beiden intragenetischen Marker (beta-Catenin Marker, rs42427), noch für die übrigen Marker (D16S3095, D5S500 und D17S800) konnte ein statistisch signifikant vermehrtes Auftreten homozygoter Deletionen im Vergleich zum Kontrollkollektiv nachgewiesen werden. Zur Beantwortung der Frage, inwieweit die Funktion von CDH1, CTNNA1, CTNNB1 JUP und APC durch den Verlust einer Genkopie beeinträchtigt ist, wären unter anderem immunzytochemische Studien (Doppelfärbungen), Analysen, die den Allelverlust mit der Expression der entsprechenden Gene korrelieren, sowie Mutationsanalysen des verbliebenen Allels, insbesondere im Fall der lobulären Mammakarzinome für *CDH1* notwendig. Insbesondere für das lobuläre Mammakarzinom sind Mutationen im *CDH1* Gen in bis zu 60% der untersuchten Fälle beschrieben (Cleton-Jansen 2002). Immunhistochemische Studien an Brustkrebsgewebe zeigten für die Catenine eine verminderte oder gar fehlende Expression (Pierceall, Woodard et al. 1995; Zschiesche, Schonborn et al. 1997; Bukholm, Nesland et al. 1998; Dillon, D'Aquila et al. 1998; Gonzalez, Pinder et al. 1999). Für APC sind Mutationen in Brustkrebs beschrieben: In einem Kollektiv von 471 Brustkrebspatientinnen konnte in 7,9% der Patientinnen mit BRCA1/2 Mutationen eine I1307K Mutation des APC-Gens nachgewiesen werden (Gershoni-Baruch, Patael et al. 2000). In einer weiteren Arbeit konnte in 18% der Brustkrebstumoren sporadische Mutationen des APC Gens nachgewiesen werden (Furuuchi, Tada et al. 2000). Mutationen für CTNNB1 und JUP bei Brustkrebs sind in der Literatur nicht belegt. Eine Studie an Gewebe von 54 Brustkrebstumoren konnte keine Mutationen in der N-terminalen Region von beta-Catenin nachweisen.

Es ist durchaus denkbar, daß das verbliebene Allel, zumindest für CDH1 und APC in einigen Zellen mit nachgewiesenem Allelverlust mutiert oder methyliert ist. Eine Methode zum Nachweis von Punktmutationen in Einzelzellen wurde bereits für die Analyse des p53 Genes etabliert (Klein, Blankenstein et al. 2002).

Zusammenfassend gilt für die Zytokeratin-positiven Zellen, daß die Gene *CTNNB1* und *APC*, sowie der Marker in unmittelbarer Nachbarschaft zu *CDH1* (D16S3095) signifikant häufiger von Allelverlusten betroffen sind als dies von den Studien am Kontrollkollektiv her erwartet werden konnte. Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis dafür, daß ein gestörter Aufbau von Gürteldesmosomen eine Rolle für die Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark spielen kann. In den folgenden

Abschnitten sollen die Ergebnisse der Genotypisierung der Gruppe der Zytokeratin-positiven Zellen und deren Untergruppen bezüglich der einzelnen, chromosomalen Regionen gesondert besprochen werden.

LOH für Chromosomenarm 16q

Der Chromosomenarm 16q ist einer der am häufigsten von Allelverlusten (LOH) betroffenen chromosomalen Regionen in Brustkrebstumoren. Die Häufigkeit variiert je nach Studie zwischen 36% und 67% (Cleton-Jansen, Moerland et al. 1994; Dorion-Bonnet, Mautalen et al. 1995; Caligo, Polidoro et al. 1998; Cleton-Jansen, Callen et al. 2001). Häufige Allelverluste für 16q sind auch für das Prostatakarzinom, Lungenkrebs und das hepatozelluläre Karzinom beschrieben (Suzuki, Komiya et al. 1995; Godfrey, Cher et al. 1997; Chou, Chung et al. 1998; Sato, Mori et al. 1998).

Zytogenetische Studien deuten darauf hin, daß es sich bei LOH auf 16q um ein frühes Ereignis in der Entstehung von Brustkrebs handelt, da LOH auf 16q in Tumoren mit wenigen oder als einzige, nachzuweisende Veränderung gefunden werden (Pandis, Heim et al. 1992; Hulten, Hill et al. 1993). Außerdem konnten bereits im Stadium der atypischen lobulären Hyperplasie und des lobulären in situ Karzinoms Deletionen im Bereich 16q21-q23.1 durch CGH Analysen nachgewiesen werden (Mastracci, Shadoe et al. 2006). Genotypisierungen von 16q für Brustkrebs deuten darauf hin, daß mindestens zwei Regionen, 16q22.1 und 16q24.3 Tumorsuppressorgene im klassischen Sinn beinhalten könnten (Knudson 1984; Cleton-Jansen, Callen et al. 2001). Für das lobuläre Mammakarzinom konnte *CDHI* als Tumorsuppressorgen in Mutationsanalysen identifiziert werden (Berx, Cleton-Jansen et al. 1995; Berx, Cleton-Jansen et al. 1996).

Für die Zytokeratin-positiven Zellen als eine Gruppe sind im Vergleich zum Kontrollkollektiv alle Marker distal des *CDHI*-Lokus signifikant häufiger deletiert. Nur für den zentromer gelegene Marker D16S3019 konnte keine Signifikanz in der Allelverlusthäufigkeit nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Gruppen M0 und M1 bezüglich der Deletionen für 16q, so findet sich für die Gruppe M0 zwei interstitielle Bereiche mit signifikantem LOH in der untersuchten Region, während für die Zellen der M1-Gruppe alle untersuchten Marker für 16q signifikant häufiger deletiert sind, als dies im Kontrollkollektiv der Fall ist.

In genomischen Studien an Gewebe von Brustkrebsmetastasen fand sich in der Mehrzahl der Fälle ein kompletter Verlust des Chromosomenarms 16q (Bonsing, Devilee et al. 1993; Hampl, Hampl et al. 1999). Die zusätzlichen Allelverluste für die

Marker D16S3019 und D16S3138 in M1 Zellen sind demzufolge am ehesten als Ausdruck des Verlustes des ganzen Chromosomenarm 16q zu bewerten.

In Verlauf der lokalen Tumorprogression kommt es zur Akkumulierung von genetischen Aberrationen. Dies gilt für die Anzahl an Deletionen und Amplifikationen die mit der Methode der comparativen genomischen Hybridisierung nachgewiesen werden können, sowie für die Anzahl an LOH-Ereignissen (Shen, Yu et al. 2000). Im Umkehrschluss bedeutet dies, daß Veränderungen in Tumoren, die nur wenige Aberrationen aufweisen zeitlich als frühe Mutationen angesehen werden können.

Für die Zellen der Gruppe A (CGH normal) ist für die auf Chromosomenarm 16q untersuchten Marker nur der Marker D16S485 signifikant häufig deletiert. Für die benachbarten Marker von *CDHI* (D16S3019 und D16S3095) findet sich kein signifikanter Allelverlust. LOH-Ereignisse auf Chromosomenarm 16q in duktalem Brustkrebsgewebe korrelieren nicht mit der Expression von E-Cadherin (Cleton-Jansen 2002). Die signifikant häufigen Allelverluste des Markers D16S485 in den Gruppe A Zellen weisen auf eine Region distal des E-Cadherin-Lokus für den Chromosomenarm 16q22.1 als möglicher Bereich eines oder mehrerer Tumorsuppressorgene hin, die für die frühe Tumorentwicklung oder Disseminierung eine Rolle spielen könnten. Die in der durch die Marker D16S3095 und D16S3066 flankierten Region von 3,4 Megabasen lokalisierten Gene sind in Tabelle X des Appendix zusammengestellt.

LOH für Chromosomenarm 3p

Für den kurzen Arm des Chromosoms 3 werden in der Literatur für epitheliale Tumoren mehrere Regionen beschrieben, die häufig von Allelverlusten betroffen sind. So finden sich für das kleinzellige Bronchuskarzinom in nahezu 100% der Fälle Deletionen auf 3p und in über 90% der nicht-kleinzelligen Bronchuskarzinome. CGH-Studien wiesen ebenfalls den häufigen Verlust von Regionen auf 3p für Brustkrebs, das Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinome und Zervixkarzinome nach. Drei Regionen wurden für Brustkrebs als häufig von LOH betroffene Regionen definiert: 3p24-26, 3p21.3-22 und 3p14.2. In diesen Bereichen werden mehrere für die Entstehung von Brustkrebs relevanten Gene vermutet. In der Region 3p24-26 wurde das *VHL*-Gen identifiziert, welches für familiäre Fälle von Nierenzellkarzinomen bei germinaler Mutation des einen Allels prädisponiert. Der Bereich 3p14.2 beinhaltet die „common fragile site“ FRA3B und das *FHIT*-Gen. In CGH-Studien an Brustkrebsgewebe wurde

eine Deletion auf 3p als eine der frühesten, genomischen Veränderungen in der Tumorentwicklung definiert (Teixeira, Pandis et al. 2002). Drei Studien, die hochauflösend den Chromosomenarm 3p in Brustkrebsgewebe mit bis zu 27 Mikrosatellitenmarkern untersuchten kommen zu dem Ergebnis, dass die Regionen der häufigsten Allelverluste für 3p in dem Bereich 3p21-p22 liegen und sich diskontinuierlich über diese Region verteilen (Maitra, Wistuba et al. 2001; Martinez, Walker et al. 2001; Braga, Senchenko et al. 2002). Dokumentierte Allelverluste in diesem Bereich lassen sich in bis zu 69% der untersuchten Primärtumoren nachweisen. Für die Zytokeratin-positiven Zellen finden sich für den untersuchten Bereich des Chromosomenarms 3p (3p14.2-p22) signifikante Deletionen für die Marker D3S3518, den intragenetischen beta-Catenin Marker und D3S3624. *CTNNB1* ist auf dem chromosomalen Abschnitt 3p21 lokalisiert. Für die Zellen der Gruppe M0 sind die Marker D3S3518 und der beta-Catenin Marker, für die Zellen der Gruppe M1 die Marker D3S3624 und D3S32 statistisch signifikant häufiger deletiert als für das Kontrollzellkollektiv. Ein signifikanter Unterschied der Marker zwischen beiden Mammakarzinom Gruppen besteht jedoch nicht. In beiden Gruppen erreicht die Allelverlusthäufigkeit des Markers D3S1514, der in der FHIT/FRA3B Region auf 3p14.2 liegt keine statistische Signifikanz im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Die Gruppe A Zellen weisen signifikante Allelverluste für die Marker D3S3518 und den beta-Catenin Marker auf. Die in den betreffenden Bereichen lokalisierten Gene sind in Tabelle XI des Appendix aufgeführt.

LOH für Chromosomenarm 5q

In der Arbeit von Loo-L et al. wurden 42 Brustkrebstumoren mit der Technik der arrayCGH analysiert (Loo, Grove et al. 2004). Statt Metaphasen, wie für die klassische CGH-Technik wurden dabei 4153 BAC-Klone verwendet die auf Poly-L-Lysin beschichtete Slides aufgebracht wurden. Vorteil dieser Technik ist die deutlich höhere Auflösung, die dadurch erreicht werden kann ($\leq 0,8$ Mb)). In dieser Arbeit zeigte sich vor allem für die invasiven dukatalen Mammakarzinome in über 40% der Fälle Deletionen für die Region 5q22-5q35. Für 5q23 in 77% und für 5q31 in 69% der Östrogenrezeptor-negativen Tumoren. Für die Zytokeratin-positiven Zellen als eine Gruppe sind die Marker D16S615, D5S346 und der intragenetische Marker rs42427 des APC Gens signifikant häufig deletiert.

EGR-1 (early growth response 1) ist auf 5q31 lokalisiert (Lokalisation: 137.829.080-137.832.903), zentromer des Markers D5S500 (Lokalisation: 137.874.849). Dieser Marker ist signifikant häufiger in der Gruppe der Zytokeratin-positiven Zellen von M1 Patientinnen und Zellen der Gruppe C deletiert, als für das Kontrollkollektiv. Für das Gen *EGR-1* wird für Brustkrebs die Funktion eines Tumorsuppressorgens diskutiert (Tirkkonen, Johannsson et al. 1997; Ronski, Sanders et al. 2005). Der Marker rs42427 weist sowohl für die Gruppe M0 Zellen, als auch für die Zellen der Gruppe M1 signifikant häufig Allelverluste auf. Die Allelverlusthäufigkeit des Markers D5S615 erreicht nur für die Zellen der Gruppe M0 statistische Signifikanz.

LOH für Chromosomenarm 17q

In einer Metaanalyse über 151 LOH-Studien finden sich Allelverlustereignisse für den Chromosomenarm 17q in durchschnittlich 30% der untersuchten Brusttumoren (Miller, Wang et al. 2003). In einer Konsortium Studie zu Allelverlusten auf Chromosom 17 wurden 28 polymorphe Marker für den Arm 17q in einem Kollektiv von insgesamt 1280 Brusttumoren analysiert. Die höchste Allelverlustrate für die informativen Fälle traten für die Marker D17S791 (41.3% LOH, Lokalisation: 41.305.869), D17S806 (33.6% LOH, Lokalisation: 43.166.844), sowie für die Region telomer des Markers D17S588 (35.5% LOH, Lokalisation: 45.570.495; alle Lokalisationen gemäß Build 35.1 des humanen Genoms (August 2004)) auf (Phelan, Borg et al. 1998). In dieser Region liegen auch die für die Zytokeratin-positiven Zellen signifikant häufig deletierten Marker D17S1868, D17S943 und D17S1161. Für die Gruppen M0 und M1 gemeinsam ist für 17q der Marker D17S1868 signifikant häufig deletiert. Es bestehen keine Signifikanten Unterschiede in der Allelverlusthäufigkeit der einzelnen Marker auf 17q für die Gruppe M0 und M1.

