

Die Rolle des EFEMP1- Gens und die Identifikation von Kandidatengenen im sporadischen Mammakarzinom

**Ariane Sadr-Nabavi
München
März 2006**

Die Rolle des EFEMP1- Gens und die Identifikation von Kandidatengenen im sporadischen Mammakarzinom

Dissertation

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

Vorlage von

Ariane Sadr-Nabavi

Erklärung

März 2006

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom Oktober 2004 von Prof. Dr. Thomas Cremer betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

München, den 06.03.2006

Unterschrift

Dissertation eingereicht am: März 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer
2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Sondergutachter: Prof. Dr. Alfons Meindl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2006

Meinen Eltern

به حکم آن که به دوران بماند این آثار
ببرده رنج فراوان و محنت بسیار
به دور از قریبا همچو یوسف کنعان
چه گویمدت چه کشیدم زدست لیل و نهار
رضا صدر نبوی

Inhaltsverzeichnis

ERKLÄRUNG	
INHALTSVERZEICHNIS	
1. EINLEITUNG	
1.1 DAS MAMMAKARZINOM.....	1
1.1.1 <i>Aufbau der weiblichen Brust</i>	2
1.1.2 <i>Pathomorphologie des Mammakarzinoms</i>	5
1.2 DIE TUMORENTSTEHUNG.....	10
1.3 IDENTIFIZIERUNG VON KANDIDATENGENEN DURCH „IN SILICO“ METHODE UND STRATEGIE ZUR VALIDIERUNG VON KANDIDATENGENEN.....	17
1.4 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX UND IHRE ROLLE BEI DER TUMORGENESE.....	19
1.5 ZIELSETZUNG.....	25
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 MATERIAL.....	27
2.1.1 <i>Chemikalien und Verbrauch Reagenzien</i>	27
2.1.2 <i>Enzyme</i>	29
2.1.3 <i>Medien, Puffer und Lösungen</i>	29
2.1.3.1 <i>Nährmedien für Bakterienkultur</i>	29
2.1.3.2 <i>Nährmedien für Zellkultur</i>	30
2.1.3.3 <i>Allgemein benutzte Puffer und Lösungen</i>	30
2.1.3.4 <i>Puffer und Lösungen für die Hybridisierung</i>	31
2.1.3.5 <i>Puffer und Lösungen für den Western-Blot</i>	32
2.1.4 <i>Kits</i>	32
2.1.5 <i>Klone</i>	33
2.1.6 <i>Oligonukleotide (Primer)</i>	33
2.1.7 <i>Expressions-Arrays</i>	33
2.1.8 <i>Patienten-Material</i>	33
2.2 METHODEN.....	34
2.2.1 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	34
2.2.1.1 <i>Präparation genomischer DNA aus Blut</i>	34
2.2.1.2 <i>DNA-Isolierung aus Geweben (bei -80° C gelagert)</i>	35
2.2.1.3 <i>DNA-Isolierung aus in Paraffin eingebettetem Gewebe</i>	35
2.2.1.4 <i>RNA-Isolierung aus Zellen und mikrodisektiertem Material</i>	36
2.2.1.5 <i>DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	37
2.2.1.6 <i>LOH-Analyse</i>	38
2.2.1.7 <i>DHPLC (“denaturing high performance liquid chromatography“)</i>	40
2.2.1.8 <i>Sequenzierung nach Sanger</i>	42
2.2.1.9 <i>RT-PCR</i>	44
2.2.1.10 <i>Vermehrung von Plasmiden und Isolierung von cDNA-Klonen</i>	44
2.2.1.11 <i>Herstellung von „full-length“- Klonen</i>	45
2.2.1.12 <i>„Expressions-Arrays“</i>	46
2.2.1.13 <i>Hybridisierungen</i>	46
2.2.1.14 <i>BST-Behandlungen von DNA</i>	47
2.2.1.15 <i>Bisulfit-PCR</i>	48
2.2.1.16 <i>Klonierung der BST- Fragmente</i>	50
2.2.2 <i>Zellkulturmethoden</i>	51
2.2.2.1 <i>Zellkultivierung</i>	51
2.2.2.2 <i>Passagierung von Zellen</i>	51
2.2.2.3 <i>Kryokonservierung von Zellen</i>	52
2.2.2.4 <i>Transiente und stabile Transfektion</i>	52
2.2.2.5 <i>Bekämpfung von Kontamination mit Pilzen oder Bakterien</i>	53
2.2.2.6 <i>Produktionen von konditioniertem Medium</i>	53
2.2.3 <i>Proteinchemische Methoden</i>	53
2.2.3.1 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE) und Western- Transfer</i>	53
2.2.3.2 <i>Immunblotting</i>	54
2.2.4 <i>Histologie</i>	55
2.2.4.1 <i>Fixierung und Einbetten von Geweben und Zell-Clots</i>	55
2.2.4.2 <i>Anfertigung histologischer Schnitte für die HE-Färbung</i>	55
2.2.4.3 <i>Hämatoxylin – Eosin-Färbung (HE)</i>	55
2.2.4.4 <i>Immunofluoreszenz</i>	56

2.2.4.5	Immun- Peroxidasefärbung	57
2.2.4.6	Tissue Microarrays (TMAs)	59
2.2.5	<i>Affymetrix</i> Microarrays	59
2.2.6	Datenbanken und Computerprogramme	63
2.2.6.1	Datenbanken im Internet.....	63
2.2.6.2	Suche nach Promotoren.....	64
2.2.7	Statistische Methoden.....	65
3.	ERGEBNISSE.....	66
3.1	AUSWAHL UND BESTÄTIGUNG DER DIFFERENZIELLEN EXPRESSION DER KANDIDATENGENE AUF RNA- EBENE IN SPORADISCHEN MAMMA-, OVARIAL- UND UTERUSKARZINOMEN.....	66
3.1.1	<i>Expressionsanalyse der Kandidaten-Gene mittels Cancer Profiling Array (CPA)</i>	66
3.1.2	<i>Vergleichende Analyse der Genexpression mit Affymetrix- Microarrays an Tumor-Material der Brust und des Ovars</i>	70
3.2	LOH-ANALYSE BEI TUMORSUPPRESSORGENEN IN SPORADISCHEN GYNÄKOLOGISCHEN MAMMAKARZINOMEN.....	81
3.3	MUTATIONSANALYSEN IN TUMORSUPPRESSORGENEN MITTELS DHPLC UND DIREKTER SEQUENZIERUNG IM MAMMAKARZINOM.....	84
3.4	EPIGENETISCHE ANALYSEN	87
3.4.1	<i>Promotoranalyse des CAV-1</i>	87
3.4.2	<i>Bisulfitssequenzierung des Promotorbereichs beim CAV-1-Gen</i>	88
3.4.3	<i>Promotoranalyse von SASH1</i>	91
3.4.4	<i>Bisulfitssequenzierung des Promotorbereichs beim SASH1-Gen</i>	92
3.4.5	<i>Promotoranalyse von EFEMP1</i>	96
3.4.6	<i>Bisulfitssequenzierung des Promotorbereichs beim EFEMP1-Gen</i>	96
3.5	PROGNOSTISCHE RELEVANZ VON EFEMP1.....	104
3.5.1	<i>Charakterisierung eines EFEMP1-spezifischen Antikörpers</i>	104
3.5.2	<i>Lokalisierung von EFEMP1 in Brustgewebe</i>	107
3.5.3	<i>Korrelation von EFEMP1-Expression mit klinischen Parametern</i>	110
4.	DISKUSSION	116
4.1	ALLGEMEINS	116
4.2	VALIDIERUNG DER EXPRESSION PUTATIVER TUMORSUPPRESSOR- UND ONKOGENE	117
4.3	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER DURCH EXPRESSIONSANALYSEN CHARAKTERISIERTEN GENE.....	128
4.3.1	<i>Dermatopontin</i>	128
4.3.2	<i>Eplin</i>	132
4.3.3	<i>SLPI</i>	133
4.3.4	<i>CSE1L/CAS</i>	134
4.3.5	<i>CRYAB</i>	135
4.3.6	<i>CAP G</i>	136
4.3.7	<i>CAV-1</i>	136
4.3.8	<i>WFDC2</i>	137
4.3.9	<i>Hypothetical Protein DKFZP761F214</i>	138
4.3.10	<i>PTP1c/HCP und PLCG1</i>	139
4.3.11	<i>EFEMP1</i>	140
4.4	DIE ROLLE VON SASH1 IM SPORADISCHEN MAMMAKARZINOM	141
4.5	DIE ROLLE DES EFEMP1 IM SPORADISCHEN MAMMAKARZINOM	143
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	158
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	161
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	175
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	177
9.	TABELLENVERZEICHNIS.....	178
	ANHANG.....	179
	DANKSAGUNG.....	200
	LEBENS LAUF.....	202
	VERÖFFENTLICHUNGEN, POSTER, SEMINARE UND VORTRÄGE:	203

1. Einleitung

Der Begriff „Krebs“ steht für maligne Tumoren, die sich von benignen Tumoren durch infiltratives und destruktives Wachstum sowie durch die Fähigkeit zur Metastasenbildung unterscheiden. Die Namensgebung geht vermutlich auf den Griechen Galenus zurück, der neben Hippokrates der bedeutendste Arzt der Antike war. Der Name Krebs wurde Galenus zufolge durch die Ähnlichkeit der geschwellenen Venen eines äußeren Tumors mit Krebsbeinen inspiriert. Zuvor verwendete Aristoteles den Begriff „Krebs“ vermutlich als erster, als er damit oberflächlich feststellbare, in benachbarte Organe infiltrierende und einwachsende Geschwülste beschrieb. In Deutschland erkranken etwa 395.000 Menschen jährlich an Krebs, davon rund 195.000 Frauen und 200.000 Männer. Die meisten Fälle treten im Alter von über 60 Jahren auf. Die unter 60-Jährigen machen mit etwa 107.000 Fällen rund ein Viertel der Krebsneuerkrankungen aus. Die weltweit häufigsten krebsbedingten Todesursachen bei Frauen sind gynäkologische Karzinome, d.h. Mamma-, Ovarial und Endometriumkarzinome (Glaus et al., 1997; Largiader et al., 2001)

1.1 Das Mammakarzinom

Brustkrebs ist die am häufigsten diagnostizierte bösartige Erkrankung bei Frauen in westlichen Industrieländern und eine führende Todesursache bei Frauen mittleren Alters. Weltweit sind jährlich ca. eine Million Frauen von dieser Krankheit betroffen (Parkin et al., 2001). Laut der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland erkrankten 2004 allein in Deutschland 47.500 Frauen an Brustkrebs. Brustkrebs ist für 24,4 % aller Krebsneuerkrankungsfälle bei Frauen und für mehr als ein Drittel (34 %) der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren verantwortlich.