Für die CGH-normalen Zellen (Gruppe A) ist kein Marker für 17q signifikant häufig deletiert. Die Gruppen mit CGH-Veränderungen (B+C) weisen nur für den Marker D17S1868 signifikant häufige Allelverluste auf. Die Allelverlusthäufigkeit dieses Markers erreicht aber im Vergleich zur Gruppe A keine statistische Signifikanz. Die betreffenden Gene dieser Region sind in der Tabelle XII des Appendix zusammengestellt.

5.2 Mögliche, relevante Gene der frühen Disseminierung und Kanzerogenese bei Brustkrebs

Die Unterteilung der Zellen nach dem klinischen Stadium der Patientinnen (M0 und M1 gemäß UICC) ermöglicht den Vergleich zweier Populationen mit völlig unterschiedlicher Prognose (M1-Patienten haben ein mittleres Überleben von 24 Monaten (Engel, Hölzel et al. 2003)). Die Zytokeratin-positiven Einzelzellen der Gruppen unterscheiden sich jedoch weder in der durchschnittlichen Allelverlusthäufigkeit der Zelle, noch für einen individuellen Marker signifikant voneinander. Allelverluste für einen individuellen Marker, die mit der klinischen Progression von M0 nach M1 assoziiert sind, ließen sich dem zu folge in den analysierten Einzelzellen nicht bestimmen.

Für beide Gruppen sind die Marker D16S3095, D16S485 und D16S3066 auf Chromosom 16q, der intragenetische Marker für APC rs42427 auf Chromosom 5q, sowie der Marker D17S1868 auf Chromosom 17q signifikant häufig deletiert. Allelverluste von acht weiteren Markern erreichen nur für Zellen der M1 Gruppe im Vergleich zum Kontrollkollektiv statistische Signifikanz, sowie vier Marker der Gruppe M0. Interessanterweise ist der Marker D5S615 im Gegensatz zu Zellen der Gruppe M1 nur für Zellen der Gruppe M0 statistisch signifikant häufig im Vergleich zum Kontrollkollektiv deletiert. Die Region um den Marker D5S615 (Tabelle XIII des Appendix) enthält neben einer ganzen Reihe an Genen mit noch unbekannter Funktion das Gen RAD50 (GenID 10111). RAD50 ist Bestandteil des Mre11 Protein-Komplexes, der sich aus den Komponenten NBS1, RAD50 und MRE11 zusammensetzt (Petrini 1999). Dieser Komplex stellt ein wesentliches Element in der Antwort auf DNA-Schädigung dar und verbindet die Erkennung von Doppelstrangbrüchen mit den geeigneten Reparaturmechanismen und Zellzyklus-Regulationspunkten. Zudem ist der Komplex an der Aufrechterhaltung der Telomerlängen beteiligt (Carney, Maser et al. 1998; D'Amours and Jackson 2002). Die Beeinträchtigung dieses Gens könnte somit bei defektem DNA-Reparaturmechanismus eine Instabilität des Genoms der Zelle zur Folge haben und ein erhöhtes Entartungsrisiko der Zellen bedingen. Für die Gene MRE11 und NBS ist eine Verbindung mit Tumorprädisponierenden-Syndromen belegt: Keimbahnmutationen des MRE11 Gens sind mit dem Ataxia-Teleangiektasie-ähnlichen Syndrom assoziiert. Defekte im NBS1 Gen verursachen das Nijmegen-Breakage- Syndrom (Varon, Vissinga et al. 1998; Maser and DePinho 2002), welches durch erhöhte Chromosomendoppelstrangbrüche charakterisiert ist und in einer Vielzahl

der Betroffenen zum Auftreten maligner Erkrankungen (insbesondere Lymphome und Leukämien) führt.

Ein weiterer Marker, der nur für die Zellen der Patientinnen im Stadium M0 signifikant häufig deletiert ist, ist der Marker D3S3518. Zentromer des Markers D3S1518 ist das Gen MLH1 lokalisiert (Tabelle XI des Appendix). MLH1 ist Bestandteil des Reparaturmechanismus bei falscher DNA Basenpaarung. Mutationen des MLH1 Gens wurden zuerst für das familiäre Darmkrebs-Syndrom nicht-polypöser Darmtumoren (HNPCC oder Lynch-Syndrom) nachgewiesen. Diese Tumoren sind charakterisiert durch Mikrosatelliteninstabilität und einer bis zu 1000-fach höheren Mutationsrate als dies in normalen Zellen beobachtet wird. MLH1 ist in über 50% der Fälle von HNPCC mutiert. Die Mikrosatelliteninstabilität ist in 15-25% der sporadischen Darmtumoren nachweisbar. In diesen Fällen findet sich meist eine Hypermethylierung des MLH1-Promotors (Lynch, Bronson et al. 1990; Bhattacharyya, Skandalis et al. 1994; Shibata, Peinado et al. 1994; Lynch and Smyrk 1996; Rhyu 1996; Kuismanen, Holmberg et al. 2000; Peltomaki 2003).

Für sporadische Brusttumoren wurde in 31.3% der Fälle das Fehlen oder aber eine Reduktion in der Expression von hMLH1 immunhistochemisch nachgewiesen. In der Mehrzahl der Fälle fand sich eine Hypermethylierung des Promotors (Murata, Khattar et al. 2002). Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist vor allem bei gut differenzierten Brusttumoren (G1 und 2) in frühen Stadien (Stadium I und II) nachzuweisen (Yee, Roodi et al. 1994). MSI in duktalem Brusttumoren ist mit einer Apoptoseresistenz des Primärtumors assoziiert, welche durch den Nachweis von DNA-Fragmenten im Tumorgewebe bestimmt wurde (Mendez, Manas et al. 2001).

Die chromosomalen Bereiche der Gene Rad50 und MLH1 sind in den Zytokeratin-positiven Zellen signifikant häufig von LOH betroffen. Inwieweit tatsächlich ein relevanter Funktionsverlust dieser Gene in den Zellen vorliegt, müßte in weiteren Studien untersucht werden.

Die Marker D3S3624 und D3S32 sind signifikant häufig nur für M1-Zellen im Vergleich zum Kontrollkollektiv deletiert. Im Bereich dieser Marker liegen unter anderem zahlreiche, für Zinkfinger-Proteine kodierende Gene (ZNF 660, ZNF 197, ZNF 35, ZNF 502, ZNF 501), sowie eine Komponente des ARE (AU-rich element)-vermittelten Abbaus spezifischer mRNAs (EXOSC7) (Tabelle XIV des Appendix).

In der Nachbarschaft des signifikant häufig deletierten Bereichs auf Chromosomenarm 17q für Zellen der Gruppe M0 (D17S1868 und D17S943) liegen der HOX-Gen Cluster (HOXB1-B9) und die Transkriptionsfaktoren ZNF652 und SP2. Distal des Markers

D17S943 liegt das Gen MYST2. MYST2 kodiert für eine Histon Acetyl-Transferase und ist Bestandteil eines Koaktivator-Komplexes zur Genaktivierung. Hypoacetylierung von Histonen und Promoter-Hypermethylierung sind epigenetische Mechanismen zur Suppression der Genexpression. Möglicherweise beeinflussen Veränderungen der Genexpression für MYST2 den Histon-Code der DNA und damit die Expression einer Vielzahl von Genen.

Von besonderem Interesse ist die Analyse der CGH-normalen Zellen der Gruppe A gewesen. Zahlreiche Hinweise lassen es als sehr wahrscheinlich erachten, daß es sich bei den Zellen dieser Gruppe um eine Population handelt, die den Primärtumor sehr früh während der lokalen Tumorentwicklung verlassen hat. Für die meisten invasiven Karzinome und in-situ Karzinome der Brustdrüse lassen sich große, strukturelle Chromosomenaberrationen in CGH-Analysen nachweisen. LOH-Ereignisse und CGH-Veränderungen sind bereits in Fällen von duktalem und lobulären Hyperplasien der Brustdrüse nachweisbar. An beiden Formen genomischer Aberrationen sind Doppelstrangbrüche beteiligt. Diese treten vermehrt während einer als ‚telomere Krise‘ bezeichneten Phase (in Folge Telomerverkürzung) (Maser and DePinho 2002) in der Tumorentwicklung auf oder sind durch ‚replikativen Stress‘ induzierbar (Gorgoulis, Vassiliou et al. 2005). Basierend auf dem hypothetischen, linearen Progressionsmodell für Brustkrebs, für welches eine Sequenz ausgehend von einer normalen, diploiden Zelle über die histologisch definierten Stadien der Hyperplasie, des Karzinoma insitu und invasive Karzinoms bis hin zum metastatischen Phänotyp postuliert wird, würde man für die Zellen der Gruppe A am wahrscheinlichsten den Zeitpunkt der Hyperplasie annehmen, zu dem die Zellen den Primärtumor verlassen haben.

Für die Zellen der Gruppe A konnten diskrete, signifikante Deletionen der Marker D16S485 auf 16q, sowie der Marker D3S3518 und CTNNA1 für 3p nachgewiesen werden. In einer LOH-Studie an präkanzerösem Brustdrüsengewebe (atypische, duktale Hyperplasie) ist die Region auf Chromosom 16q21 mit am häufigsten von LOH betroffen gewesen (O'Connell, Pekkel et al. 1998). Für die Region um den Marker D16S485 finden sich zahlreiche Gene, die für die RNA-Prozessierung und RNA-Turnover, sowie an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Tabelle X des Appendix). Dies gilt insbesondere für die Gene *DDX19* (GeneID 11269) und *DHX38* (GeneID 9785), die für die Bildung und Stabilisierung von Sekundärstrukturen der mRNA verantwortlich sind. Diese Sekundärstrukturen können zu veränderten Translationsstartseiten oder aber zur Hemmung der Translation einer mRNA beitragen.

Ebenso sind in diesem Bereich Gene lokalisiert, deren Proteinprodukt am Abbau von spezifischen mRNAs beteiligt sind (*EXOSC6*, GeneID 118460; *Dim1-like Protein*, GeneID 54957), sowie Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Zinkfinger-Proteine (*ZNF23*, GeneID 7571; *ZNF19*, GeneID 7567). Das Gen *ATBF1* (GeneID 463) bindet an AT-Nukleotide und hat die Funktion eines transkriptionellen Suppressors. Mutationen des *ATBF1* Gens sind für das Prostatakarzinom beschrieben. Für eine Gruppe von Brustkrebspatientinnen korrelierte die verminderte Expression dieses Gens im Tumorgewebe mit einem vermehrten Auftreten von Lymphknotenmetastasen und verkürztem Gesamtüberleben (Sun, Frierson et al. 2005; Zhang, Yamashita et al. 2005). Die genaue biologische Funktion von *ATBF1* ist noch nicht bekannt. In der Nachbarschaft des Markers D3S3518 liegt das Gen *hMLH1*, welches eine Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität einer Zelle spielt. Die signifikante Deletion des intragenetischen Markers für *CTNNB1* (beta-Catenin Marker) in den Zellen der Gruppe A läßt darauf schließen, daß sich mögliche Störungen im Aufbau der Gürteldesmosomen bereits frühzeitig in der Tumorentwicklung manifestieren und wahrscheinlich an der Disseminierung einzelner Tumorzellen in das Knochenmark beteiligt sind. Der Nachweis von LOH-Ereignissen für diese Subpopulation ist ein deutlicher Hinweis auf den malignen Ursprung dieser Zellen.

Für die diskutierten Gene, die in den Zytokeratin-positiven Zellen möglicherweise von LOH betroffen sind, kann die Frage, inwieweit der Verlust einer Genkopie funktionelle Konsequenzen für die betroffene Zelle hat, allein auf Grund der Genotypisierung nicht definitiv beantwortet werden. Zumindest für die Gene *APC* und *E-Cadherin* konnte im Tierversuch gezeigt werden, daß in Mäusen mit nur einem intakten Allel der beiden Gene die Anzahl an intestinalen- und Magentumoren um das neun- beziehungsweise fünf-fache höher lag als in Mäusen mit nur einem intakten Allel für *APC* (Smits, Ruiz et al. 2000).

Für eine Vielzahl von Tumorsuppressorgenen wird mittlerweile ein Gendosisseffekt diskutiert (Santarosa and Ashworth 2004). Neben spezifischen Stimuli, die zur transkriptionellen Regulation von Genen führen, wird angenommen, daß bei der Regulation der Genexpression stochastischen Effekten eine nicht unwesentliche Rolle zukommt. In stochastischen Modellen zur Genexpression konnte gezeigt werden, daß es nach dem Verlust einer Genkopie durch LOH, mit einer diskreten Wahrscheinlichkeit, durch willkürliche Fluktuationen der Expression von dem verbliebenen Allel transient zum Absinken des Expressionslevels unter einen kritischen Schwellenwert kommen

kann. Dies könnte für die Zelle zeitweilig zu einer Situation führen, die vergleichbar mit einer Nullmutation des betreffenden Gens ist (Cook, Gerber et al. 1998). Die Wahrscheinlichkeit für solch ein Szenario ist möglicherweise gering, doch akkumuliert das Risiko über die Zeit (Kaern, Elston et al. 2005). Dabei ist das Risiko für ein zufälliges Absinken des Expressionslevels des Gens unter einen kritischen Schwellenwert für eine Zelle mit nur einem intakten Allel größer als für eine diploide Zelle. Zu den stochastischen Mechanismen zählen unter anderem Promotermethylierungen und Chromatinstruktur-Änderungen.