Das durchschnittliche Erkrankungsalter (Feldstudien-Kollektives München, 2000 mit 3210 primär operierten Patientinnen) beträgt 61,4 Jahre. Es erkrankten 27,8% mit über 70 Jahren, 52% im Alter zwischen 50 und 69 Jahren und 20,2% im Alter unter 50 Jahren. Diese 20,2% verteilen sich auf verschiedene Altersgruppen wie folgt: 10,2% (45 – ≤ 50 Jahre), 5,5% (40 – ≤ 45 Jahre), 3% (35 – ≤ 40 Jahre), 1,6% (30 – ≤ 35 Jahre) und 0,1% (unter 30 Jahre). Die Brustkrebsinzidenz im Saarland und – auf niedrigerem Niveau – in der ehemaligen DDR stieg von 1970 bis Ende der 80er Jahre deutlich an.

Die geschätzte Inzidenz für Deutschland geht erstmalig Mitte der 90er Jahre deutlich zurück. Die deutsche Mortalitätsrate ist schon seit Beginn der 90er Jahre rückläufig.

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen beträgt 76 %. Wenige Jahre zuvor wurde eine 5-Jahres-Überlebensrate von 73 % ermittelt (ABKD, 2004).

Die Erkrankungsraten für Deutschland liegen im europäischen Vergleich im mittleren Drittel. In Dänemark, Belgien, Schweden und den Niederlanden ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit deutlich höher, in südeuropäischen Ländern wie Spanien, Griechenland und Portugal deutlich niedriger.

Es konnte gezeigt werden, dass Frauen, in deren naher Verwandtschaft Brustkrebserkrankungen aufgetreten sind, ein erhöhtes Brustkrebsrisiko tragen. Eine frühe erste Regelblutung (Menarche), Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt, später Eintritt in die Menopause, Hormonersatztherapie in Klimakterium und Postmenopause sowie ionisierende Strahlung sind ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert. Eine erste ausgetragene Schwangerschaft in jungen Jahren und viele Geburten verringern umgekehrt das Brustkrebsrisiko. In verschiedenen Studien wurden auch Zusammenhänge zu Übergewicht, Bewegungsmangel, fett- und kalorienreicher Nahrung und regelmäßigem Alkoholkonsum beobachtet.

1.1.1 Aufbau der weiblichen Brust

Die Brüste der geschlechtsreifen Frau reichen von der dritten bis zur sechsten oder siebten Rippe. Eine Brust besteht aus Drüsen- und Fett- sowie Bindegewebe. Sie liegt unter der Haut, von der sie durch eine dünne bindegewebige Schicht, der so genannten Subkutanfaszie getrennt ist. Auf der anderen Seite sitzt sie auf dem großen Brustmuskel (= Musculus pectoralis), der ebenfalls von einer dünnen Bindegewebsschicht, der „Pectoralisfaszie“ umgeben ist. Man unterscheidet im Brustgewebe die duktalem Anteile (Ductus lactifer: Milchgang), und die lobulären Anteile, die zusammen die Milch produzierenden Strukturen (terminale duktulobuläre Einheit) des Milchgangsystems darstellen. Die kleineren und größeren Milch abführenden Gänge (Duktuli) werden von Ductus lactifer gebildet und münden in die Mamilla (Brustwarze). Die Brustdrüse besteht aus 15 bis 20 einzelnen Läppchen (lobuli), aus denen die Milchgänge (Dukti)

hervorgehen (siehe Abb1.1). Die Drüsenläppchen selber sind kleine Aussackungen, die in einen Milchgang münden. Sie liegen auf der körpernahen Seite der Brust. In ihnen wird während der Stillzeit die Muttermilch produziert. Die Brustwarze enthält glatte Muskelfasern, die das Hartwerden der Brustwarze ermöglichen. Bindegewebsstränge durchziehen die Brüste von der Haut bis zum Brustmuskel und bestimmen die Straffheit der Brust.

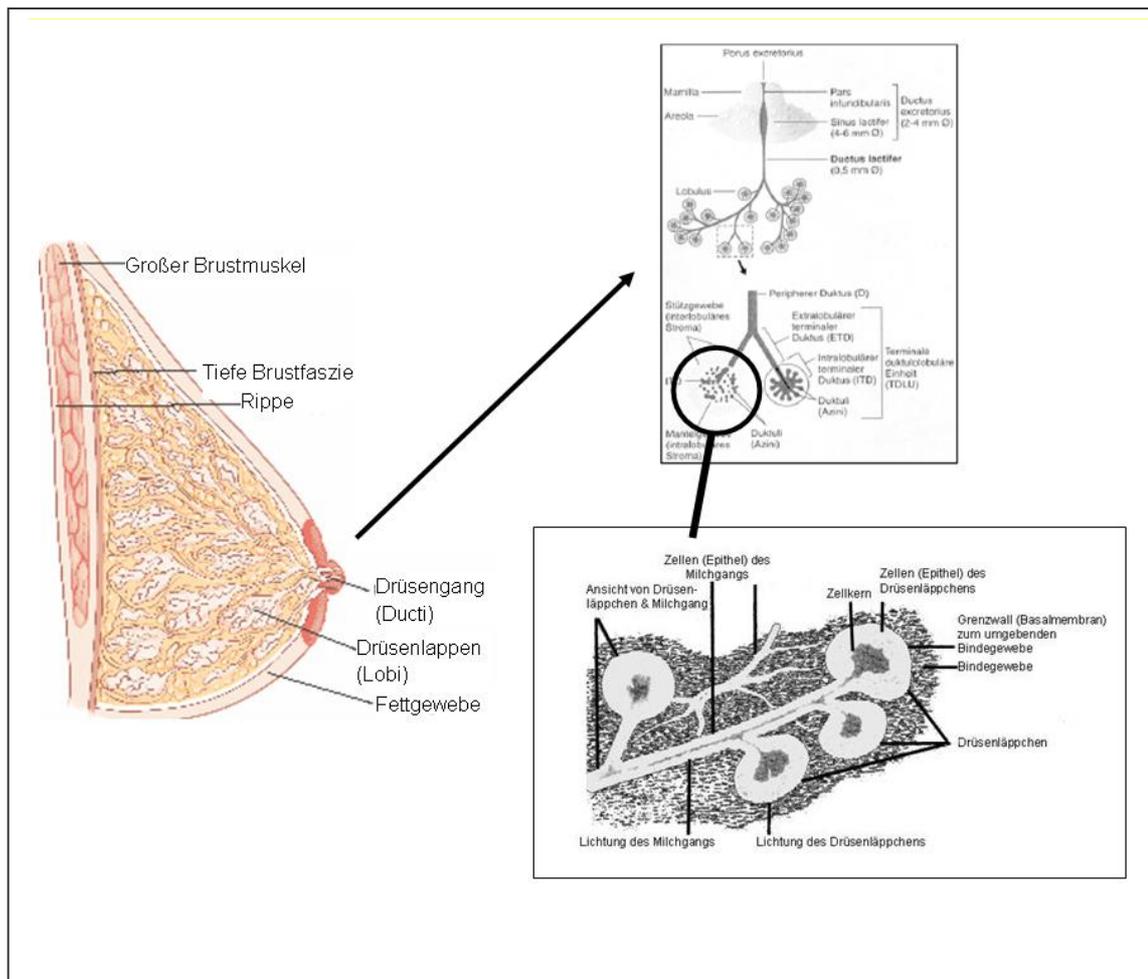


Abb. 1.1: Aufbau der weiblichen Brust und deren Terminologie.

Die Lymphgefäße der Brustdrüse beginnen zwischen den Milchläppchen und begleiten die Milchgänge (Siehe Abb.1.1). Sie nehmen weiße Blutkörperchen, Krankheitserreger und Flüssigkeit auf, die aus den feinsten Blutgefäßen ausgetreten ist. Auch Krebszellen transportieren sie ab. Die Lymphe fließt über größere Lymphbahnen zu den Lymphknoten. Hier werden Krankheitserreger und Krebszellen ausgefiltert. Die Lymphe der Brust fließt zum größten Teil durch die Lymphknoten der Achsel. Anatomisch werden diese in drei Ebenen eingeteilt. Der Rest der Lymphe gelangt zu den Lymphknoten ober- und unterhalb des Schlüsselbeins und hinter das Brustbein. Wenn der Tumor Metastasen aussendet, so folgen diese dem Lymphfluss. Die Achsellymphknoten sind meistens zuerst befallen. Um die Behandlungsstrategie bei Brustkrebs festzulegen, müssen diese deshalb immer auf Tumorzellen untersucht werden. Das gilt aber nicht beim Carcinoma in situ, das die Grenze zum Nachbargewebe noch nicht durchbrochen hat (siehe Abschnitt 1.1.2).

Das Brustgewebe unterliegt dem ständigen hormonellen Einfluss während des monatlichen Zyklus der Frau, in der Schwangerschaft und der Menopause. Dies ist eine mögliche Erklärung für das häufige Auftreten von Mammakarzinom bei Frauen im Vergleich zu Männern.

Die männliche Brust entspricht in ihrer Anlage der weiblichen. Sie ist eine über dem großen Brustmuskel liegende rundliche Platte aus Drüsen-, Fett- und Bindegewebe, versorgt durch Adern, Nerven und Lymphgefäße. Im Gegensatz zur weiblichen Brust, deren Drüsen, Milchgänge und Fettkörper sowie Brustwarze und Warzenhof unter dem Einfluss weiblicher Hormone in der Pubertät zu wachsen beginnen, entwickelt sie sich jedoch nicht weiter sondern wird unter dem Einfluss männlicher Hormone regressiv in eine bindegewebige Platte umgewandelt. Brustwarze und Warzenhof bleiben klein und sind in ihrer Lage beim Mann viel konstanter als bei der Frau. Die Brustwarzen liegen meist in der Höhe des Raumes zwischen vierter und fünfter Rippe oder auf der fünften Rippe. Die Gefäß- und Nervenversorgung entspricht in kleinerem Maßstab jener der weiblichen Drüse.

Wie erwähnt, stellen Mammakarzinome die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau dar. Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass Proliferation und Funktion des normalen Brustdrüsenorgans durch ein kompliziertes Mosaik von Hormonen (endokrine Regulation) sowie lokal wirksamen inter- und intrazellulären Faktoren (parakrine und autokrine Regulation) gesteuert werden. Zwischen den regulativ wirksamen Substanzen bestehen enge Wechselbeziehungen, die bis heute nicht hinreichend geklärt sind. In diesem Zusammenhang ist besonders die Rolle der Hormonabhängigkeit der Brustdrüse zu überdenken.

1.1.2 Pathomorphologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist in seinem klinischen, pathologischen und histopathologischen Erscheinungsbild sehr variabel.

Die Karzinogenese ist ein komplexer Prozess, der in die Phasen Initiation, Promotion und Progression unterteilt wird (Scherer, 1984). Im ersten Schritt, der Initiation, kommt es zu einer persistierenden Veränderung der DNA. In der folgenden Phase der Promotion kommt es zur klonalen Expansion der initiierten Zellen.

Der weitere Schritt der Tumorentstehung ist die maligne Progression. Unter maligner Progression versteht man die Ausbreitung transformierter Zellen im Organismus. Unter den soliden Tumoren umfasst die Promotion der Karzinome, also der epithelialen Tumoren, einige spezifische Schritte.

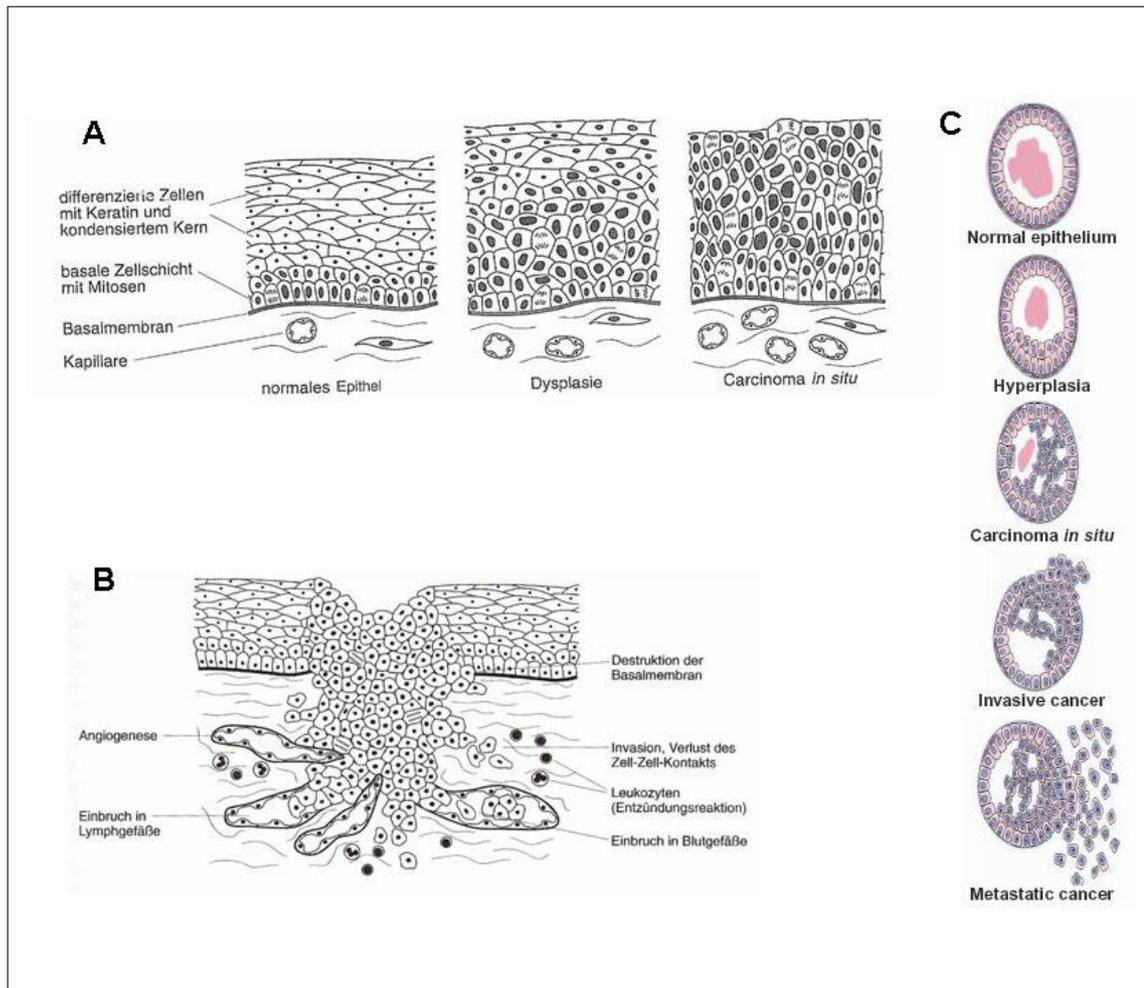


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen, die im Plattenepithel, z. B. der Cervix (Schema A und B) und im Drüsenepithel der Mamma (Schema C) im Laufe der malignen Transformation erkennbar werden. (modifiziert nach Wagner 1999 und Albertson et al., 2003).

Die morphologischen Veränderungen, die innerhalb des Epithels im Laufe der malignen Progression geschehen, sind in Abb. 1.2 am Beispiel des Zervixkarzinoms und Mammakarzinoms dargestellt. Im normalen Plattenepithel der Zervix teilen sich die Zellen in der basalen Schicht. Mildeste, aber nicht obligate Form der malignen Transformation ist die Hyperplasie, in der das Epithel verdickt und der Anteil an Mitosen in den Zellen, die an die Basalmembran angrenzen, steigt. Die nächste morphologisch fassbare Stufe ist die sogenannte geringgradige intraepitheliale Neoplasie (alte Bezeichnung: Dysplasie), bei der die Zellteilung in den suprabasalen Schichten des Epithels auftritt. Die Zellen sind zwar morphologisch verändert, d. h. sie

sind hyperchromatisch und zeigen eine leichte Anisonukleose, aber sie weisen noch Zeichen der Differenzierung und Ausreifung auf. Die nächste Stufe ist hochgradige intraepitheliale Neoplasie (alte Bezeichnung: Carcinoma in situ), bei der die Zellen keine Anzeichen von Differenzierung zeigen und hochgradige Zellatypien vorliegen, aber die Basalmembran noch intakt ist. Mit dem Durchbruch der Basalmembran durch die Tumorzellen sind die Definitionskriterien des malignen Tumors, d. h. des invasiven Karzinoms erfüllt. Die Tumorzelle wandert ins Bindegewebe ein und bewegt sich im Bindegewebe weiter, was als Invasion bezeichnet wird. Das Auswachsen der Kapillaren aus den vorhandenen Blutgefäßen, die zur Blutversorgung des Tumors dienen, nennt man Angiogenese. Der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und der Einbruch der Tumorzelle in die Lymph- und Blutgefäße werden als Metastasierung bezeichnet (Siehe Abb.1.2).

In den duktalem intraluminalen (in situ-) Proliferationen der Brustdrüse beobachtet man etwas andere Veränderungen, als in den oben beschriebenen Läsionen des Plattenepithels, da normale Läppchen und Gänge nur aus zwei Epithellagen aufgebaut sind: dem apikalen/ sekretorischen Epithel und dem basalen Myoepithel. In den benignen Proliferationen (z.B. Gewöhnliche (Usual) Duktale Hyperplasie/ UDH), die nicht mit einem höheren Risiko für invasive Karzinom assoziiert sind, proliferieren immer beide Epitheltypen, dagegen proliferieren in den als „atypisch“ bezeichneten Läsionen meist nur die sekretorischen differenzierten Epithelien, das Myoepithel ist peripher entweder erhalten, reduziert oder es fehlt. Atypische duktalem (und lobuläre) Proliferationen werden je nach Ausprägung der zellulären und nukleären Atypien der proliferierenden neoplastischen Zellpopulation und je nach Wachstumsmuster hauptsächlich klassifiziert in: Atypische Duktale Hyperplasie (ADH), Flache Epitheliale Atypie (FEA), Lobuläre Neoplasie (LN) oder eine der Varianten des Duktalen Carcinoma In Situ (DCIS).

Es gibt verschiedene Hinweise dafür, dass die Entstehung von Mammakarzinom mit der Anhäufung genetischer Veränderungen einhergeht und dass spezifische histologische Subtypen aufgrund bestimmter molekularer Veränderungen entstehen. Ein Modell für die schrittweise Karzinogenese für das am häufigsten vorkommende duktalem Mammakarzinom ist das Modell nach Russo et al., 1998.

Die schrittweise Karzinogenese erfolgt nach diesem Modell folgendermaßen:

Normales Epithel → Hyperplasie → Atypische Duktale Hyperplasie (ADH) → Niedriggradiges duktales Carcinoma *in situ* → Hochgradiges Duktales Carcinoma *in situ* → invasives duktales Karzinom → Metastasierung.

Neuere Modelle deuten aber darauf hin, dass dieses Modell einer linearen Progression morphologisch fassbarer Veränderungen so nicht zutrifft. Detaillierte molekularbiologische Untersuchungen an den o.g. definierten proliferativen Läsionen der Brustdrüse deuten eher darauf hin, dass es sich nicht um ein Kontinuum handelt, sondern zumindest teilweise um Läsionen unterschiedlicher molekularer Genese, mit einem gesicherten unterschiedlichen Risikoprofil für die Entstehung eines invasiven Mammakarzinoms. Derzeit gelten zumindest die Atypische Duktale Hyperplasie, die flache epitheliale Atypie und auch die lobuläre Neoplasie (früher als lobuläres Carcinoma *in situ* bezeichnet) nur als sog. „Risikoläsionen“. Allerdings ist die Datenlage komplex, so wurden in bis zu 50% der ADH Fälle dieselben LOH Befunde nachgewiesen, die auch in simultanen invasiven Karzinomen derselben Brust nachweisbar waren. Patientinnen, bei denen isolierte präinvasiven Veränderungen wie die ADH oder die LN - meist als Zufallsbefund - nachgewiesen werden, haben ein erhöhtes Risiko (RR 4.0-5.0), an irgendeiner Stelle in einer der beiden Brüste ein Mammakarzinom zu entwickeln. Beim DCIS hohen Malignitätsgrades ist dies im Gegensatz dazu aber anders, hier tritt nach vorheriger Behandlung eines DCIS das Rezidiv als DCIS oder als invasives Karzinom in der Regel im selben Brustdrüsenbereich auf, was nach unvollständiger Entfernung und bei Verzicht auf eine lokale Nachbestrahlung nach brusterhaltender Operation in bis zu 25% der Patientinnen beobachtet wurde (Tavassoli et al., 2003).