Eine wesentliche Erkenntnis der Arbeit besteht darin, daß Brusttumoren sehr wahrscheinlich bereits im Stadium der Hyperplasie zur Disseminierung fähig sind und somit das gängige, lineare Modell zur Progression von Brustkrebs in Frage gestellt wird. Innerhalb dieses Modells entwickelt der Tumor erst zum Ende seiner Entwicklung die Fähigkeit zur Disseminierung und Ausbildung klinisch manifester Metastasen.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit ist, daß mit dem Auftreten von CGH-Veränderungen (Zellen der Gruppe B und C) auch eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Allelverlustrate assoziiert ($P < 0.05$) ist. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, daß für einen signifikanten Anteil der Zytokeratin-positiven Zellen der Marker D5S615 deletiert ist ($P < 0.05$). In unmittelbarer Nachbarschaft des Markers D5S615 ist das Gen Rad50 lokalisiert, dessen Proteinprodukt ein wesentlicher Bestandteil eines Komplexes zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist. Der Verlust einer Genkopie von Rad50 kann ein Mechanismus sein, der in den Zytokeratin-positiven Zellen zu einem defekten DNA-Reparaturmechanismus und in der Folge zur Akkumulation großer, chromosomaler Veränderungen führt.

Für die CGH-normalen Zellen darf angenommen werden, daß sie den Primärtumor bereits im Stadium der Hyperplasie verlassen haben. Frühe Mutationen besitzen die größte Wahrscheinlichkeit, in den meisten Zellen des Primärtumors bis hin zu den Zellen eines metastatischen Klons nachweisbar zu sein. Die Analyse CGH-normaler, Zytokeratin-positiver Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen, könnte somit die Identifikation von Genen ermöglichen, die zu einem besseren Verständnis der frühen Tumorentwicklung und Disseminierung beitragen.

Aus klinischer Sicht gilt es als gesichert, daß der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark mit einer verminderten rezidivfreien Zeit und einem vermindertem Gesamtüberleben assoziiert ist. Der statistische bedeutende Effekt liegt in den ersten vier Jahren nach Diagnosestellung, da nach dieser Zeit die Kurven für das

erkrankungsfreie Überleben parallel verlaufen (Braun, Vogl et al. 2005). So muß für die Patienten mit dem Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark von mindesten zwei prognostisch unterschiedlichen Gruppen ausgegangen werden. Die bisherigen Studien wiesen lediglich das Vorhandensein bzw. fehlen Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark nach. Inwieweit spezifische genetische Defekte der Zytokeratin-positiven Zellen eine zusätzliche, prognostische Relevanz besitzen, sollten Folgestudien des untersuchten Patientinnenkollektivs zeigen.

6. Zusammenfassung

Der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose und nach primärer Therapie ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben der Patientinnen (Janni, Rack et al. 2005) (Braun, Vogl et al. 2005). Dies deutet darauf hin, dass sich bereits lange vor der Operation Tumorzellen aus dem Verband gelöst haben und in ektope Organe gelangen konnten. Um einen Einblick in die Mechanismen der frühen Streuung zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen die Frage untersucht, ob und in welchem Maße die Gene (*CDH1* (16q21), *CTNNB1* (3p21), *CTNNA1* (5q31), *JUP* (17q21) und *APC* (5q22)), die am Aufbau und der Regulation von Gürteldesmosomen beteiligt sind, in den disseminierten, Zytokeratin-positiven Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebspatientinnen von Allelverlusten (LOH, engl.: *Loss of heterozygosity*) betroffen sind. Gürteldesmosomen sind spezifische Zell-Zell Kontakte, die für den mechanischen Zusammenhalt benachbarter, epithelialer Zellen essentiell sind. Zum anderen wurde untersucht, ob sich durch die Analyse der klinischen Patientengruppen M0 und M1 Allelverluste definieren lassen, die mit der Progression in einen metastatischen Phänotyp assoziiert sind. Als spezifisches und unerwartetes Problem ergab sich überdies die Frage nach der Identität und Dignität Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark, bei denen keine chromosomalen Veränderungen gefunden worden waren (CGH-normale Zellen der Gruppe A).. Dies war von besonderem Interesse, da in einigen Fällen von präkanzerösem Brustdrüsengewebe (Hyperplasie mit Atypien) bereits CGH-Veränderungen und Allelverluste nachzuweisen sind, so dass bei Nachweis von Allelverlusten bei CGH-normalen Zellen im Knochenmark ein sehr früher Zeitpunkt ihrer Disseminierung angenommen werden darf.

Insgesamt wurde der Genotyp für 101 Zytokeratin-positive Zellen aus dem Knochenmark von 50 Brustkrebspatientinnen und 54 Kontrollzellen bestimmt. Dazu wurden für vier chromosomale Regionen (3p14.2-p22, 5q21-q31.1, 16q22.1-q23.1 und 17q21.31-q22) der Allelotyp von 29 hochpolymorphen Markern analysiert. Nach der Selektion geeigneter Marker (intragenetisch oder in Nachbarschaft der genannten Gene) und der Optimierung der PCR-Bedingungen war es für die Genotypisierung der Zytokeratin-positiven Zellen entscheidend, die Methode der primären Amplifikation und Reamplifikation des Genoms einer Zelle, sowie der anschließenden

Allelotypisierung durch Mikrosatelliten-PCR an einem Kontrollzell-Kollektiv (Zytokeratin-negative Einzelzellen) zu validieren. Dabei zeigte sich, dass für durchschnittlich 16% (min. 5%-max. 32%) der Marker ein, vermutlich artifizieller, Allelverlust auftrat. Weder für die Länge des genomischen MseI-Fragments oder des PCR-Produktes, noch für die Art des Polymorphismus (Restrictionsfragment Längenpolymorphismus, Di-, Tri-, oder Tetranukleotid-Polymorphismus) konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten artifizieller Allelverluste festgestellt werden. Aufgrund des „Hintergrund“-Verlustes in Normalzellen wurden Entscheidungen über Allelverluste bei Zytokeratin-positiven Zellen im statistischen Vergleich mit dem Kontrollkollektiv getroffen. Für die Zytokeratin-positiven Zellen konnten im Falle der Gene *CDHI* (Marker D16S3095), *CTNNB1* (intragenetischer Marker) und *APC* (rs42427) ein signifikanter Allelverlust ($P < 0.05$) im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv nachgewiesen werden. Eine Mitbeteiligung dieser Gene, an der frühen Disseminierung der Zellen ist deshalb möglich. Elf, beziehungsweise 15 Marker der Zellen von M0 oder M1 Patientinnen waren signifikant häufiger deletiert als bei Kontrollzellen ($P < 0.05$). Es bestand aber kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen von M0 und M1 Patientinnen für die einzelnen Marker. Allelverluste, die mit einer klinischen Progression assoziiert sind, konnten deshalb für die untersuchten, chromosomalen Bereiche nicht definiert werden. Die Zytokeratin-positiven Zellen mit normalen Karyotyp wiesen signifikante Deletionen der Marker D16S485, D3S3518 und den intragenetischen Marker für *CTNNB1* auf. Der Nachweis dieser spezifischen Allelverluste, als Ausdruck genomischer Defekte, weist deutlich auf den malignen Ursprung der CGH-normalen Zellen hin. Dies bedeutet aber auch, daß Mammakarzinome bereits in frühesten Stadien zur Disseminierung fähig sind. Eine Mitbeteiligung von *CTNNB1* für die initiale Transformation oder Disseminierung sollte in weiteren funktionellen Studien untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Artandi, S. E., S. Chang, et al. (2000). "Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice." *Nature* **406**(6796): 641-5.
- Baker, S. J., E. R. Fearon, et al. (1989). "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." *Science* **244**(4901): 217-21.
- Batlle, E., E. Sancho, et al. (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." *Nat Cell Biol* **2**(2): 84-9.
- Behrens, J., M. M. Mareel, et al. (1989). "Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion." *J Cell Biol* **108**(6): 2435-47.
- Ben-Ze'ev, A. and B. Geiger (1998). "Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer." *Curr Opin Cell Biol* **10**(5): 629-39.
- Berx, G., A. M. Cleton-Jansen, et al. (1995). "E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers." *Embo J* **14**(24): 6107-15.
- Berx, G., A. M. Cleton-Jansen, et al. (1996). "E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain." *Oncogene* **13**(9): 1919-25.
- Bhattacharyya, N. P., A. Skandalis, et al. (1994). "Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6319-23.
- Bonsing, B. A., P. Devilee, et al. (1993). "Evidence for limited molecular genetic heterogeneity as defined by allelotyping and clonal analysis in nine metastatic breast carcinomas." *Cancer Res* **53**(16): 3804-11.
- Braga, E., V. Senchenko, et al. (2002). "Critical tumor-suppressor gene regions on chromosome 3P in major human epithelial malignancies: allelotyping and quantitative real-time PCR." *Int J Cancer* **100**(5): 534-41.
- 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., M. Muller, et al. (1998). "Re: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status." *J Natl Cancer Inst* **90**(14): 1099-101.
- Braun, S. and K. Pantel (1999). "Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow." *Cancer Metastasis Rev* **18**(1): 75-90.
- Braun, S., K. Pantel, et al. (2000). "Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer." *N Engl J Med* **342**(8): 525-33.
- 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.
- Brugger, W., H. J. Buhning, et al. (1999). "Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells." *J Clin Oncol* **17**(5): 1535-44.
- Bukholm, I. K., J. M. Nesland, et al. (2000). "Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients [seecomments]." *J Pathol* **190**(1): 15-9.

- Bukholm, I. K., J. M. Nesland, et al. (1998). "E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma." J Pathol **185**(3): 262-6.
- Caligo, M. A., L. Polidoro, et al. (1998). "A region on the long arm of chromosome 16 is frequently deleted in metastatic node-negative breast cancer." Int J Oncol **13**(1): 177-82.
- Cano, A., M. A. Perez-Moreno, et al. (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." Nat Cell Biol **2**(2): 76-83.
- Carney, J. P., R. S. Maser, et al. (1998). "The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response." Cell **93**(3): 477-86.
- Cavenee, W. K., T. P. Dryja, et al. (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." Nature **305**(5937): 779-84.
- Chou, Y. H., K. C. Chung, et al. (1998). "Frequent allelic loss on chromosomes 4q and 16q associated with human hepatocellular carcinoma in Taiwan." Cancer Lett **123**(1): 1-6.
- Cleton-Jansen, A. M. (2002). "E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer?" Breast Cancer Res **4**(1): 5-8.
- Cleton-Jansen, A. M., D. F. Callen, et al. (2001). "Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in 712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions." Cancer Res **61**(3): 1171-7.
- Cleton-Jansen, A. M., E. W. Moerland, et al. (1994). "At least two different regions are involved in allelic imbalance on chromosome arm 16q in breast cancer." Genes Chromosomes Cancer **9**(2): 101-7.
- Comijn, J., G. Berx, et al. (2001). "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion." Mol Cell **7**(6): 1267-78.
- Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, et al. (2002). "The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer." J Clin Invest **109**(8): 987-91.
- Cook, D. L., A. N. Gerber, et al. (1998). "Modeling stochastic gene expression: implications for haploinsufficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15641-6.
- D'Amours, D. and S. P. Jackson (2002). "The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 317-27.
- De Vita, V. T., Jr. (1989). "Breast cancer therapy: exercising all our options." N Engl J Med **320**(8): 527-9.
- Dillon, D. A., T. D'Aquila, et al. (1998). "The expression of p120ctn protein in breast cancer is independent of alpha- and beta-catenin and E-cadherin." Am J Pathol **152**(1): 75-82.
- Dogliani, C., P. Dell'Orto, et al. (1990). "Cytokeratin-immunoreactive cells of human lymph nodes and spleen in normal and pathological conditions. An immunocytochemical study." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **416**(6): 479-90.
- Dorion-Bonnet, F., S. Mautalen, et al. (1995). "Allelic imbalance study of 16q in human primary breast carcinomas using microsatellite markers." Genes Chromosomes Cancer **14**(3): 171-81.
- Engel, J., D. Hölzel, et al. (2003). "Epidemiologie." Manual Mammakarzinom, "Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge" **9. Aufl.**: 1-12.
- Fero, M. L., E. Randel, et al. (1998). "The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression." Nature **396**(6707): 177-80.