Invasive Karzinome der Brustdrüse können aufgrund ihres histologischen Bildes in zwei Haupttypen, die invasiv duktales und die invasiv lobulären Karzinome unterteilt werden. Das häufigste vorkommende Mammakarzinom ist das invasiv duktales Karzinom (70 % - 80 %), das seltener vorkommende ist das invasiv lobuläre Karzinom (10 % - 20 %). Neben diesen zwei Hauptgruppen, gibt es noch zahlreiche seltenere Varianten wie das muzinöse (2 %), medulläre (3 % - 7 %), papilläre (0,5 % - 1,5 %), tubuläre (1 % - 3 %) und adenoid-zystische Karzinom (< 1 %). (Stegner et al., 1986; De Vita et al., 2001). Neben der histologischen Typisierung ist es auch üblich, Karzinome

zu graduieren. Diese Graduierung, auch Malignitätsgrad genannt, ist eine histologisch basierte Einteilung der Tumoren in 3 Grade (G1-G3): hochdifferenziert (Grad 1, niedriger Malignitätsgrad), mäßig differenziert (Grad 2, intermediärer Malignitätsgrad) und niedrig differenziert (Grad 3, hoher Malignitätsgrad). Diese Einteilung hat prognostische Relevanz und ist damit von klinischer Bedeutung. Tumoren mit niedrigem histologischem Malignitätsgrad (Grad 1) liegen in etwa 15 % der Fälle vor, Tumoren von Grad 2, in etwa 65 % der Fälle und Tumoren von Grad 3 ebenfalls in etwa 15 % aller Mammakarzinome.

Bisher wurden jedoch noch kein zuverlässigen Modelle für die molekulare Pathogenese und die molekulare Typisierung von Brusttumoren entwickelt. Die detaillierte Information über spezifische Gen-Netzwerke könnte deshalb zu einem besseren Verständnis der Karzinogenese von Brusttumoren führen und gleichzeitig die Identifizierung neuer potenzieller Zielmoleküle für therapeutische Ansätze sowie neue prädiktive und prognostische Marker mit sich bringen.

1.2 Die Tumorentstehung

Die Entstehung von Tumoren ist ein Mehrschrittprozess, der durch die Anhäufung von Mutationen in der Zelle verursacht wird. Diese Mutationen führen dazu, dass molekulare Kontrollmechanismen wie Zellteilung, Differenzierung und Apoptose, welche normalerweise einem strikten Programm folgen, außer Kontrolle geraten. So können die Zellen, die eine genetische Veränderung erfahren, einen Selektionsvorteil gewinnen und den normalen Wachstumskontrollen entkommen und proliferieren.

Ein wichtiger Schritt für die Veränderung von der normalen Zelle zur Krebszelle ist die Zerstörung des homöostatischen Gleichgewichts. In normalen Zellen werden die DNA-Schädigungen durch ein komplexes Netzwerk von Reparaturmechanismen behoben. Schon im Stadium der Neoplasie ist die Homöostase in der Zelle zuungunsten von Differenzierung und Apoptose in Richtung Proliferation verschoben und der Tod von Zellen durch Apoptose möglicherweise blockiert (Franks & Teich, 1997). Tumoren können somit sowohl durch deregulierte Aktivierung als auch durch Inaktivierung von Genen verursacht werden, die an bestimmten zellulären Prozessen beteiligt sind.

Auf genetischer Ebene unterscheidet man zwei große Gruppen von Genen, deren Aktivierung und/oder Inaktivierung zur Entstehung von Tumoren führt: Die Gruppe der Onkogene und die Gruppe der Tumorsuppressorgene (Alberts & Sternglanz, 1990; Vogelstein & Kinzler, 2004). Die Gene, die durch Mutationen oder Fehlregulationen aktiv an der malignen Transformation beteiligt sind, bezeichnet man als Onkogene. Solche Gene wurden erstmals in Retroviren gefunden. Der Begriff Onkogen veranschaulicht eine dominante Wirkung auf die maligne Transformation.

Durch Aktivierung von Proto-Onkogenen infolge genetischer Veränderung (Punktmutation, chromosomale Translokation oder Gen-Amplifikation) werden diese zu Onkogenen, welche die Tumorentstehung und Progression fördern (Fearon, 1997). Aufgrund ihrer Lokalisation, Struktur und Funktion in der Zelle lassen Onkogene sich in mehrere Klassen einteilen: Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, GTP-bindende Proteine und Zellkernproteine (Alberts & Sternglanz, 1990 Vogelstein & Kinzler, 2004).

Die zweite Gruppe der Gene trägt durch Inaktivierung beider Allele zur malignen Transformation bei. Diese Gene werden als Tumorsuppressorgene bezeichnet, auch wenn Ihre physikalische Funktion nicht primär in der Unterdrückung des Tumorwachstums liegen muss. Beispielsweise gibt es ein spezielles Produkt dieser Gene, bei denen das Produkt eines mutierten Allels das Produkt des nicht mutierten Allels ausschaltet (dominant negative Mutation). Zu diesen Genen gehört das Rb-Gen. In der normalen Zelle besitzen die Tumorsuppressorgene verschiedene Funktionen, z.B. in der Kontrolle der Transkription (TP53, RB), DNA-Reparatur (ATM BRCA1, BRCA2), Signaltransduktion (NF-1, ATM) und in der Zelladhäsion (DCC). Tumorsuppressoren sind auch an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (TP53, P21, ADKN2, ATM, BRCA1) und können auch Apoptose induzieren (TP53) (Savitsky et al., 1995; Chapman und Verma, 1996; Monteiro et al., 1996; Shao et al., 1996; Scully et al., 1997; Sharan et al., 1997; Milner et al., 1997).

In Tumorzellen werden instabile chromosomale Läsionen, eine erhöhte spontane Mutationsrate und Änderungen im Methylierungsmuster der DNA beobachtet. Diese führen zu weiteren Veränderungen innerhalb des Kontrollmechanismus der Zelle. Im Verlauf der Tumorentstehung kommt es zu charakteristischen chromosomalen Veränderungen. Diese können ein Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Onkogenen sein. Die biologische Konsequenz all dieser Mechanismen sind Veränderungen der proliferativen Eigenschaften und des Differenzierungsverhaltens der Zellen. Die betroffenen Gene können sich je nach Tumortyp unterscheiden. Ihre funktionellen Eigenschaften führen jedoch zu einem veränderten Phänotyp bzw. zu einem Selektionsvorteil der Tumorzelle, die zur Proliferation führen (Tomlinson & Bodmer, 1999).

Für mehr als 65 % der Mamakarzinome wurde eine Amplifikation von chromosomalen Regionen berichtet (Courjal et al., 1997; Hermsen et al., 1998; Lichy et al., 1998). In diesen Regionen liegen tumorassoziierte Gene wie das c-erbB2. Dieses Gen codiert für einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor und ist in ca. 30 % der Mamakarzinome überexprimiert. Bei Tumoren, die eine Amplifikation des Gens zeigen, hat sich ein Antikörper (Herceptin) gegen das Protein von c-erbB2 als effektiv für die Krebstherapie erwiesen. Sie könnten die Diagnostik und die Therapie von Brustkrebs durch die Entdeckung solcher Gene verbessern (Shawver et al., 2002; Cho et al., 2003; Kallioniemie et al., 1992; Vogel et al., 2001).

Bei Genamplifikationen kommt es durch die höhere verfügbare Kopienzahl zu verstärkter Expression und damit zu einem Einfluss auf die maligne Transformation. Ein weiterer Mechanismus für die Aktivierung von Onkogenen sind Punktmutationen, die häufig durch mutagene Karzinogene ausgelöst werden (Bos, 1989).

Wie bereits erwähnt, kommt es bei Tumorsuppressorgenen durch Verlust oder Inaktivierung von bestimmten Genen zur Tumorentstehung. Allerdings müssen hier immer beide Allele dieses Gens inaktiv sein. Ursache für eine Geninaktivierung kann der Verlust von Teilen der Chromosomen oder von ganzen Chromosomen sein. Weiterhin kommt es durch Rekombinationen und Deletionen im entsprechenden Locus zur Inaktivierung von Genen. Auch Mutationen im Gen können zur Störung der RNA-Prozessierung und somit zur Inaktivierung dieser Gene führen (Lemoine, 1997). Auch Kontrollregionen der Gene wie die Promotorregionen können von Inaktivierungsmechanismen betroffen sein. Diese Inaktivierungsmechanismen können Mutationen und epigenetische Prozesse sein. Zu den epigenetischen Mechanismen gehören DNA-Hypermethylierungen und Histondeacetylierungen. Bei Säugetieren stellt die DNA-Methylierung die einzige natürlich vorkommende Modifikation der DNA dar und betrifft nur die von einer Guanin- gefolgte Cytosin-Basen.

Von Knudson wurde 1975 das „two-hit-modell“ der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erstellt. Dieses Modell besagt, dass bei einer genetischen Prädisposition ein Allel, durch eine Keimbahnmutation verursacht, bereits mutiert in allen Zellen des Organismus vorliegt. Für die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens ist nur noch eine somatische Mutation erforderlich. Bei der Entstehung eines sporadischen Karzinoms geschehen beide Mutationsereignisse somatisch.

Dieses Modell wurde später erweitert. Viele unterschiedliche Studien stellten dar, dass verschiedene Tumoren auf einem Allel eine Mutation zeigen, während sie auf dem anderen Allel eine Hypermethylierung zeigen (Knudson, 2000; Myohanen, 1998) (Abb.1.3 A). Außerdem ist bekannt, dass die Hypermethylierung in den meisten Fällen nicht im Promotor des mutierten Gens, sondern auf dem anderen Allel beobachtet wird und somit den zweiten Schritt im „two hit-modell“ darstellt (Esteller, 2001 and 2002). Somit können epigenetische Veränderungen einen wichtigen Anteil an der Entstehung von Tumoren haben. Im weitesten Sinn umfasst die Epigenetik alles, was mit der Genregulation und -expression zu tun hat. Im engeren Zusammenhang beschäftigt sich

die Epigenetik jedoch mit der Frage, welche Mechanismen den regulatorischen Zustand der Gene beziehungsweise die Expression der Gene aufrechterhalten oder unterdrücken und wie dieser Zustand von Zelle zu Zelle weitergegeben wird.

Bei der epigenetischen Regulation spielen vor allem der Grad der DNA-Hypermethylierung des Gens, besonders im Bereich der Promotorregion, und die damit verbundene Veränderung der Packungsdichte der chromosomalen DNA (Chromatinstruktur) eine wichtige Rolle. Die DNA-Hypermethylierung im Promotorbereich verschiedener Gene bewirkt eine Gen-Inaktivierung („gene silencing“).

Eine generalisierte Hypomethylierung des Genoms wird als Ursache der genetischen Instabilität bei Neoplasien beschrieben. Die DNA-Methylierung findet an der 5'-OH-Position von Cytosin statt. Sie wird durch mindestens vier unterschiedliche DNA-Methyltransferasen (DNMT 1, 2, 3a und 3b) gesteuert, wobei die Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf die DNA übertragen wird (Attwood et al, 2002). DNMT 1 ist vor allem für die Beibehaltung schon vorhandener Methylierungsmuster nach der Replikation verantwortlich, während DNMT 3a und 3b eine De-novo-Methylierungsfunktion zugeschrieben wird. Unbekannt ist noch die Funktion von DNMT 2 (Attwood et al, 2002).

Zusätzlich wird das methylierungsgabhängige „Imprinting“ noch durch Protein- und Methylcytosin bindende Domänen (wie MDB 1-4, MeCP2) beeinflusst. Diese sind bei der epigenetischen Modifizierung von Bedeutung, da sie durch Interaktion mit Histondeacetylasen die Chromatinstruktur verändern können (Robertson et al, 2002). Veränderte Methylierungsmuster treten sowohl im Frühstadium der Karzinogenese als auch in fortgeschrittenen Tumoren auf. Die Tumorzelle scheint durch die Methylierung spezifischer Gene einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen zu erwerben.

Im Bezug auf die Methylierung des Promotors gibt es zwei große Gruppen von Genen:

a.) Gene, welche unmethylierte CpG-Inseln in ihrer Promotorregion besitzen und ca. 50 % des Genoms ausmachen. Bei diesen Genen sind in einem transkriptional inaktiven Zustand alle CpG Inseln methyliert. b.) Gene mit einer armen CpG Promotor-Region. Bei diesen Genen ist nicht klar, wie viele der CpG methyliert sein müssen, um eine modulatorische Rolle bei der Transkription zu spielen (Jones et al., 2002), (Siehe Abb.1.3.B).

Bei der DNA-Hypermethylierung besteht im Gegensatz zu Genmutationen die Möglichkeit, die inaktivierten Gene zu reaktivieren. Nukleosidanaloga können die DNA-Methylierung aufheben. Dass die DNA-Methylierung mit dem Imprinting-Mechanismus korreliert, zeigt sich dadurch, dass das 5-Azacytidin (5-Aza-C), ein kovalenter Inhibitor der DNA-Methyltransferase, in der Lage ist, ein funktionales Imprint aufheben zu können (Riggs & Jones, 1983; Chandler & Jones, 1988.). 5-Aza-C ist ein Cytidinanalogon, das anstatt Kohlenstoff ein Stickstoffatom in Position 5 des Pyrimidinrings trägt. In der Zelle wird 5-Aza-C phosphoryliert und kann nach Reduktion anstelle von Cytidin in die DNA eingebaut werden. Dadurch wird sowohl die DNA-Synthese als auch die DNA-Methylierung behindert.

Es konnte gezeigt werden, dass die meisten Gene, die bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielen, in chromosomalen Regionen liegen, die einen heterozygoten Allelverlust (LOH) zeigen. Zusätzlich zum LOH zeigen diese Gene eine Mutation oder Hypermethylierung des Promotors im zweiten Allel des Gens, welches zur vollständigen Inaktivierung des Gens in den Tumoren führt. (Jones & Baylin, 2002). Eine Anzahl dieser Gene wird in Abb. 1.3.C. gezeigt.

handelt, der zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt. Es herrscht die Hypothese, dass die extensive Methylierung von CpG-Inseln aus einer bereits vorher existierenden Methylierung resultiert, welche im nachfolgenden eine de novo-Methylierung in den Tumorzellen fördert (Hung, 2003). Dies wiederum könnte zu einer fortschreitenden Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und zu einer klonalen Selektion solcher hypermethylierten Zellen führen (Jonas, 2002). Im Falle der Hypermethylierung von Endometriumkarzinom wurde gezeigt, dass diese auch mit Mikrosatelliteninstabilität korreliert (Ahuja et al., 1997).

Die Methylierung des p15-Gens beim Ovarialkarzinom korreliert mit der reduzierten Expression des Gens in diesen Karzinomen (Liu et al., 2005). Dies konnte auch für das DR4 („death receptor 4“) Gen in prämenopausalem Ovarialkarzinom gezeigt werden (Horak et al., 2005).

Außerdem konnte beim sporadischen Mamakarzinom bewiesen werden, dass epigenetische Veränderungen bei der Aufrechterhaltung des zellulären Mikromilieus des Tumors eine Rolle spielen (Hu et al., 2005).

Darüber hinaus ist bekannt, dass die Methylierung des Promotors bei Genen, die an der Entstehung von Mammakarzinom beteiligt sind, eine Rolle spielt. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass 10 % - 15 % aller sporadischen Mamakarzinome eine Hypermethylierung des BRCA1-Gens zeigen. Es wurde mit einer Microarrayanalyse auch gezeigt, dass der gleiche Typ an Mamakarzinom bei Patientinnen mit der familiären Form (mit Mutation im BRCA1-Gen) und bei Patientinnen, die eine Hypermethylierung des BRCA1-Gens zeigen, vorhanden ist (Esteller et al., 2001; Hadenfalk. et al., 2001).

Zusammenfassend kann der Methylierungsstatus der Gene in verschiedenen Tumoren als neuer prognostischer Marker und als möglicher Therapieansatz dienen. Erste Therapieansätze mit „Procainamid“ zeigten eine Reaktivierung des p16-Gens im Prostatakarzinom bei Mäusen (Lin et al., 2001).

Azacitidine (Vidaza; Pharmion), ein Inhibitor für die DNA-Methylierung, wurde von der FDA in der US geprüft. Dieses Mittel könnte eine Revolution bei der Expression von Genen darstellen, die an der Entstehung von malignem Phänotyp von Tumoren beteiligt sind (Issa & Kantarjian, 2005).

Bisher sind allerdings nur wenige Aspekte, die in der Tumorgenese der Brust eine Rolle, spielen, bekannt und gut charakterisiert worden.

1.3 Identifizierung von Kandidatengen durch „in silico“ Methode und Strategie zur Validierung von Kandidatengen

Ziel des „Konsortiums für gynäkologische Tumoren“ (GCC), bestehend aus zehn Zentren in Deutschland, darunter auch die Medizinische Genetik in München, war die Identifizierung und Validierung von neuen Genen, die an der Entstehung sporadischer Tumoren der Brust und des Ovar beteiligt sind. Im Konsortium vereinigten sich verschiedene Institutionen mit Erfahrungen in der gynäkologischen Onkologie, Pathologie und Molekulargenetik. Sie stellten ihre Ressourcen und Expertisen zur Verfügung, um in Zusammenarbeit mit einem Partner aus der Industrie, Firma metaGen in Berlin, ein großes „Set“ tumorassoziierter Gene zu analysieren.

Die Firma metaGen in Berlin hat einen integrierten Ansatz entwickelt, um Gene zu identifizieren, die in gynäkologischen Karzinomen differenziell exprimiert werden. Unter Verwendung hauseigener Software wurden vier Millionen ESTs und EST-Cluster, die in öffentlichen (dbEST, UNIGENE, TIGR, THC) und kommerziellen (Incyte LIFESEQ) Datenbanken verfügbar sind, analysiert.

Die „bioinformatische“ Methode, die von der Firma metaGen entwickelt wurde, bildete die Grundlage für die vorliegende Arbeit, die im ersten Schritt die Identifizierung von differenziell exprimierten Genen in gynäkologischen Tumoren zur Aufgabe hatte.

Dieses „in silico“-Verfahren benutzte die Analyse von EST („expressed sequence tag“) zur Identifizierung von differenziell exprimierten Genen (Schmitt et al., 1999). ESTs sind kurze, ansequenzierte cDNA-Fragmente mit einer Länge von 300 – 500 bp, die ein funktionelles Gen repräsentieren können oder auch in der Lage sind, Teile von Genen zu identifizieren (Schuler et al., 1996). Wie bereits erwähnt, waren zur Zeit der Analyse vier Millionen ESTs aus verschiedenen Datenbanken bekannt. In einem ersten Schritt wurden die redundanten ESTs entfernt, und die nicht redundanten ESTs wurden mit Hilfe eines speziellen Programms (AUTEX) verlängert. Die verlängerten ESTs wurden wiederum in ersten Schritten gegen eine Gesamtheit an ESTs abgeglichen. Die gefundenen Treffer wurden den Angaben ihrer Herkunftsbibliothek nach ihrer Gewebeart unterteilt. Nachdem die Gewebeart bestimmt war, wurden die ESTs in einer zusätzlichen Normal- und Tumordatenbank aufgeteilt. Das zu untersuchende Gen wurde

gegen beide Datenbanken geblastet. Der Quotient der relativen Häufigkeit aus den beiden EST-Pools stellt ein Maß für die differenzielle Expression dar. Mit dem Vergleich von „P values“ (eine statistische Zahl nach Fischer) mit der gewebespezifischen Nummer (ein Quotient aus homologem EST zu der Gesamtzahl der geblasteten ESTs) wird festgestellt, ob ein Gen im Tumor hoch- oder herunterreguliert ist. Die Signifikanz dieser differenziellen Expression wurde über den Fischer-Test berechnet. Diese Methode der Bestimmung der differenziellen Expression der Gene wird auch als „elektronischer Northern“ (e-Northern) bezeichnet.