- Furuuchi, K., M. Tada, et al. (2000). "Somatic mutations of the APC gene in primary breast cancers." Am J Pathol **156**(6): 1997-2005.
- Gershoni-Baruch, R., Y. Patael, et al. (2000). "Association of the I1307K APC mutation with hereditary and sporadic breast/ovarian cancer: more questions than answers." Br J Cancer **83**(2): 153-5.
- Giersiepen, K., C. Heitmann, et al., Eds. (2005). Brustkrebs. Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
- Godbout, R., T. P. Dryja, et al. (1983). "Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma." Nature **304**(5925): 451-3.
- Godfrey, T. E., M. L. Cher, et al. (1997). "Allelic imbalance mapping of chromosome 16 shows two regions of common deletion in prostate adenocarcinoma." Cancer Genet Cytogenet **98**(1): 36-42.
- Gonzalez, M. A., S. E. Pinder, et al. (1999). "An immunohistochemical examination of the expression of E-cadherin, alpha- and beta/gamma-catenins, and alpha2- and beta1-integrins in invasive breast cancer." J Pathol **187**(5): 523-9.
- Gorgoulis, V. G., L. V. Vassiliou, et al. (2005). "Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions." Nature **434**(7035): 907-13.
- Graff, J. R., E. Gabrielson, et al. (2000). "Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression." J Biol Chem **275**(4): 2727-32.
- Guilford, P., J. Hopkins, et al. (1998). "E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer." Nature **392**(6674): 402-5.
- Hahn, S. A., A. T. Hoque, et al. (1996). "Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer." Cancer Res **56**(3): 490-4.
- Hampel, M., J. A. Hampel, et al. (1999). "Loss of heterozygosity accumulation in primary breast carcinomas and additionally in corresponding distant metastases is associated with poor outcome." Clin Cancer Res **5**(6): 1417-25.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hemsen, A., L. Riethdorf, et al. (2003). "Comparative evaluation of urokinase-type plasminogen activator receptor expression in primary breast carcinomas and on metastatic tumor cells." Int J Cancer **107**(6): 903-9.
- Heyderman, E., I. Strudley, et al. (1985). "A new monoclonal antibody to epithelial membrane antigen (EMA)-E29. A comparison of its immunocytochemical reactivity with polyclonal anti-EMA antibodies and with another monoclonal antibody, HMFG-2." Br J Cancer **52**(3): 355-61.
- Hirohashi, S. and Y. Kanai (2003). "Cell adhesion system and human cancer morphogenesis." Cancer Sci **94**(7): 575-81.
- Hulten, M. A., S. M. Hill, et al. (1993). "Chromosomes 1 and 16 in sporadic breast cancer." Genes Chromosomes Cancer **8**(3): 204.
- Janni, W., B. Rack, et al. (2005). "Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time?" Oncologist **10**(7): 480-92.
- Jimeno, A., M. L. Amador, et al. (2004). "Initially metastatic breast carcinoma has a distinct disease pattern but an equivalent outcome compared with recurrent metastatic breast carcinoma." Cancer **100**(9): 1833-42.
- Kaern, M., T. C. Elston, et al. (2005). "Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes." Nat Rev Genet **6**(6): 451-64.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, et al. (1994). "Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2156-60.

- 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.
- Klein, C. A., O. Schmidt-Kittler, et al. (1999). "Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4494-9.
- Knudson, A. G. (2000). "Chasing the cancer demon." Annu Rev Genet **34**: 1-19.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
- Knudson, A. G., Jr. (1975). "Genetics of human cancer." Genetics **79** Suppl: 305-16.
- Knudson, A. G., Jr. (1984). "Genetic predisposition to cancer." Cancer Detect Prev **7**(1): 1-8.
- Kuismanen, S. A., M. T. Holmberg, et al. (2000). "Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers." Am J Pathol **156**(5): 1773-9.
- Li, J., C. Yen, et al. (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." Science **275**(5308): 1943-7.
- Liaw, D., D. J. Marsh, et al. (1997). "Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome." Nat Genet **16**(1): 64-7.
- Lichter, P., S. Joos, et al. (2000). "Comparative genomic hybridization: uses and limitations." Semin Hematol **37**(4): 348-57.
- Loo, L. W., D. I. Grove, et al. (2004). "Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes." Cancer Res **64**(23): 8541-9.
- Lynch, H. T., E. K. Bronson, et al. (1990). "Genetic diagnosis of Lynch syndrome II in an extended colorectal cancer-prone family." Cancer **66**(10): 2233-8.
- Lynch, H. T. and T. Smyrk (1996). "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review." Cancer **78**(6): 1149-67.
- Magee, J. A., S. A. Abdulkadir, et al. (2003). "Haploinsufficiency at the Nkx3.1 locus. A paradigm for stochastic, dosage-sensitive gene regulation during tumor initiation." Cancer Cell **3**(3): 273-83.
- Maitra, A., Wistuba, II, et al. (2001). "High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss." Am J Pathol **159**(1): 119-30.
- Martinez, A., R. A. Walker, et al. (2001). "Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features." Mol Pathol **54**(5): 300-6.
- Maser, R. S. and R. A. DePinho (2002). "Connecting chromosomes, crisis, and cancer." Science **297**(5581): 565-9.
- Mastracci, T. L., A. Shadeo, et al. (2006). "Genomic alterations in lobular neoplasia: a microarray comparative genomic hybridization signature for early neoplastic proliferation in the breast." Genes Chromosomes Cancer **45**(11): 1007-17.
- Mastro, A. M., C. V. Gay, et al. (2003). "The skeleton as a unique environment for breast cancer cells." Clin Exp Metastasis **20**(3): 275-84.
- Mendez, O., S. Manas, et al. (2001). "Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas." Breast Cancer Res Treat **65**(2): 171-7.
- Meng, S., D. Tripathy, et al. (2004). "HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9393-8.

- Miller, B. J., D. Wang, et al. (2003). "Pooled analysis of loss of heterozygosity in breast cancer: a genome scan provides comparative evidence for multiple tumor suppressors and identifies novel candidate regions." Am J Hum Genet **73**(4): 748-67.
- Murata, H., N. H. Khattar, et al. (2002). "Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability." Oncogene **21**(37): 5696-703.
- Nadir, E., H. Margalit, et al. (1996). "Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6470-5.
- Nagafuchi, A. (2001). "Molecular architecture of adherens junctions." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 600-3.
- Naume, B., E. Borgen, et al. (1998). "Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral-blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation." Int J Cancer **78**(5): 556-60.
- Nelson, W. J. and R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." Science **303**(5663): 1483-7.
- Nigro, J. M., S. J. Baker, et al. (1989). "Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types." Nature **342**(6250): 705-8.
- Oda, T., Y. Kanai, et al. (1994). "E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1858-62.
- Osborne, M. P., G. Y. Wong, et al. (1991). "Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow." Cancer Res **51**(10): 2706-9.
- Pandis, N., S. Heim, et al. (1992). "Whole-arm t(1;16) and i(1q) as sole anomalies identify gain of 1q as a primary chromosomal abnormality in breast cancer." Genes Chromosomes Cancer **5**(3): 235-8.
- Pantel, K., G. Schlimok, et al. (1994). "Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow." J Hematother **3**(3): 165-73.
- 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.
- Peltomaki, P. (2003). "Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer." J Clin Oncol **21**(6): 1174-9.
- Perez-Moreno, M. A., A. Locascio, et al. (2001). "A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions." J Biol Chem **276**(29): 27424-31.
- Perl, A. K., P. Wilgenbus, et al. (1998). "A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma." Nature **392**(6672): 190-3.
- Petrini, J. H. (1999). "The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response." Am J Hum Genet **64**(5): 1264-9.
- Phelan, C. M., A. Borg, et al. (1998). "Consortium study on 1280 breast carcinomas: allelic loss on chromosome 17 targets subregions associated with family history and clinical parameters." Cancer Res **58**(5): 1004-12.
- Pierceall, W. E., A. S. Woodard, et al. (1995). "Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines." Oncogene **11**(7): 1319-26.

- Reimers, N., K. Zafrakas, et al. (2004). "Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells." Clin Cancer Res **10**(10): 3422-8.
- Rhyu, M. S. (1996). "Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma." J Natl Cancer Inst **88**(5): 240-51.
- Ronski, K., M. Sanders, et al. (2005). "Early growth response gene 1 (EGR1) is deleted in estrogen receptor-negative human breast carcinoma." Cancer **104**(5): 925-30.
- Rosner, D. and W. W. Lane (1993). "Predicting recurrence in axillary-node negative breast cancer patients." Breast Cancer Res Treat **25**(2): 127-39.
- Rubens, R. and G. Mundy (2000). Cancer and the Skeleton. London, Martin Dunitz.
- Santarosa, M. and A. Ashworth (2004). "Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way." Biochim Biophys Acta **1654**(2): 105-22.
- Sato, M., Y. Mori, et al. (1998). "Identification of a 910-kb region of common allelic loss in chromosome bands 16q24.1-q24.2 in human lung cancer." Genes Chromosomes Cancer **22**(1): 1-8.
- Schlimok, G., I. Funke, et al. (1987). "Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8672-6.
- 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.
- Shen, C. Y., J. C. Yu, et al. (2000). "Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis." Cancer Res **60**(14): 3884-92.
- Shibata, D., M. A. Peinado, et al. (1994). "Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation." Nat Genet **6**(3): 273-81.
- Sipkins, D. A., X. Wei, et al. (2005). "In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment." Nature **435**(7044): 969-73.
- Smits, R., P. Ruiz, et al. (2000). "E-cadherin and adenomatous polyposis coli mutations are synergistic in intestinal tumor initiation in mice." Gastroenterology **119**(4): 1045-53.
- Stigbrand, T., C. Andres, et al. (1998). "Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop." Tumour Biol **19**(2): 132-52.
- 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.
- Sun, X., H. F. Frierson, et al. (2005). "Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer." Nat Genet **37**(4): 407-12.
- Suzuki, H., A. Komiyama, et al. (1995). "Microsatellite instability and other molecular abnormalities in human prostate cancer." Jpn J Cancer Res **86**(10): 956-61.
- Takeichi, M. (1988). "The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis." Development **102**(4): 639-55.
- Takeichi, M. (1991). "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science **251**(5000): 1451-5.
- Teixeira, M. R., N. Pandis, et al. (2002). "Cytogenetic clues to breast carcinogenesis." Genes Chromosomes Cancer **33**(1): 1-16.

- Thiagalingam, S., R. L. Foy, et al. (2002). "Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence." Curr Opin Oncol **14**(1): 65-72.
- Thiagalingam, S., S. Laken, et al. (2001). "Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2698-702.
- Tirkkonen, M., O. Johannsson, et al. (1997). "Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations." Cancer Res **57**(7): 1222-7.
- Varon, R., C. Vissinga, et al. (1998). "Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome." Cell **93**(3): 467-76.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., et al. (1991). "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role." Cell **66**(1): 107-19.
- Welch, D. R., J. F. Harms, et al. (2003). "Breast cancer metastasis to bone: evolving models and research challenges." J Musculoskelet Neuronal Interact **3**(1): 30-8.
- Wiedswang, G., E. Borgen, et al. (2004). "Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome." Clin Cancer Res **10**(16): 5342-8.
- Wooster, R., G. Bignell, et al. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature **378**(6559): 789-92.
- Yee, C. J., N. Roodi, et al. (1994). "Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer." Cancer Res **54**(7): 1641-4.
- Zhang, Z., H. Yamashita, et al. (2005). "ATBF1-a messenger RNA expression is correlated with better prognosis in breast cancer." Clin Cancer Res **11**(1): 193-8.
- Zschieche, W., I. Schonborn, et al. (1997). "Expression of E-cadherin and catenins in invasive mammary carcinomas." Anticancer Res **17**(1B): 561-7.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Manfred Meyer für seine unermüdliche Unterstützung während und bei der Vollendung dieser Arbeit.

Ich möchte Stephan Seidel, Bernhard Polzer, Marco Petronio und Jochen Geigl für die moralische Unterstützung, insbesondere während der experimentellen Phase der Arbeit danken. Oleg Schmidt-Kittler, Marco Petronio und Bernhard Polzer danke ich für die geleisteten Vorarbeiten in der Isolierung der Patientenzellen, die die Ausgangsbasis der Arbeit darstellten. Ich möchte Prof. Christoph Klein danken für das Anvertrauen des Themas, seine Geduld, seine aktive Betreuung der Arbeit, sowie für seine fachliche und persönliche Unterstützung und die vielen konstruktiven Ratschläge bei der Anfertigung der Arbeit. Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Klein danke ich für ihr freundliches Entgegenkommen und ihre Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Laboralltagsproblemen.

Und natürlich möchte ich an dieser Stelle meiner Familie, meiner wunderbaren Frau Susanne, meinem verzaubernden Sohn Rémy Frédéric für ihr Verständnis und ihre Engelsgeduld danken, für all die vielen Stunden der Entbehrung, ohne sich darüber zu beklagen, ohne die ich vermutlich niemals die Muse gefunden hätte dieses Opus zu vollenden.