Es wurden mehr als 600 Gene mit dieser Methode identifiziert, deren Expression in Brust-, Ovarial- und Endometriumkarzinom deutlich von der Expression im entsprechenden Normalgewebe abwich (Dahl et al., 1999). Ungefähr 50 % dieser Gene wurden bis dahin im Zusammenhang mit Brust- und Ovarialkarzinom nicht beschrieben. Mit Hilfe der „Radiation Hybrid Mapping“ wurde die chromosomale Lokalisation von 400 Genen bestimmt. Diese Gene wurden in eine Gruppe von 195 Genen aufgeteilt, deren chromosomale Region in Bereichen lag, die mit einem beträchtlichen Maß an DNA-Verlust und – Zunahme in gynäkologischen Karzinomen assoziiert sind. Außerdem wurden 40 Gene, die in Form von Genclustern auftraten und bis jetzt noch nicht mit den sporadischen gynäkologischen Karzinomen in Verbindung gebracht werden, identifiziert. Aus diesen 235 Genen hat das Konsortium unter Berücksichtigung der zellulären Lokalisation (sezerniert oder cytoplasmatisch) und der Funktion des Gens, soweit es aus der Literatur bekannt war, 40 Gene ausgewählt, die innerhalb dieses Konsortiums detailliert analysiert werden sollten. Diese Gene wurden zur Bearbeitung in den einzelnen Gruppen aufgeteilt.

Die differenzielle Expression dieser Gene sollte zuerst auf RNA-Ebene bestätigt werden. Hierzu wurden cDNA-Filter von Invitrogen, quantitative PCR und Affymetrix-Chips benutzt. Da neben der veränderten Genexpression der Verlust der Heterozygotie einen eindeutigen Hinweis auf das Vorhandensein von putativen Tumorsuppressor-Genen darstellt, wurde eine LOH-Analyse bei reduziert exprimierten Genen durchgeführt. Weiterhin sollten Mutation und Methylierungsanalysen eine Aufklärung über die Mechanismen geben, die zur Reduktion der Expression in den untersuchten gynäkologischen Tumoren führen. Potenzielle Onkogene sollten auf Amplifikation in gynäkologischen Tumoren getestet werden. Die Analyse auf Proteinebene sollte Aufschluss über die Tumorrelevanz und die Bedeutung der Gene als prognostische

Marker geben. 18 von den 40 Kandidatengenomen wurden im Rahmen der Diplomarbeit und Dissertation auf differenzielle Expression auf RNA-Ebene untersucht. Hierbei wurden vier dieser Gene, welche putative Tumorsuppressorgene waren, im Rahmen der Diplomarbeit auf sogenannten „Expressions-Arrays“ der Firma Clontech untersucht. Diese vier Gene wurden im Rahmen der Dissertation auf dem CPA-Filter nochmals analysiert, was ein größeres Probenset bietet.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde anhand dieser vier Gene eine Strategie entwickelt, um diese Gene auf LOH und Mutationsanalyse zu untersuchen. Im Rahmen der Dissertation wurde diese Strategie verfeinert; dabei wurden z.B. je Gen 20 LOH-positive Tumoren auf Mutationen in Brusttumoren untersucht. Weitere epigenetische und Protein-Analysen wurden anhand von einem Gen durchgeführt, das für ein extrazelluläres Matrixprotein codiert und vielversprechend war, um eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von sporadischen Brusttumoren zu spielen. Die prognostische Relevanz dieses Gens wurde anhand eines gut analysierten Brusttumorsets weitgehend untersucht.

Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen zur extrazellulären Matrix und ihre Bedeutung bei der Entstehung von Tumoren erläutert und zusammengefasst.

1.4 Die extrazelluläre Matrix und ihre Rolle bei der Tumorgnese

Unter der extrazellulären Matrix (Extrazellulärmatrix, Interzellulärsubstanz, EZM, ECM) versteht man die Anteile des Gewebes, die von den Zellen in den Interzellulärraum (Raum zwischen den Zellen) sezerniert werden und dort immobil vorliegen. Extrazelluläre Matrix kommt grundsätzlich in allen vier Grundgewebetypen Epithel, Muskel-, Nerven- und Binde- und Stützgewebe vor.

Noch vor wenigen Jahren schrieb man – vereinfacht gesehen - den Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix lediglich eine Funktion als Leim oder als gewebeinterner Wasserspeicher zu. Im Laufe der letzten Jahre hat sich dieses Bild jedoch gewandelt. Die ECM stellt nach heutiger Definition die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden, dar.

Bei genauerer Betrachtung wird klar, dass zwischen Zellen und ECM stets eine wechselseitige Beeinflussung herrscht. Die ECM ist daher nicht statisch, sondern ist auf molekularer Ebene als Fließgleichgewicht anzusehen. Die Komponenten der ECM werden von Zellen synthetisiert und sezerniert. Darüber hinaus wird durch die Bindung

an bestimmte Komponenten der ECM durch Zellrezeptoren die Expression von Genen in den Zellen reguliert. Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation sowie der Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe resultieren damit ebenso aus dieser Wechselwirkung.

Die ECM besteht zu großen Teilen aus verschiedenen Proteinen und Glykoproteinen bzw. bestimmten Polysacchariden.

Die vorherrschende Proteinfamilie ist die der Kollagene, die verschiedene Arten von Fasern bilden und in fast jedem Gewebe vorhanden sind. Elastische Fasern werden aus den Proteinen Fibrillin und Elastin gebildet. Zudem gibt es eine große Vielfalt an Adäsionsmatrixproteinen, die die Zellen mit der ECM verbinden.

Die zweite große Gruppe stellen die Kohlenhydrate dar, und zwar besonders Glykosaminoglykane, langkettige Polysaccharide ganz bestimmter Einzelbausteine. Die Glykosaminoglykane assoziieren sich mit Proteinen und bilden noch größere Makromoleküle, die Proteoglykane. Aus der Vielfalt und den Interaktionen von Proteinen, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen ergeben sich die Eigenschaften der ECM.

Eine hochspezifische Ausprägung der ECM ist die Basalmembran (BM). Die Basalmembran bildet das Substrat für die Anheftung von Epithel- und Mesenchymzellen. Die 50 - 100 nm dicke Basalmembran wirkt als selektiv-permeable Barriere und grenzt Gewebe voneinander ab. Ihre Komponenten sind wichtige Regulatoren biologischer Aktivitäten. Schon in der frühen Embryogenese wird der Phänotyp der Zelle beeinflusst und deren Gestalt, Migrations-, Proliferationsverhalten sowie Genexpression und Reparatur bzw. Apoptose kontrolliert (Aumailley & Krieg, 1996; Timpl, 1996; Aumailley & Gayraud, 1998; Colognato & Yurchenco, 2000; Tumova et al., 2000; Hayden, 2005; Kleinman & Martin, 2005). Am Aufbau der Basalmembran sind eine Vielzahl extrazellulärer Proteine beteiligt, die von epithelialen und endothelialen, in einigen Fällen auch mesenchymalen Zellen produziert werden. Man unterteilt die extrazellulären Proteine, wie oben erwähnt, in Kollagen und nicht kollagene Glycoproteine und Proteoglykane (Aumailley & Gayraud, 1998). Nach co- oder posttranslationaler Modifikation und der Sekretion dieser Proteine führen unterschiedliche Mechanismen zu Polymerisation dieser Proteine.

Eine neue Familie der extrazellulären Matrix-Proteine stellt die Familie der Fibuline mit mittlerweile 6 Mitgliedern dar. Es handelt sich hierbei um mikrofibrilläre Glykoproteine, die sich vor allem durch ihre calciumbindenden Eigenschaften auszeichnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fibulin-3 (EFEMP-1)-Gen untersucht. Die Strukturelemente dieses extrazellulären Matrix-Proteins bestehen aus einer linearen Anordnung von 5 - 7 EGF – ähnlichen Modulen, überwiegend mit Konsensussequenzen für Ca^{2+} -Bindung, die N-terminale enthält ein Signalpeptid und die C-terminale Domäne ist cysteinreich (Timpl et al., 2003; William et al., 2005).

Während über die Funktionen der anderen Mitglieder dieser Familie wie das Fibulin-1 und 2 vieles bekannt ist, ist die Funktion des Fibulin-3 (EFEMP-1)-Gens noch weitgehend unbekannt. Fibulin1 und 2 sind hauptsächlich in der Basalmembran und als mikrofibrillare Proteine lokalisiert (Siehe Abb1.4). Elektronenmikroskopische Analysen zeigen, dass Fibulin-3 (EFEMP-1) in seiner Beschaffenheit dem Fibulin1-C ähnelt. Northern-Blot-Analysen zeigen, dass EFEMP-1 in verschiedenen humanen Geweben unterschiedlich exprimiert wird. Außerdem war bekannt, dass EFEMP-1 in jungen Fibroblasten oder solchen die sich im Seneszenzstadium befinden hochreguliert ist (Giltay, 1999).

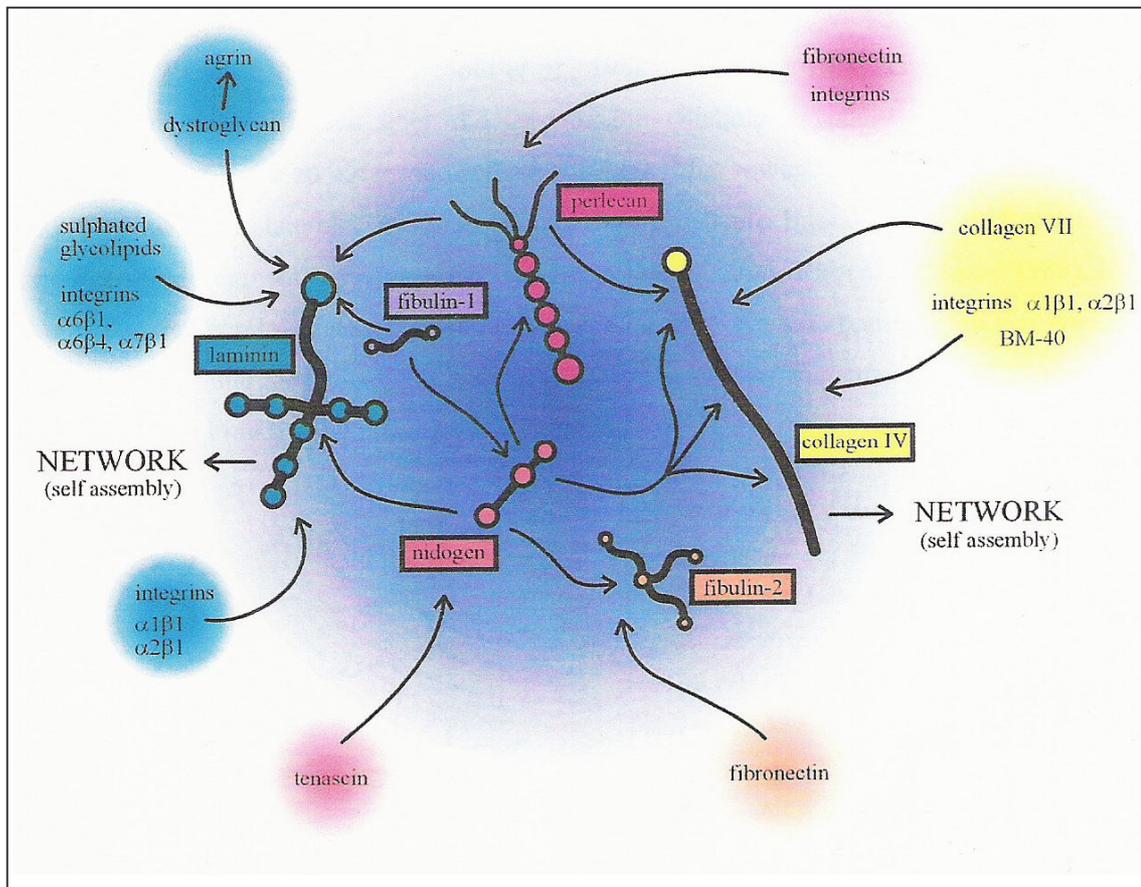


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der molekularen Architektur der Basalmembran. Die Lokalisation und die Wechselwirkung von Fibulin-1 und 2 mit anderen Molekülen sind bekannt. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, ist bei der Entstehung der molekularen Architektur die Integration von vielen anderen Molekülen zusätzlich entscheidend (nach Timpl & Brown, 1996).

Da ein wesentlicher Schritt bei der malignen Progression in der Tumorgenese der Durchbruch der Tumorzelle durch die Basalmembran und die Wanderung in das subepitheliale Bindegewebe ist, kommt der Basalmembran und der extrazellulären Matrix eine besondere Funktion in der Tumorentstehung zu.

Einer der Hauptmechanismen der Metastasierung, ist die enzymatische Zerstörung des umliegenden Bindegewebes. Um zu wachsen und sich in andere Bereiche des Körpers auszubreiten, bauen die Krebszellen die extrazelluläre Matrix (ECM) durch verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Plasmin ab, deren Aktivitäten mit einem aggressiven Tumorwachstum einhergehen. Diese zinkhaltigen Enzyme werden entweder in die ECM durch entsprechende Zellen sezerniert oder befinden sich an der Zellmembran, wobei das katalytische Zentrum des Enzyms in den extrazellulären Raum ragt. Die MMPs besitzen vielfältige biologische Bedeutungen. So ist zum Beispiel bekannt, dass Tumorgewebe, die MMP-2, MMP-9 und MMP-14 sezernieren, besonders

zur Metastasierung neigen, da die exprimierten MMPs den Abbau von Basalmembranen und den Aufbau tumoreigener Blutgefäße unterstützen.

Korrespondierend zu den MMPs existieren die so genannten „Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases“ (TIMP). Diese Proteine hemmen die Aktivität der MMPs durch spezifische Bindung an deren katalytische Zentren. Dadurch kann der Ab- und Umbau des Gewebes durch MMPs moduliert werden. Bislang sind 4 verschiedene TIMPs bekannt. Sie werden als lösliche Proteine in die ECM durch entsprechende Zellen sezerniert. Nur TIMP-3 bildet hier eine Ausnahme. Dieses Protein wird in der ECM vornehmlich an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden und dauerhaft in der ECM sequestriert.

Neben der Rolle in der Wundheilung haben die MMPs vor allem im Bereich der Onkologie ein sehr großes Interesse gefunden. So wurde in vielen Studien die positive Korrelation zwischen MMP-Überexpression und TIMP-Unterexpression und schlechter Prognose herausgestellt. Es wurde auch nachgewiesen, dass die MMP-Produktion vor allem im Bereich starker Invasion deutlich erhöht ist (Klenotic et al., 2004).

Es ist bekannt, dass TIMP-3 ein Bindungspartner von EFEMP-1 ist. TIMP-3 bindet mit dem C-terminalen Ende an EFEMP1 und mit dem N-terminalen Ende an MMP3. (Farina, 2002). TIMP3 fungiert in Mammakarzinom-Zelllinien als Tumorsuppressorgen und unterbindet die Metastasierung. TIMP3 zeigt in bestimmten Mammakarzinom-Zelllinien eine Methylierung im Promotor und ist somit inaktiv (Klenotic et al., 2004; Gagnon et al., 2003). MMP-1, -2 und -3 wurden unter anderem als Schlüsselfaktoren für die Invasion, Metastasierung und Angiogenese herausgestellt. Das MMP-System kann die Angiogenese durch den Abbau der ECM und zusätzlich durch die Freisetzung von gebundenen Angiogenesefaktoren oder durch den Abbau von Anti-Angiogenesefaktoren unterstützen. Die MMP können weiterhin in die Differenzierung eingreifen. Es konnte gezeigt werden, dass MMP-3 im Brustgewebe von transgenen Mäusen zu aggressivem Verhalten der Zellen führt. Diese Änderung kann aber durch eine gleichzeitige Expression von TIMP-1 verhindert werden (Sternlicht et al., 1999 und 2002)

Die verschiedenen Studien führen zu der These, dass MMPs nicht nur aufgrund ihrer ECM abbauenden Aktivität die Tumorentstehung begünstigen, sondern selbst tumorauslösende Wirkungen haben.

Letztendlich kann EFEMP-1 als Bindungspartner von TIMP-3 und MMP3 eine Rolle bei den zellulären Prozessen wie Zellwachstum und Wanderung spielen.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Validierung von Genen, die ursprünglich durch die „in silico“-Analyse als differenziell exprimiert in sporadischen gynäkologischen Tumoren identifiziert worden waren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden insgesamt 18 Gene, davon 12 putative Tumorsuppressorgene und 6 putative Onkogene zur Bestätigung ihrer differenziellen Expression in Tumor- und Normalgewebe der Mamma und des Ovars untersucht.

Von diesen 18 Genen waren 12 Gene (7 Tumorsuppressor- und 5 Onkogene) der Arbeitsgruppe in München (Abteilung Medizinische Genetik) zu weiteren Validierung vorab zugeteilt. 5 Gene (4 Tumorsuppressorgene und 1 Onkogen) aus der Arbeitsgruppe in Düsseldorf und ein Gen (Tumorsuppressorgen) aus der Arbeitsgruppe in Bonn waren hier die sogenannten „Gast-Gene“. Bei diesen 6 „Gast-Genen“ sollte die Expressionsanalyse in München durchgeführt werden.

Die differenzielle Expression sollte auf RNA-Ebene mittels verschiedener Techniken bestätigt werden. Hierzu sollte in einem ersten Schritt „Cancer Profiling Arrays“ (CPA-Filter) benutzt werden. Anschließend sollte mit zwei unabhängigen Methoden (quantitative PCR und Affymetrix Chips) diese differenzielle Expression bestätigt werden.

Weiterhin sollten die Ursachen der differenziellen Expression im Mammakarzinom näher untersucht werden. Mittels LOH und Mutationsanalysen lassen sich möglicherweise Verluste von größeren chromosomalen Regionen oder Sequenzveränderungen feststellen, die einen Funktionsverlust des Gens in der Tumorzelle erklären könnten. Eine weitere Ursache, die in der Tumorgenese weit verbreitet ist, sind die epigenetischen Veränderungen an regulatorischen Elementen, die ebenfalls zu einer reduzierten Expression des Gens im Tumor führen können. Hierfür mussten die regulatorischen Elemente dieser Gene erst einmal erforscht und dann eine Methode entwickelt werden, um die Veränderung zu erkennen. Weiterhin musste der Unterschied zwischen dem Methylierungsmuster von Normal- und Tumorpaaen untersucht werden.

Anschließend sollten bei 4 Genen, die im Mammakarzinom eine Reduktion der Expression zeigten und somit putative Tumorsuppressorgene waren, LOH- und Mutationsanalysen und Methylierungsanalysen mit genomischer DNA aus Tumorproben durchgeführt werden. Weitere Kriterien für die Auswahl dieser 4 Kandidatengene waren neben der differentiellen Expression die chromosomale Lokalisation und deren Funktion und Rolle in der Zelle und der Tumorgenese.

Im weiteren Verlauf wurde ein Gen unter Berücksichtigung seiner Funktion in der ECM und seiner differentiellen Expression im Mamakarzinom als möglicher prognostischer Marker gewählt und näher untersucht.

Eine zusätzliche Validierung dieses Gens sollte auf Proteinebene durchgeführt werden. Die prognostische Bedeutung dieses Gens auf Proteinebene kann mit Hilfe der Immunhistochemie an Grobschnitten und Tissuearrays (TMA) in einem großen Tumorkollektiv analysiert werden. Die Expressionsdaten hierzu sollten mit den klinischen und den pathologischen Daten in Verbindung gebracht werden.

Mit den durchgeführten Analysen in dieser Arbeit sollte ein erster Anhaltspunkt gegeben werden, um eine Auswahl treffen zu können, welche Gene in der Entstehung von Mamakarzinom möglicherweise eine Rolle spielen. Weiterhin sollte ein Einblick in die Funktion und Regulation eines Gens im Mamakarzinom gewonnen werden, welches möglicherweise als Indikator für die Tumordiagnostik dienen kann. Außerdem sollte die Bedeutung dieses Gens als prognostischer Marker untersucht werden. Weitere klinische Anwendungen, wie Überlebensrate der Patientinnen oder Therapie-ansatz, sollten damit verbessert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauch Reagenzien

Die bei der Arbeit verwendeten Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad „pro analysi“ und stammen entweder von der Apotheke der Ludwig-Maximilians-Universität München oder den unten genannten Firmen in Tabelle 2.1. Weitere Chemikalien und Materialien werden im Methodenteil angegeben.