9. Lebenslauf

Name	Julian Schardt
Adresse	Monbijoustr. 69 3007 Bern Schweiz
Geburtsdatum/Ort	04. Oktober 1973 / München
Nationalität	deutsch
Familienstatus	verheiratet mit Susanne Schardt-Endress, Vater eines Sohns, Rémy Frédéric Schardt, geb. 07.3.2005

Schulische Ausbildung

September 80- August 84	Besuch der Grundschule Unterschleißheim, München
September 84- Juli 93	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Carl-Orff Gymnasiums, München
Juli 93	Abitur Leistungskurse Mathematik und Chemie

Wehrersatzdienst

August 93- Oktober 94	Wehrersatzdienst im Heilpädagogischen Zentrum Augustinum, München
--------------------------	--

Universitäre- und klinische Ausbildung

November 94- September 03	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian Universität, München
Februar-Mai 02	1. Terzian des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum für Dermatologie und Venerologie in München (Prof. Plewig)
Mai-September 02	2. Terzian an der Klinik für medizinische Onkologie des Inselspitals, Bern (Prof. Fey)
September-Januar 03	3. Terzian an der Klinik für Viszerale- und Transplantationschirurgie (Prof. Candinas), sowie der Klinik für Thoraxchirurgie (Prof. Schmid)
April 03	3. Staatsexamen

März 06 Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang

Juni 03-Juni 04 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Thoraxchirurgie,
Inselspital Bern (Prof. Schmid)

Seit Juli 04 Wissenschaftlicher Assistent des Departements klinische
Forschung, Hämatologie/Onkologie, Arbeitsgruppe von Prof. Fey
und PD Dr. Pabst, Inselspital Bern

10. Publikationen

1. Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmueller G; *Comparative genomic hybridisation, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Apr 13;96(8):4494-9.
2. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, Polzer B, Petronio M, Eils R, Klein CA; *Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer*. Cancer Cell. 2005 Sep;8(3):227-39

11. Appendix

Die Reihenfolge und Lokalisation der Marker, sowie der Gene in den folgenden Tabellen entspricht ihrer chromosomalen Lokalisation gemäß Build 35.1 des humanen Genoms (August 2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Allelverlusthäufigkeit wurde mit dem Quotienten aus Anzahl Zellen mit Allelverlust durch die Anzahl informativer Zellen für den einzelnen Marker berechnet.

Tabelle I Rohdaten der Allelotypisierung für die Zellen des Kontrollzell-Kollektivs

Marker ^a	Kontrollzell-Kollektiv (Gruppe K)				
	Anzahl informativer Patienten	Anzahl informativer Zellen	Anzahl Zellen mit Allelverlust	Anzahl Zellen ohne Allelverlust	Allelverlust Häufigkeit ^b
D16S3019	6	12	2	10	0,17
D16S3095	13	38	7	31	0,18
D16S485	15	38	8	30	0,21
D16S3066	14	37	7	30	0,19
D16S3138	11	27	5	22	0,19
D16S3040	10	26	3	23	0,12
D16S511	13	33	6	27	0,18
D5S299	9	23	3	20	0,13
rs42427 (intragenetisch APC)	8	22	2	20	0,09
D5S346	15	34	5	29	0,15
D5S471	12	29	6	23	0,21
D5S592	9	19	5	14	0,26
D5S615	13	26	5	21	0,19
D5S2117	7	19	6	13	0,32
D5S816	13	30	9	21	0,30
D5S399	8	18	4	14	0,22
D5S500	9	24	2	22	0,08
D5S1360	12	32	8	24	0,25
D3S3518	11	22	1	21	0,05
β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron7)	8	20	1	19	0,05
D3S3624	8	22	1	21	0,05
D3S32	8	21	3	18	0,14
D3S1514	12	30	8	22	0,27
D17S800	6	17	3	14	0,18
D17S855 (BRCA1 Intron 20)	15	34	5	29	0,15
D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	10	26	3	23	0,12
D17S1868	16	40	2	38	0,05
D17S943	10	24	3	21	0,13
D17S1161	17	45	6	39	0,13

Tabelle II Rohdaten der Allelotypisierung für Zytokeratin-positive Zellen

Marker ^a	Zytokeratin-positive Zellen				
	Anzahl informativer Patienten	Anzahl informativer Zellen	Anzahl Zellen mit Allelverlust	Anzahl Zellen ohne Allelverlust	Allelverlust Häufigkeit ^b
D16S3019	17	30	14	16	0,47
D16S3095	24	36	23	13	0,64
D16S485	41	78	52	26	0,67
D16S3066	34	67	42	25	0,63
D16S3138	31	66	36	30	0,55
D16S3040	25	49	25	24	0,51
D16S511	27	60	36	24	0,60
D5S299	17	42	15	27	0,36
rs42427 (intragenetisch APC)	16	31	16	15	0,52
D5S346	26	61	26	35	0,43
D5S471	22	52	23	29	0,44
D5S592	35	65	27	38	0,42
D5S615	28	58	29	29	0,50
D5S2117	34	61	28	33	0,46
D5S816	43	93	43	50	0,46
D5S399	25	44	9	35	0,20
D5S500	26	45	15	30	0,33
D5S1360	37	53	21	32	0,40
D3S3518	24	55	17	38	0,31
β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron7)	18	28	16	12	0,57
D3S3624	20	49	23	26	0,47
D3S32	22	39	13	26	0,33
D3S1514	25	50	26	24	0,52
D17S800	23	45	17	28	0,38
D17S855 (BRCA1 Intron 20)	22	48	13	35	0,27
D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	19	34	11	23	0,32
D17S1868	24	56	24	32	0,43
D17S943	25	59	21	28	0,36
D17S1161	39	81	29	52	0,36

Tabelle III Rohdaten der Allelotypisierung für Zellen der M0-Patienten

Marker ^a	Zellen der M0-Patienten				
	Anzahl informativer Patienten	Anzahl informativer Zellen	Anzahl Zellen mit Allelverlust	Anzahl Zellen ohne Allelverlust	Allelverlust Häufigkeit ^b
D16S3019	13	22	7	15	0,32
D16S3095	20	25	14	11	0,56
D16S485	29	38	26	12	0,68
D16S3066	24	36	18	18	0,50
D16S3138	22	32	14	18	0,44
D16S3040	19	30	13	17	0,43
D16S511	19	26	13	13	0,50
D5S299	10	14	1	13	0,07
rs42427 (intragenetisch APC)	11	17	8	9	0,47
D5S346	18	26	11	15	0,42
D5S471	17	24	11	13	0,46
D5S592	27	37	16	21	0,43
D5S615	18	25	14	11	0,56
D5S2117	26	37	18	19	0,49
D5S816	31	43	18	25	0,42
D5S399	18	29	7	22	0,24
D5S500	18	26	7	19	0,27
D5S1360	29	37	17	20	0,46
D3S3518	18	28	12	16	0,43
β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron7)	16	24	14	10	0,58
D3S3624	12	19	4	15	0,47
D3S32	15	19	3	16	0,33
D3S1514	15	22	11	11	0,50
D17S800	19	26	8	18	0,31
D17S855 (BRCA1 Intron 20)	15	17	5	12	0,29
D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	12	12	3	9	0,25
D17S1868	15	20	9	11	0,45
D17S943	17	24	13	11	0,54
D17S1161	26	34	12	22	0,35

Tabelle IV Rohdaten der Allelotypisierung für Zellen der M1-Patienten

Marker ^a	Zellen der M1-Patienten				
	Anzahl informativer Patienten	Anzahl informativer Zellen	Anzahl Zellen mit Allelverlust	Anzahl Zellen ohne Allelverlust	Allelverlust Häufigkeit ^b
D16S3019	4	8	7	1	0.88
D16S3095	4	11	9	2	0.82
D16S485	12	36	26	10	0.72
D16S3066	10	31	24	7	0.77
D16S3138	9	34	22	12	0.65
D16S3040	6	19	12	7	0.63
D16S511	8	34	23	11	0.68
D5S299	7	29	14	15	0.48
rs42427 (intragenetisch APC)	5	15	8	7	0.53
D5S346	8	35	15	20	0.43
D5S471	5	28	11	17	0.39
D5S592	8	28	11	17	0.39
D5S615	10	33	15	18	0.45
D5S2117	8	20	10	10	0.50
D5S816	12	46	25	21	0.54
D5S399	7	11	2	9	0.18
D5S500	8	19	8	11	0.42
D5S1360	8	16	4	12	0.25
D3S3518	6	27	5	22	0.19
β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron7)	2	4	2	2	0.50
D3S3624	8	30	19	11	0.63
D3S32	7	20	10	10	0.50
D3S1514	10	28	15	13	0.54
D17S800	4	19	9	10	0.47
D17S855 (BRCA1 Intron 20)	7	31	8	23	0.26
D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	7	22	8	14	0.36
D17S1868	9	36	15	21	0.42
D17S943	8	25	8	17	0.32
D17S1161	13	47	17	30	0.36

Tabelle V Rohdaten der Allelotypisierung für Zellen der Gruppe A

Marker ^a	Zellen der Gruppe A				
	Anzahl informativer Patienten	Anzahl informativer Zellen	Anzahl Zellen mit Allelverlust	Anzahl Zellen ohne Allelverlust	Allelverlust Häufigkeit ^b
D16S3019	12	17	7	10	0,41
D16S3095	14	14	6	8	0,43
D16S485	26	37	23	14	0,62
D16S3066	18	22	9	13	0,41
D16S3138	17	22	10	12	0,45
D16S3040	15	20	6	14	0,30
D16S511	19	24	9	15	0,38
D5S299	11	11	1	10	0,09
rs42427 (intragenetisch APC)	9	10	4	6	0,40
D5S346	16	20	5	15	0,25
D5S471	15	15	7	8	0,47
D5S592	22	27	11	16	0,41
D5S615	14	17	9	8	0,53
D5S2117	22	32	11	21	0,34
D5S816	26	34	13	21	0,38
D5S399	17	28	6	22	0,21
D5S500	16	20	6	14	0,30
D5S1360	27	32	11	21	0,34
D3S3518	15	21	11	10	0,52
β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron7)	14	20	12	8	0,60
D3S3624	8	10	2	8	0,20
D3S32	15	17	3	14	0,18
D3S1514	15	19	8	11	0,42
D17S800	18	21	7	14	0,33
D17S855 (BRCA1 Intron 20)	13	13	3	10	0,23
D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	13	13	3	10	0,23
D17S1868	13	15	5	10	0,33
D17S943	13	17	8	9	0,47
D17S1161	21	23	8	15	0,35

Tabelle VI Rohdaten der Allelotypisierung für Zellen der Gruppe B

Marker ^a	Zellen der Gruppe B				
	Anzahl informativer Patienten	Anzahl informativer Zellen	Anzahl Zellen mit Allelverlust	Anzahl Zellen ohne Allelverlust	Allelverlust Häufigkeit ^b
D16S3019	3	6	1	5	0,17
D16S3095	6	11	8	3	0,73
D16S485	5	8	6	2	0,75
D16S3066	8	15	9	6	0,60
D16S3138	8	12	6	6	0,50
D16S3040	5	11	8	3	0,73
D16S511	2	4	4	0	1,00
D5S299	3	6	0	6	0,00
rs42427 (intragenetisch APC)	2	6	4	2	0,67
D5S346	5	9	6	3	0,67
D5S471	4	10	4	6	0,40
D5S592	6	11	5	6	0,45
D5S615	6	9	5	4	0,56
D5S2117	5	9	7	2	0,78
D5S816	8	15	6	9	0,40
D5S399	4	7	1	6	0,14
D5S500	4	7	1	6	0,14
D5S1360	5	8	6	2	0,75
D3S3518	5	8	2	6	0,25
β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron7)	3	5	2	3	0,40
D3S3624	3	8	1	7	0,13
D3S32	1	3	0	3	0,00
D3S1514	3	5	3	2	0,60
D17S800	3	6	1	5	0,17
D17S855 (BRCA1 Intron 20)	4	6	2	4	0,33
D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	0	0	0	0	NA
D17S1868	4	6	4	2	0,67
D17S943	5	9	6	3	0,67
D17S1161	7	13	5	8	0,38

Tabelle VII Rohdaten der Allelotypisierung für Zellen der Gruppe C

Marker ^a	Zellen der Gruppe C				
	Anzahl informativer Patienten	Anzahl informativer Zellen	Anzahl Zellen mit Allelverlust	Anzahl Zellen ohne Allelverlust	Allelverlust Häufigkeit ^b
D16S3019	3	7	6	1	0,86
D16S3095	4	11	9	2	0,82
D16S485	10	33	23	10	0,70
D16S3066	9	30	24	6	0,80
D16S3138	8	32	20	12	0,63
D16S3040	6	18	11	7	0,61
D16S511	7	32	23	9	0,72
D5S299	5	25	14	11	0,56
rs42427 (intragenetisch APC)	5	15	8	7	0,53
D5S346	6	32	15	17	0,47
D5S471	5	27	12	15	0,44
D5S592	8	27	11	16	0,41
D5S615	10	32	15	17	0,47
D5S2117	8	20	10	10	0,50
D5S816	11	44	24	20	0,55
D5S399	5	9	2	7	0,22
D5S500	7	18	8	10	0,44
D5S1360	5	13	4	9	0,31
D3S3518	6	26	4	22	0,15
β-Catenin (CTNNB1) Marker (Intron7)	1	3	2	1	0,67
D3S3624	8	30	19	11	0,63
D3S32	6	19	10	9	0,53
D3S1514	8	26	15	11	0,58
D17S800	4	18	9	9	0,50
D17S855 (BRCA1 Intron 20)	6	29	8	21	0,28
D17S1322 (BRCA1 Intron 19)	6	21	8	13	0,38
D17S1868	9	35	15	20	0,43
D17S943	7	23	7	16	0,21
D17S1161	12	45	16	29	0,36

Tabelle VIII Klinische und histopathologische Charakteristika der Patienten entsprechend den klinischen Gruppen M0 und M1

Patienten	Tumortyp	Histologie	pT	pN	M	G	Östrogen-R	Progesteron-R	Her2/neu	
M0	023	MC	IDC	y0	y0	0	0	negativ	negativ	NA
	024	MC	IDC	2	1a	0	3	positiv	positiv	negativ
	025	MC	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA
	026	MC	IDC	1c	0	0	2	positiv	positiv	positiv
	027	MC	IDC	1c	0	0	2	positiv	positiv	negativ
	028	MC	IDC	1c	0	0	2	NA	NA	NA
	029	MC	IDC	3	0	0	3	NA	NA	NA
	030	MC	IDC	2	1b	0	2	NA	NA	NA
	031	MC	Adeno-Ca	NA	1bix	0	NA	NA	NA	NA
	032	MC	IDC	2	1b	0	2	NA	NA	NA
	033	MC	IDC	2	1b	0	3	negativ	negativ	negativ
	034	MC	ILC	2	2	0	2	positiv	negativ	negativ
	035	MC	IDC	2	0	0	3	NA	NA	NA
	036	MC	NA	y3	y1	0	1	NA	NA	NA
	037	MC	ILC	2	0	0	1	pos	negativ	NA
	038	MC	ILC	y2	y0	0	3	pos	positiv	NA
	040	MC	IDC	1	0	0	1	positiv	positiv	positiv
	041	MC	IDC	2	1bi	0	2	positiv	positiv	positiv
	042	MC	IDC	1c	0	0	2	negativ	negativ	positiv
	043	MC	IDC	NA	0	0	NA	positiv	positiv	negativ
	044	MC	IDC	1b	0	0	1	negativ	positiv	positiv
	045	MC	IDC	1b	0	0	2	positiv	positiv	negativ
	047	MC	ILC	2	0	0	2	positiv	positiv	positiv
	048	MC	IDC	2	0	0	2	positiv	positiv	positiv
	049	MC	IDC	2	1	0	2	positiv	positiv	NA
	050	MC	ILC	2	1biii	0	2	negativ	negativ	negativ
	051	MC	IDC	NA	1b	0	3	positiv	positiv	positiv
	052	MC	IDC	1c	1	0	2	positiv	positiv	NA
	053	MC	IDC	2	0	0	3	positiv	positiv	positiv
	054	MC	IDC	1a	0	0	2	positiv	positiv	NA
	055	MC	IDC	1c	0	0	3	negativ	negativ	NA
	056	MC	IDC	1	0	0	2	positiv	positiv	negativ
	057	MC	IDC	1by	x	0	3	negativ	negativ	NA
	058	MC	ILC	1bm	0	0	2	negativ	negativ	negativ
	059	MC	ILC	2	1biii	0	2	positiv	negativ	negativ
	060	MC	IDC	2	1b	0	2	positiv	positiv	NA
M1	021	MC	IDC	3	1biii	1	3	negativ	negativ	positiv
	022	MC	NA	NA	NA	1	NA	positiv	positiv	negativ
	039	MC	IDC	1b	1	1	2	positiv	positiv	NA
	046	MC	IDC	1c	1	1	2	NA	NA	NA
	061	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	062	MC	ILC	2	2	1	NA	positiv	positiv	NA
	063	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	064	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	065	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	066	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	067	MC	NA	2	1	1	2	NA	NA	NA
	068	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	069	MC	IDC	1	1	1	NA	NA	NA	NA
	070	MC	NA	2	1	1	2	NA	NA	NA

NA=nicht erhältlich, MC=Mammakarzinom, IDC=invasiv ductales Karzinom, ILC=invasiv lobuläres Karzinom

Tabelle IX Klinische und histopathologische Charakteristika der Patienten entsprechend den Gruppen A, B und C

Gruppe	Patienten	Tumor-Typ	Histologie	pT	pN	M	G	Östrogen-R	Progesteron-R	Her2/neu
A	022	MC	NA	NA	NA	1	NA	positiv	positiv	negativ
	023	MC	IDC	y0	y0	0	0	negativ	negativ	NA
	024	MC	IDC	2	1a	0	3	positiv	positiv	negativ
	025	MC	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA
	026	MC	IDC	1c	0	0	2	positiv	positiv	positiv
	027	MC	IDC	1c	0	x	2	positiv	positiv	negativ
	028	MC	IDC	1c	0	0	2	NA	NA	NA
	029	MC	IDC	3	0	0	3	NA	NA	NA
	030	MC	IDC	2	1b	0	2	NA	NA	NA
	031	MC	Adeno-Ca	NA	1bix	0	NA	NA	NA	NA
	032	MC	IDC	2	1b	0	2	NA	NA	NA
	033	MC	IDC	2	1b	0	3	negativ	negativ	negativ
	034	MC	ILC	2	2	0	2	positiv	negativ	negativ
	035	MC	IDC	2	0	0	3	NA	NA	NA
	036	MC	NA	y3	y1	0	1	NA	NA	NA
	037	MC	ILC	2	0	0	1	pos	negativ	NA
	038	MC	ILC	y2	y0	0	3	pos	positiv	NA
	039	MC	IDC	1b	1	1	2	positiv	positiv	NA
	040	MC	IDC	1	0	0	1	positiv	positiv	positiv
	041	MC	IDC	2	1bi	0	2	positiv	positiv	positiv
	042	MC	IDC	1c	0	0	2	negativ	negativ	positiv
	043	MC	IDC	NA	0	0	NA	positiv	positiv	negativ
	044	MC	IDC	1b	0	0	1	negativ	positiv	positiv
	045	MC	IDC	1b	0	x	2	positiv	positiv	negativ
	046	MC	IDC	1c	1	1	2	NA	NA	NA
	047	MC	ILC	2	0	0	2	positiv	positiv	positiv
	048	MC	IDC	2	0	0	2	positiv	positiv	positiv
	049	MC	IDC	2	1	0	2	positiv	positiv	NA
	050	MC	ILC	2	1biii	0	2	negativ	negativ	negativ
	051	MC	IDC	NA	1b	0	3	positiv	positiv	positiv
	052	MC	IDC	1c	1	0	2	positiv	positiv	NA
053	MC	IDC	2	0	0	3	positiv	positiv	positiv	
054	MC	IDC	1a	0	0	2	positiv	positiv	NA	
B	050	MC	ILC	2	1biii	0	2	negativ	negativ	negativ
	052	MC	IDC	1c	1	0	2	positiv	positiv	NA
	054	MC	IDC	1a	0	0	2	positiv	positiv	NA
	055	MC	IDC	1c	0	0	3	negativ	negativ	NA
	056	MC	IDC	1	0	0	2	positiv	positiv	negativ
	057	MC	IDC	1by	x	0	3	negativ	negativ	NA
	058	MC	ILC	1bm	0	0	2	negativ	negativ	negativ
059	MC	ILC	2	1biii	x	2	positiv	negativ	negativ	
060	MC	IDC	2	1b	0	2	positiv	positiv	NA	
C	021	MC	IDC	3	1biii	1	3	negativ	negativ	positiv
	022	MC	NA	NA	NA	1	NA	positiv	positiv	negativ
	061	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	062	MC	ILC	2	2	1	NA	positiv	positiv	NA
	063	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	064	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	065	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	066	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	067	MC	NA	2	1	1	2	NA	NA	NA
	068	MC	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
	069	MC	IDC	1	1	1	NA	NA	NA	NA
070	MC	NA	2	1	1	2	NA	NA	NA	

NA=nicht erhältlich, MC=Mammakarzinom, IDC=invasiv ductales Karzinom, ILC=invasiv lobuläres Karzinom

Tabelle X Gene in der Region des Markers D16S485 auf Chromosomenarm 16q

	Gen	Gen ID ^a	Lokalisation ^a
Chromosom 16	68,503 Mb < 70,292 Mb < 71,887 Mb (centr.-tel)		
	D16S3095		68,503 Mb
1	secretory protein LOC348174	GenelD: 348174	68,546-68,554
2	LOC645282 hypothetical protein LOC645282	GenelD: 645282	68,556-68,557
3	acylhydrolase GX) (GX sPLA2) (sPLA2-X)	GenelD: 645287	68,563-68,567
4	LOC283970 hypothetical protein LOC283970	GenelD: 283970	68,567-68,657
5	LOC645307 hypothetical protein LOC645307	GenelD: 645307	68,704-68,706
6	PDPR pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit	GenelD: 55066	68,704-68-750
7	MGC34761 hypothetical protein MGC34761	GenelD: 283971	68,765-68,778
8	acylhydrolase GX) (GX sPLA2) (sPLA2-X)	GenelD: 645325	69,029-69,030
9	EXOSC6 exosome component 6	GenelD: 118460	68,840-68,847
10	AARS alanyl-tRNA synthetase	GenelD: 16	68,847-68,885
11	DDX19 DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19 B	GenelD: 11269	68,893-68,930
12	DDX19A DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19A	GenelD: 55308	68,938-68,964
13	DDX19-DDX19L DDX19-DDX19L protein	GenelD: 544314	68,938-68,963
14	ST3GAL2 ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	GenelD: 6483	68,975-69,028
15	LOC645346 hypothetical protein LOC645346	GenelD: 645346	69,029-69,030
16	FUK fucokinase	GenelD: 197258	69,043-69,073
17	COG4 component of oligomeric golgi complex 4	GenelD: 25839	69,073-69,118
18	SF3B3 splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	GenelD: 23450	69,118-69,164
19	MGC34647 hypothetical protein MGC34647	GenelD: 146433	69,239-69,254
20	LOC92154 hypothetical protein BC002770	GenelD: 92154	69,254-69,276
21	VAC14 Vac14 homolog (S. cerevisiae)	GenelD: 55697	69,284-69,397
22	HYDIN hydrocephalus inducing	GenelD: 54768	69,623-69,826
23	FLJ11171 hypothetical protein FLJ11171	GenelD: 55783	69,871-69,886
24	CALB2 calbindin 2, 29kDa (calretinin)	GenelD: 794	69,954-69,984
25	LOC390738 similar to mKIAA1261 protein	GenelD: 390738	70,021-70,029
26	ZNF23 zinc finger protein 23 (KOX 16)	GenelD: 7571	70,044-70,059
27	LOC645396 hypothetical protein LOC645396	GenelD: 645396	70,048-70,054
28	ZNF19 zinc finger protein 19 (KOX 12)	GenelD: 7567	70,067-70,082
29	CHST4 carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 4	GenelD: 10164	70,119-70,134
30	TAT tyrosine aminotransferase	GenelD: 6898	70,157-70,172
31	MRVLDC3 MARVEL (membrane-associating) domain containing 3	GenelD: 91862	70,217-70,225
32	PHLPPL PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase-like	GenelD: 23035	70,240-70,307
	D16S485		70,292 Mb
33	AP1G1 adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	GenelD: 164	70,322-70,405
34	BOAT brother of ataxin-1	GenelD: 342371	70,435-70,442
35	LOC146517 hypothetical protein LOC146517	GenelD: 146517	70,441-70,448
36	LOC55565 hypothetical protein LOC55565	GenelD: 55565	70,450-70,480
37	KIAA0174 KIAA0174 gene product	GenelD: 9798	70,488-70,515
38	PKD1L3 polycystic kidney disease 1-like 3	GenelD: 342372	70,526-70,593
39	LOC645443 similar to ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	GenelD: 645443	70,596-70,597
40	DHODH dihydroorotate dehydrogenase	GenelD: 1723	70,601-70,616
41	HP haptoglobin	GenelD: 3240	70,646-70,654
42	HPR haptoglobin-related protein	GenelD: 3250	70,654-70,668
43	TXNL4B thioredoxin-like 4B	GenelD: 54957	70,676-70,684
44	DHX38 DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38	GenelD: 9785	70,684-70,706
45	PMFBP1 polyamine modulated factor 1 binding protein 1	GenelD: 83449	70,714-70,759
46	LOC390739 similar to C-Myc binding protein (Associate of Myc 1) (AMY-1)	GenelD: 390739	70,869
47	LOC645478 hypothetical protein LOC645478	GenelD: 645478	71,091-71,256
48	LOC342374 similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18) (K18) (CK 18)	GenelD: 342374	71,320-71,321
49	ATBF1 AT-binding transcription factor 1	GenelD: 463	71,383-71,639
50	C16orf47 chromosome 16 open reading frame 47	GenelD: 388289	71,718-71,735
	D16S3066		71,887 Mb
51	carcinoma laminin-binding protein) (NEM/1CHD4) (Multidrug resistance-associated protein	GenelD: 645656	72,532
52	LOC441506 similar to laminin receptor 1 (ribosomal protein SA)	GenelD: 441506	72,531-72-533
53	LOC401859 similar to peptidylprolyl isomerase A isoform 1	GenelD: 401859	72,812

^a Die Marker, Genbezeichnungen, Gen IDs und deren Lokalisation sind der elektronischen Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen.

Tabelle XI Gene in der Region der signifikant häufig deletierten Marker der Gruppe A Zellen für Chromosomenarm 3p

	Gen	Gen ID ^a	Lokalisation ^a
Chromosom 3 tel < 33,662 Mb - CTNNB1 (41,215-41,265)< 44,588			
1	CKLFSF6 chemokine-like factor super family 6	GenelD: 54918	32,495-32,515
2	LOC285260 similar to ribosomal protein L31	GenelD: 285260	32,525
3	DNCL1 dynein, cytoplasmic, light intermediate polypeptide 1	GenelD: 51143	32,545-32,595
4	signal transduction molecule alpha 4) (Alpha 4 protein	GenelD: 391526	32,615-32,635
5	CNOT10 CCR4-NOT transcription complex, subunit 10	GenelD: 25904	32,705-32,795
6	LOC389101 similar to 60S ribosomal protein L23a	GenelD: 389101	32,805-32,815
7	LOC389102 similar to YPLR6490	GenelD: 389102	32,835
8	LOC131405 similar to abnormal cell LINEage LIN-41, heterochronic gene	GenelD: 131405	32,835-32,915
9	CCR4 chemokine (C-C motif) receptor 4	GenelD: 1233	32,975
10	GLB1 galactosidase, beta 1	GenelD: 2720	33,015-33,115
11	CRTAP cartilage associated protein	GenelD: 10491	33,135-33,165
12	KIAA0527 KIAA0527 protein	GenelD: 26032	33,175-33,245
13	FBXL2 F-box and leucine-rich repeat protein 2	GenelD: 25827	33,295-33,405
14	UBP1 upstream binding protein 1 (LBP-1a)	GenelD: 7342	33,405-33,455
15	CLASP2 cytoplasmic linker associated protein 2	GenelD: 23122	33,515-33,675
	D3S3518		33,662 Mb
16	LOC440948 similar to CLIP-associating protein 1; multiple asters 1	GenelD: 440948	33,705-33,735
17	PDCD6IP programmed cell death 6 interacting protein	GenelD: 10015	33,815-33,855
18	LOC285307 hypothetical LOC285307	GenelD: 285307	34,175-34,585
19	ARPP-21 cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21 kD	GenelD: 10777	35,695-35,815
20	STAC SH3 and cysteine rich domain	GenelD: 6769	36,397-36,564
21	DCAMKL3 doublecortin and CaM kinase-like 3	GenelD: 85443	36,728-36,781
22	LBA1 lupus brain antigen 1	GenelD: 9881	36,684-36,962
23	EPM2AIP1 EPM2A (laforin) interacting protein 1	GenelD: 9852	37,004-37,097
24	MLH1 mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	GenelD: 4292	37,099-37,067
25	LRRFIP2 leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 2	GenelD: 9209	37,069-37,191
26	GOLGA4 golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	GenelD: 2803	37,259-37,383
27	C3orf35 chromosome 3 open reading frame 35	GenelD: 339883	37,402-37,451
28	ITGA9 integrin, alpha 9	GenelD: 3680	37,468-37,836
29	phosphatase-like	GenelD: 10217	37,878-38,000
30	VILL villin-like	GenelD: 50853	38,010-38,023
31	PLCD1 phospholipase C, delta 1	GenelD: 5333	38,024-38,046
32	DLEC1 deleted in lung and esophageal cancer 1	GenelD: 9940	38,055-38,139
33	ACAA1 acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1 (peroxisomal 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	GenelD: 30	38,139-38,153
34	MYD88 myeloid differentiation primary response gene (88)	GenelD: 4615	38,155-38,159
35	OXSR1 oxidative-stress responsive 1	GenelD: 9943	38,182-38,271
36	SLC22A13 solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 13	GenelD: 9390	38,282-38,294
37	SLC22A14 solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 14	GenelD: 9389	38,332-38,335
38	XYLB xylokkinase homolog (H. influenzae)	GenelD: 9942	38,363-38,431
39	ACVR2B activin A receptor, type IIB	GenelD: 93	38,470-38,499
40	ENDOG1 endonuclease G-like 1	GenelD: 9941	38,512-38,541
41	WDR48 WD repeat domain 48	GenelD: 57599	39,068-39,112
42	GORASP1 golgi reassembly stacking protein 1, 65kDa	GenelD: 64689	39,113-39,124
43	AXUD1 AXIN1 up-regulated 1	GenelD: 64651	39,158-39,170
44	CMYA1 cardiomyopathy associated 1	GenelD: 165904	39,199-39,209
45	CX3CR1 chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	GenelD: 1524	39,285-39,295
46	CCR8 chemokine (C-C motif) receptor 8	GenelD: 1237	39,345
47	hnRNPA1p heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene	GenelD: 344697	39,355
48	LOC389111 similar to Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	GenelD: 389111	39,375-39,405
49	FLJ20551 hypothetical protein FLJ20551	GenelD: 54977	39,425-39,435
50	LAMR 1 laminin receptor 1		39,425-435
51	MOBP myelin-associated oligodendrocyte basic protein	GenelD: 4336	39,485-39,545
52	LOC440951 hypothetical gene supported by AK125964	GenelD: 440951	39,795
53	MYRIP myosin VIIA and Rab interacting protein	GenelD: 25924	39,825-40,275
54	LOC440952 hypothetical gene supported by AK057627	GenelD: 440952	40,305-40,325
55	GC20 translation factor sui1 homolog	GenelD: 10289	40,335
56	ENTPD3 ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	GenelD: 956	40,405-40,445
57	RPL14 ribosomal protein L14	GenelD: 9045	40,475
58	ZNF619 zinc finger protein 619	GenelD: 285267	40,495-40,505
59	ZNF620 zinc finger protein 620	GenelD: 253639	40,525-40,535
60	ZNF621 zinc finger protein 621	GenelD: 285268	40,545-40,555
61	LOC442079 similar to elongation factor 1 gamma	GenelD: 442079	40,615-40,635
62	LOC389112 similar to ribosomal protein S27	GenelD: 389112	40,745-40,815
63	MRPS31P1 mitochondrial ribosomal protein S31 pseudogene 1	GenelD: 351449	41,205
	CTNNB1	GenelD: 1499	41,215-41,265 Mb
64	ULK4 unc-51-like kinase 4	GenelD: 54986	41,805-41,985
65	OIP106 OGT(O-Glc-NAc transferase)-interacting protein 106 KDa	GenelD: 22906	42,185-42,225
66	CCK cholecystokinin	GenelD: 885	42,275-42,285
67	LOC391530 similar to SALL4B	GenelD: 391530	42,285-42,345
68	LYZL4 lysozyme-like 4	GenelD: 131375	42,415-42,435
69	VIPR1 vasoactive intestinal peptide receptor 1	GenelD: 7433	42,525-42,555

Forsetzung Tabelle XI

70	SEC22L3 SEC22 vesicle trafficking protein-like 3	GeneID: 9117	42,565-42,595
71	SS18L2 synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 2	GeneID: 51188	42,605-42,615
72	NKTR natural killer-tumor recognition sequence	GeneID: 4820	42,625-42,665
73	ZNF651 zinc finger protein 651	GeneID: 92999	42,675-42,685
74	KBTD5 kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 5	GeneID: 131377	42,705-42,715
75	C3orf3 chromosome 3 open reading frame 3	GeneID: 57467	42,715-42,725
76	FLJ14566 hypothetical protein FLJ14566	GeneID: 84892	43,095-43,125
77	SNRK SNF-1 related kinase	GeneID: 54861	43,305-43,365
78	FLJ10375 hypothetical protein FLJ10375	GeneID: 55129	43,385-43,645
79	ZNF445 zinc finger protein 445	GeneID: 353274	44,445
80	ZNF167 zinc finger protein 167	GeneID: 55888	44,545
	D3S3624		44,589 Mb

^a Die Marker, Genbezeichnungen, Gen IDs und deren Lokalisation sind der elektronischen Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen.

Tabelle XII Gene in der Region der signifikant häufig deletierten Marker der Zytokeratin-positiven Zellen für den Chromosomenarm 17q

	Gen	Gen ID ^a	Lokalisation ^a
Chromosom 17	38,458 Mb < 45,195 Mb - 46,451 < Mb (centr.-tel)		
	D17S1322 (BRCA1, Intron 19)		38,458 Mb
1	MAP3K14 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	GeneID: 9020	40,694-40,721
2	CDC27 cell division cycle 27	GeneID: 996	42,557-42,620
3	ITGB3 integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	GeneID: 3690	42,683-42,746
4	SP2 Sp2 transcription factor	GeneID: 6668	43,349-43,358
5	PNPO pyridoxine 5'-phosphate oxidase	GeneID: 55163	43,376-43,385
6	MGC11242 hypothetical protein MGC11242	GeneID: 79170	43,385-43,394
7	CDK5RAP3 CDK5 regulatory subunit associated protein 3	GeneID: 80279	43,403-43,412
8	COPZ2 coatamer protein complex, subunit zeta 2	GeneID: 51226	43,457-43-475
9	LOC400602 hypothetical LOC400602	GeneID: 400602	43,484
10	NFE2L1 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	GeneID: 4779	43,484-43,493
11	CBX1 chromobox homolog 1 (HP1 beta homolog Drosophila)	GeneID: 10951	43,502-43,538
12	SNX11 sorting nexin 11	GeneID: 29916	43,538-43,556
13	SCAP1 src family associated phosphoprotein 1	GeneID: 8631	43,565-43,862
14	HOXB1 homeo box B1	GeneID: 3211	43,961
15	HOXB2 homeo box B2	GeneID: 3212	43,979
16	HOXB3 homeo box B3	GeneID: 3213	43,998-44,006
17	HOXB4 homeo box B4	GeneID: 3214	44,015
18	HOXB5 homeo box B5	GeneID: 3215	44,024
19	HOXB6 homeo box B6	GeneID: 3216	44,033-44,042
20	HOXB7 homeo box B7	GeneID: 3217	44,042
21	HOXB8 homeo box B8	GeneID: 3218	44,051
22	HOXB9 homeo box B9	GeneID: 3219	44,051-44,060
23	PRAC small nuclear protein PRAC	GeneID: 84366	44,159
24	PRAC2 prostate/rectum and colon protein no. 2	GeneID: 360205	44,159
25	HOXB13 homeo box B13	GeneID: 10481	44,159
26	FLJ35808 hypothetical protein FLJ35808	GeneID: 284076	44,195-44,235
27	NDP52 nuclear domain 10 protein	GeneID: 10241	44,267-44,294
28	isoform 1	GeneID: 516	44,33
29	FLJ13855 hypothetical protein FLJ13855	GeneID: 65264	44,339-44,366
30	EAP30 EAP30 subunit of ELL complex	GeneID: 11267	44,366-44,375
31	GIP gastric inhibitory polypeptide	GeneID: 2695	44,393-44,402
32	IMP-1 IGF-II mRNA-binding protein 1	GeneID: 10642	44,429-44,483
	D17S1868		44,539 Mb
33	GALGT2 UDP-GalNAc:Neu5Acalpha2-3Galbeta-R beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase	GeneID: 124872	44,564-44,600
34	polypeptide 2	GeneID: 2793	44,636-44,645
35	ABI3 ABI gene family, member 3	GeneID: 51225	44,645-44,654
36	PHOSPHO1 phosphatase, orphan 1	GeneID: 162466	44,654-44,663
37	FLJ40194 FLJ40194 protein	GeneID: 124871	44,681-44,690
38	ZNF652 zinc finger protein 652	GeneID: 22834	44,735-44,798
39	PHB prohibitin	GeneID: 5245	44,834-44,852
40	NGFR nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	GeneID: 4804	44,933-44,951
41	NXP3 neurexophilin 3	GeneID: 11248	45,005-45,014
42	SPOP speckle-type POZ protein	GeneID: 8405	45,032-45,113
43	SLC35B1 solute carrier family 35, member B1	GeneID: 10237	45,131-45,140
44	LOC81558 C/EBP-induced protein	GeneID: 81558	45,149-45,194
	D17S943		45,195 Mb
45	MYST2 MYST histone acetyltransferase 2	GeneID: 11143	45,221-45,257
46	TAC4 tachykinin 4 (hemokinin)	GeneID: 255061	45,275-45,284
47	LOC440445 LOC440445	GeneID: 440445	45,320-45,338
48	LOC124865 similar to ribosomal protein P0-like protein; 60S acidic ribosomal protein PO	GeneID: 124865	45,374
49	DLX4 distal-less homeobox 4	GeneID: 1748	45,401-45,410
50	DLX3 distal-less homeo box 3	GeneID: 1747	45,419-45,428
51	ITGA3 integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	GeneID: 3675	45,491-45,518
52	PKD2 pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	GeneID: 5164	45,527-45,545
53	LOC201191 hypothetical protein LOC201191	GeneID: 201191	45,545-45,563
54	PPP1R9B protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B, spinophilin	GeneID: 84687	45,572-45,581
55	SGCA sarcoglycan, alpha (50kDa dystrophin-associated glycoprotein)	GeneID: 6442	45,599-45,608
56	HILS1 spermatid-specific linker histone H1-like protein	GeneID: 373861	45,599-45,608
57	COL1A1 collagen, type I, alpha 1	GeneID: 1277	45,617-45,635
58	FLJ33318 hypothetical protein FLJ33318	GeneID: 162461	45,707-45,716
59	XYLT2 xylosyltransferase II	GeneID: 64132	45,779-45,797
60	EME1 essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe)	GeneID: 146956	45,797-45,806
61	PRO1855 hypothetical protein PRO1855	GeneID: 55379	45,815-45,833
62	FLJ20920 hypothetical protein FLJ20920	GeneID: 80221	45,887
63	MRPS21P9 mitochondrial ribosomal protein S21 pseudogene 9	GeneID: 359772	45,860-45,905
64	CHAD chondroadherin	GeneID: 1101	45,896-45,905
65	RSAD1 radical S-adenosyl methionine domain containing 1	GeneID: 55316	45,914-45,923
66	MYCBPAP MYCBP associated protein	GeneID: 84073	45,941-45,968
67	EPN3 epsin 3	GeneID: 55040	46,968-45,975
68	SSP411 sperm protein SSP411	GeneID: 64847	45,977-45,986
69	LOC253962 hypothetical protein LOC253962	GeneID: 253962	45,986-45,995

Fortsetzung Tabelle XII

70	CACNA1G	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit	GeneID: 8913	45,995-46,058
71	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	GeneID: 8714	46,067-46,121
72	MGC15396	hypothetical protein MGC15396	GeneID: 91369	46,130-46,139
73	CROP	cisplatin resistance-associated overexpressed protein	GeneID: 51747	46,157-46,184
74		protein coding	GeneID: 10414	46,184
75	FLJ20694	hypothetical protein FLJ20694	GeneID: 55018	46,193-46,202
76		(annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11));	GeneID: 390801	46,229-46,265
77	WFIKKN2	WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing	GeneID: 124857	46,265-46,274
78	TOB1	transducer of ERBB2, 1	GeneID: 10140	46,292
79	LOC400604	hypothetical gene supported by BC039664	GeneID: 400604	46,301
80	SPAG9	sperm associated antigen 9	GeneID: 9043	46,400-46,553
	D17S1161			53,686 Mb

^a Die Marker, Genbezeichnungen, Gen IDs und deren Lokalisation sind der elektronischen Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen.

Tabelle XIII Gene in der Region des für M0 Zellen signifikant häufig deletierten Markers D5S615

Gen	Gen ID ^a	Lokalisation ^a
Chromosom 5 119,130 Mb < 125,191 Mb < 133,415 Mb		
	D5S592	119,130 Mb
1	LOC644326 hypothetical protein LOC644326	GenelD: 644326 119,286-119,287
2	LOC51334 mesenchymal stem cell protein DSC54	GenelD: 51334 119,827-120,050
3	FTMT ferritin mitochondrial	GenelD: 94033 121,215-121,216
4	SRFBP1 serum response factor binding protein 1	GenelD: 153443 121,325-121,391
5	LOX lysyl oxidase	GenelD: 4015 121,429-121,441
6	ZNF474 zinc finger protein 474	GenelD: 133923 121,493-121,517
7	SNCAIP synuclein, alpha interacting protein (synphilin)	GenelD: 9627 121,675-121,827
8	SNX2 sorting nexin 2	GenelD: 6643 122,145-122,195
9	SNX24 sorting nexin 2	GenelD: 28966 122,215-122,375
10	PPIC peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	GenelD: 5480 122,385-122,405
11	PRDM6 PR domain containing 6	GenelD: 93166 122,534-122,544
12		
13	FLJ36090 hypothetical protein FLJ36090	GenelD: 153241 122,715-122,755
14	CSNK1G3 casein kinase 1, gamma 3	GenelD: 1456 122,910-122,990
15	LOC391827 similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18)	GenelD: 391827 123,010-123,030
16	ZNF608 zinc finger protein 608	GenelD: 57507 124,010-124,110
17	LOC391828 similar to ribosomal protein L28	GenelD: 391828 124,17
18	LOC441105 LOC441105	GenelD: 441105 124,410-124,510
	D5S615	125,191 Mb
19	LOC389319 hypothetical LOC389319	GenelD: 389319 125,725
20	NS3TP2 HCV NS3-transactivated protein 2	GenelD: 65983 125,785-125,855
21	GRAMD3 GRAM domain containing 3	GenelD: 65983 125,787-125,857
22	ALDH7A1 aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	GenelD: 501 125,915-125,955
23	RNUXA RNA U, small nuclear RNA export adaptor (phosphorylation regulated)	GenelD: 51808 125,964-125,988
24	LOC133609 similar to 60S acidic ribosomal protein P1	GenelD: 133609 125,995
25	FLJ27505 FLJ27505 protein	GenelD: 389320 125,995-126,005
26	LMNB1 lamin B1	GenelD: 4001 126,145-126,205
27	LOC389321 hypothetical LOC389321	GenelD: 389321 126,225
28	MARCH3 membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	GenelD: 115123 126,235-126,395
29	LOC401207 hypothetical gene supported by AK126569	GenelD: 401207 126,415-126,435
30	MRPS5P3 mitochondrial ribosomal protein S5 pseudogene 3	GenelD: 133615 126,505
31	twenty two protein)	GenelD: 345818 126,535-126,645
32	MEGF10 MEGF10 protein	GenelD: 84466 126,655-126,825
33	LOC389322 similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	GenelD: 389322 126,875
34	LOC133619 hypothetical protein MGC12103	GenelD: 133619 126,885-126,925
35	LOC441106 similar to hypothetical protein	GenelD: 441106 127,065-127,245
36	LOC389323 similar to hypothetical protein	GenelD: 389323 127,295-127,305
37	SLC12A2 solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	GenelD: 6558 127,445-127,555
38	FBN2 fibrillin 2 (congenital contractural arachnodyly)	GenelD: 2201 127,621-127,901
39	LOC644882 hypothetical protein LOC644882	GenelD: 644882 127,901-128,022
40	SLC27A6 solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6	GenelD: 28965 128,329-128,397
41	ISOC1 isochorismatase domain containing 1	GenelD: 51015 128,458-128,477
42	ADAMTS19 ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 19	GenelD: 171019 128,824-129,102
43	CSS3 chondroitin sulfate synthase 3	GenelD: 337876 129,268-129,550
44	HINT1 histidine triad nucleotide binding protein 1	GenelD: 3094 130,522-130,528
45	CDC42SE2 CDC42 small effector 2	GenelD: 56990 130,723-130,754
46	RAPGEF6 Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	GenelD: 51735 130,789-130,998
47	KIAA1961 KIAA1961 gene	GenelD: 96459 131,005-131,160
48	LOC653554 similar to acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	GenelD: 653554 131,170-131,221
49	ACSL6 acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	GenelD: 23305 131,317-131,375
50	IL3 interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)	GenelD: 3562 131,424-131,426
51	CSF2 colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GenelD: 1437 131,437-131,439
52	P4HA2 procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha poly	GenelD: 8974 131,556-131,591
53	PDLIM4 PDZ and LIM domain 4	GenelD: 8572 131,621-131,637
54	SLC22A4 solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4	GenelD: 6583 131,658-131,707
55	SLC22A5 solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5 [GenelD: 6584 131,733-131,759
56	LOC441108 hypothetical gene supported by AK128882	GenelD: 441108 131,774-131,825
57	IRF1 interferon regulatory factor 1	GenelD: 3659 131,846-131,854
58	IL5 interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)	GenelD: 3567 131,905-131,907
59	RAD50 RAD50 homolog (S. cerevisiae)	GenelD: 10111 131,920-132,007
60	IL13 interleukin 13	GenelD: 3596 132,021-132,024
61	IL4 interleukin 4	GenelD: 3565 132,037-132,046
62	SEPT8 septin 8	GenelD: 23176 132,114-132,140
63	ANKRD43 ankyrin repeat domain 43	GenelD: 134548 132,177-132,180
64	SHROOM1 shroom family member 1	GenelD: 134549 132,185-132,189
65	GDF9 growth differentiation factor 9	GenelD: 2661 132,225-132,228
66	AFF4 AF4/FMR2 family, member 4 [GenelD: 27125 132,230-132,239
	D5S2117	133,415 Mb

^a Die Marker, Genbezeichnungen, Gen IDs und deren Lokalisation sind der elektronischen Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen.

Tabelle XIV Gene in der Region der für M1- Zellen signifikant häufig deletierten Marker für Chromosomenarm 3p

	Gen	Gen ID ^a	Lokalisation ^a
Chromosom 3	41,2 Mb < 44,588 Mb (D3S3624)-46,516Mb (D3S32) < 46,8 Mb		
1	CTNNB1	GenelD: 1499	41,215-41,265 Mb
2	ULK4 unc-51-like kinase 4	GenelD: 54986	41,805-41,985
3	OIP106 OGT(O-Glc-NAc transferase)-interacting protein 106 KDa	GenelD: 22906	42,185-42,225
4	CCK cholecystokinin	GenelD: 885	42,275-42,285
5	LOC391530 similar to SALL4B	GenelD: 391530	42,285-42,345
6	LYZL4 lysozyme-like 4	GenelD: 131375	42,415-42,435
7	VIPR1 vasoactive intestinal peptide receptor 1	GenelD: 7433	42,525-42,555
8	SEC22L3 SEC22 vesicle trafficking protein-like 3	GenelD: 9117	42,565-42,595
9	SS18L2 synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 2	GenelD: 51188	42,605-42,615
10	NKTR natural killer-tumor recognition sequence	GenelD: 4820	42,625-42,665
11	ZNF651 zinc finger protein 651	GenelD: 92999	42,675-42,685
12	KBTBD5 kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 5	GenelD: 131377	42,705-42,715
13	C3orf3 chromosome 3 open reading frame 3	GenelD: 57467	42,715-42,725
14	FLJ14566 hypothetical protein FLJ14566	GenelD: 84892	43,095-43,125
15	SNRK SNF-1 related kinase	GenelD: 54861	43,305-43,365
16	FLJ10375 hypothetical protein FLJ10375	GenelD: 55129	43,385-43,645
17	ZNF445 zinc finger protein 445	GenelD: 353274	44,445
18	ZNF167 zinc finger protein 167	GenelD: 55888	44,545
	D3S3624		44,589 Mb
19	ZNF660 zinc finger protein 660	GenelD: 285349	44,601,460-44,612,561
20	ZNF197 zinc finger protein 197	GenelD: 10168	44,641,515-44,664,967
21	ZNF35 zinc finger protein 35	GenelD: 7584	44,665,259-44,677,280
22	ZNF502 zinc finger protein 502	GenelD: 91392	44,729,142-44,740,327
23	ZNF501 zinc finger protein 501	GenelD: 115560	44,746,128-44,753,578
24	KIAA1143 KIAA1143	GenelD: 57456	44,769,530-44,778,158
25	KIF15 kinesin family member 15	GenelD: 56992	44,778,289-44,869,749
26	TMEM42 transmembrane protein 42	GenelD: 131616	44,878,412-44,882,160
27	TGM4 transglutaminase 4 (prostate)	GenelD: 7047	44,891,131-44,931,101
28	FLJ20209 hypothetical protein FLJ20209	GenelD: 57245	44,931,759-44,935,910
29	ZDHHC3 zinc finger, DHHC-type containing 3	GenelD: 51304	44,941,663-44,992,618
30	EXOSC7 exosome component 7	GenelD: 23016	44,992,768-45,027,966
31	CLEC3B C-type lectin domain family 3, member B	GenelD: 7123	45,042,774-45052,567
32	CDCP1 CUB domain containing protein 1	GenelD: 64866	45,098,773-45,162,918
33	TMEM158 transmembrane protein 158	GenelD: 25907	45,240,962-45,242,758
34	LARS2 leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	GenelD: 23395	45,405,079-45,565,332
35	LIMD1 LIM domains containing 1	GenelD: 8994	45,611,355-45,696,569
36	LOC644714 hypothetical protein LOC644714	GenelD: 644714	45,694,174-45,705,372
37	SACM1L SAC1 suppressor of actin mutations 1-like (yeast)	GenelD: 22908	45,705,947-45,761,905
38	SLC6A20 solute carrier family 6 (proline IMINO transporter), member 20	GenelD: 54716	45,771,946-45,812,966
39	LZTFL1 leucine zipper transcription factor-like 1	GenelD: 54585	45,840,450-45,858,625
40	CCR9 chemokine (C-C motif) receptor 9	GenelD: 10803	45,903,023-45,919,671
41	CXCR6 chemokine (C-X-C motif) receptor 6	GenelD: 10663	45,959,977-45,964,849
42	FYCO1 FYVE and coiled-coil domain containing 1	GenelD: 79443	45,934,400-46,012,304
43	XCR1 chemokine (C motif) receptor 1	GenelD: 2829	46,037,259-46,043,983
44	(VEGFR-1)	GenelD: 391533	46,158,854-46,160,287
45	CCR1 chemokine (C-C motif) receptor 1	GenelD: 1230	46,218,204-46,224,836
46	CCR3 chemokine (C-C motif) receptor 3	GenelD: 1232	46,258,692-46,283,166
47	CCR2 chemokine (C-C motif) receptor 2	GenelD: 1231	46,370,364-46,377,426
48	LOC653725 similar to C-C chemokine receptor type 5 (C-C CKR-5)	GenelD: 653725	46,386,643-46,392,695
49	CCRL2 chemokine (C-C motif) receptor-like 2	GenelD: 9034	46,423,725-46,426,018
50	LTF lactotransferrin	GenelD: 4057	46,452,500-46,481,399
51	RTP3 receptor transporter protein 3	GenelD: 83597	46,514,489-46,517,443
	D3S32		46,515,925
52	LRRRC2 leucine rich repeat containing 2	GenelD: 79442	46,531,917-46,596,576
53	LUZPP1 leucine zipper protein pseudogene 1	GenelD: 83598	46,574,307-46,574,822
54	TDGF1 teratocarcinoma-derived growth factor 1	GenelD: 6997	46,594,217-46,598,957
55	ALS2CL ALS2 C-terminal like	GenelD: 259173	46,685,683-46,710,175
56	TMIE transmembrane inner ear	GenelD: 259236	46,717,827-46,727,205
57	TSP50 testes-specific protease 50	GenelD: 29122	46,728,610-46,734,368

^a Die Marker, Genbezeichnungen, Gen IDs und deren Lokalisation sind der elektronischen Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen.

Hiermit erkläre ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bern, im Februar 2008