Acetonitril	Baker
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	Sigma
Agarose (sea Kem)	Biozym
[α ³² P] - dCTP (370 Mbq/ml, 10mCi/ml)	Amersham
Amberleit	Pharmacia
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
APS	Merck
Bacto Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Bacto Trypton	Gibco BRL, Karlsruhe
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Chloroform	Baker
DEPC	Sigma
Dextransulfat	Pharmacia
DMSO	Sigma
Dichlordimethylsilan	Merck
DNA aus Testesgewebe des Lachses (SS)	Sigma
DNA-Polymerisationsmix (dNTPs)	Pharmacia
Eisessig	Merck

Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Pharmacia
Glycerin	Merck
Hefeextrakt	Gibco, BRL
Hybond™ N ⁺ -Nylonmembran	Amersham
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Fluka
IPTG	Sigma
Längenstandard V und XIV	Roche Diagnostics
Li Chrosolv Wasser	Merck
Orange G	Sigma
Phenol	Appligene Oncor
Sephadex G 25, G50	Pharmacia
Serdogel	Serva
Silan A174	Merck
TEMED	Sigma
Triethylammonium Acetat (TEAA)	Transgenomic
Titriplex (EDTA)	Merck
Tris	USB
Trizol-Reagenz	Gibco BRL
Urea	Gibco BRL
Xylencyanol	Merck
Xylol	Merck
x-Gal	Sigma

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien.

2.1.2 Enzyme

Taq-DNA-Polymerase	Amersham
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Roche
AmpliTaqGold™	Perkin Elmer
Protease XXIV	Sigma
Protease XIV	Sigma
Proteinkinase	Sigma
Expand High-Fidelity-Taq-Polymerase	Roche
Elastase	Sigma
Trypsin	Sigma
Restriktionsenzyme	Roche

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme.

2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.3.1 Nährmedien für Bakterienkultur

LB-Medium:	10g Bacto-Trypton , 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, ad 1l (H ₂ O _{ad})
LB-Agar:	1,5g Bacto-Agar auf 100 ml LB-Medium
TYM-Medium:	10g Bacto-Trypton, 2,5 g Bacto-Hefeextrakt, 2,94g NaCl ad 500ml (H ₂ O _{ad})

Tabelle 2.3: Verwendete Nährmedien für Bakterienkultur.

Nach dem Autoklavieren wird MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt.

Konzentration von Ampicillin in den Medien: 50 µg/ml

2.1.3.2 Nährmedien für Zellkultur

Seromed Biochrom	DEMEM oder DMEM/HAM'sF12- Medium Penicillin/Streptomycin/Gentamycin (100x) Trypsin-Lösung (2,5 %) FKS (10 %)
Gibco	RPMI-1640- Medium L-Glutamin, Na-Pyruvat, nonessentielle ⁶⁶ Aminosäuren

Tabelle 2.4: Verwendete Nährmedien für Zellkultur.

2.1.3.3 Allgemein benutzte Puffer und Lösungen

SE-Puffer (pH 8):	75 mM NaCl 4,39g 25 mM EDTA 12,5g ad 100 ml H ₂ O
TBE-Puffer 10X:	840 mM Tris-HCl, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0 (HCl)
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Erythrozyten-Lysepuffer:	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM Na ₂ EDTA (pH 7,4)
PCR-Puffer 10x:	500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 15 mM MgCl ₂ , 0,1 % (w/v) Gelatine
Probenauftragspuffer:	25 % (w/v) Ficoll 400, 0,25 % (w/v) Orange G, Bromphenolblau oder/und Xylencyanol
SSC-Lösung 20x:	0,3 M NaCl, 0,3 mM Na ₃ Citrat
Denaturierungspuffer:	0,5 M NaCl, 1,5M NaOH
PBS-Puffer:	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,3, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl
TAE-Puffer:	2M Tris-HCl, 57,1 ml Eisessig/l, 0,05 mM EDTA
TBS-Puffer:	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl

Tabelle 2.5: Allgemein verwendete Puffer und lösungen

2.1.3.4 Puffer und Lösungen für die Hybridisierung

Oligo-Labeling-Puffer (OLB-C):	Gemisch aus Lösung A, B und C im Verhältnis 1 : 2,5 : 1,5
Lösung O:	1,25 M Tris/HCl (pH 8,0), 125 mM MgCl ₂
Lösung A:	1 mM Lösung O, 0,18 µl β-Mercaptoethanol je 5 µl 0,1 M dATP, dGTP, dTTP
Lösung B:	2 M Hepes, pH 6,6 (mit 4 M NaOH einstellen)
Lösung C:	Zufallsprimer (5'-pd(N) ₆ -Oligonukleotide, Pharmacia) in TE-Puffer (pH 7,6) gelöst; Endkonzentration = 90 A ₂₆₀ U/ml
SSPE 20 x:	3,6 M NaCl, 0,2 M Na ₃ HPO ₄ , 20 mM EDTA, pH 7,4
Prähybridisierungs-Mix:	1,5 x SSPE, 1 % SDS, 0,5 % Magermilchpulver
Hybridisierungs-Mix:	1 x SSPE, 1 % SDS, 0,5 % Magermilchpulver 10 % Dextransulfat
TES-Puffer:	20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 0,25 % SDS, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
Waschlösung 1:	2,0 x SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung 2:	0,5 x SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung 3:	0,1 x SSC, 0,1 % SDS
Postblot-Waschpuffer:	0,2 M Tris, 2 x SSC, pH 7,5 (HCl)

Tabelle 2.6: Verwendete Puffer und Lösungen für die Hybridisierung.

2.1.3.5 Puffer und Lösungen für den Western-Blot

SDS-Sample-Puffer:	50 mM Tris, 100 mM DTT, 2 % SDS , 10 % Glycerol, 0,1 % Bromphenolblau
Coomassie-Blau:	0,2 % in 40 % MeOH und 10 % Eisessig
Destain:	100 % EtOH, 10 % Essigsäure
SDS-Running-Puffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1 % SDS, pH 8,3
Transferpuffer:	10 mM di-Natriumtetraborat-Decahydrat

Tabelle 2.7: Verwendete Puffer und Lösungen für den Western-Blot.

2.1.4 Kits

Advantage® cDNA PCR-Kit	Clontech
BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	Applied Biosystems
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Pharmacia
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen
Absolutely RNA™	Stratagene
CpGenome™ DNA Modification Kit	Intergen
SuperScript™ First-Strand Synthesis	Invitrogen
System for RT-PCR	Invitrogen
TOPO TA cloning®	Invitrogen

Tabelle 2.8: Verwendete Kits.

2.1.5 Klone

Die cDNA-Klone des I.M.A.G.E. Konsortiums wurden vom RZPD des Deutschen Humangenomprojektes am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, bereitgestellt.

2.1.6 Oligonukleotide (Primer)

Für die Polymerase-Kettenreaktion, Sequenzierung und Längen-Fragmentanalyse (LOH) wurden die Primer von der Firma Metabion GmbH synthetisiert. Die Sequenzen und die PCR-Bedingungen der verwendeten Primer werden im Anhang und im Text angegeben. Es wurden 40 nmol von jedem Primer geliefert (lyophilisiert), die entsprechend dem mitgelieferten Synthesereport in H₂O_{bd} gelöst wurden. Von den gelösten Primern wurde eine Gebrauchslösung (20 pmol/μl) hergestellt, die bei -20° C gelagert wird.

2.1.7 Expressions-Arrays

Es wurden für die Expressionsanalyse kommerziell erhältliche sogenannte CPA- Filter verwendet. Hierbei handelt es sich um auf Nylonmembran gespotete cDNA von Tumor- und Referenzgewebe verschiedener Gewebe-Typen.

Cancer Profiling Arrays (CPA-Filter) mit folgenden Geweben (adult) wurden von der Firma Clontech bezogen (50 ng cDNA pro Spur):

Brust, Uterus, Colon, Magen, Ovar, Lunge, Niere, Rectum, Schilddrüse, Prostata, Pankreas, kleine intestine Zellen, Cervix

2.1.8 Patienten-Material

Die Tumorproben und das entsprechende Normalgewebe von Patientinnen mit sporadischem Mammakarzinom wurden vom molekulargenetischen Labor der

Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der Pathologie der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden unter Beachtung entsprechender Sicherheitsvorschriften gemäß den Richtlinien des Gentechnikgesetzes durchgeführt. Reagenzien und Proben für die Vorbereitung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Molekularbiologische Standardmethoden, wie z.B. Präparation von Plasmid-DNA, Agarose-Gelelektrophorese, Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, DNA-Restriktionsenzymverdaus erfolgten nach Protokollen von Sambrook & Russell, 2001 oder gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.1.1 Präparation genomischer DNA aus Blut

5 - 10 ml EDTA-Blut werden mit 50 ml kaltem Erythrozyten-Lysepuffer versetzt, zur Zerstörung der kernlosen Erythrozyten ca. 15 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 1000 U/min, 7° C). Der Überstand enthält die lysierten zellkernfreien Erythrozyten und wird verworfen. Das Pellet, in welchem sich die kernhaltigen weißen Blutkörperchen befinden, wird nochmals in 30 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, 15 min auf Eis gestellt und zentrifugiert (1000 U/min, 7° C). Das Pellet wird in 5 ml SE-Puffer aufgenommen, mit 25 µl Pronase (10 mg/ml) und 250 µl SDS (20 %) versetzt und über Nacht bei 37° C oder 24 – 48 h bei Raumtemperatur (RT) auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Proteolyse erfolgt die Proteinfällung durch Zugabe von 2 ml 5 M NaCl und durch intensives Vortexen und Zentrifugieren bei Raumtemperatur (2500 U/min, 15 min). Der klare Überstand, welcher die DNA enthält, wird über eine sterile Gaze in ein 50- ml-Röhrchen gegossen. Die DNA-Fällung erfolgt durch Zugabe von 2 Vol. absolutem Ethanol (-20° C), unterbrochen von Zentrifugationen. Die so gefällte DNA wird mit 70%igem Ethanol gewaschen. Ist die

DNA getrocknet, wird sie in 300 - 1000 μl TE-Puffer unter ständigem Mischen gelöst. Die Bestimmung der DNA erfolgt photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm ($1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$).

2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Geweben (bei -80°C gelagert)

Das zu bearbeitende Gewebe wird direkt nach der Entnahme aus der -80°C Truhe mit einem Skalpell in grobe Stücke zerteilt. In einer Teflon-Kapsel mit Wolframkugel werden die Stücke in flüssigem Stickstoff abgekühlt und anschließend in einem Dismembrator bei 2000 U/min 1 min lang zermahlen. Das zerkleinerte Gewebe wird in 3 ml Verdauopuffer (0,1 mg Proteinase K/ml Verdauopuffer) aufgenommen und über Nacht (12-18 h) bei 50°C proteolytisch verdaut. Anschließend erfolgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Nach Zugabe des gleichen Volumens einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25 : 24 : 1) wird die Probe gemischt, für 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.OR, Heraeus) und der wässrige, DNA-haltige Überstand in ein frisches Röhrchen überführt. Die Extraktion mit dem gleichen Volumen einer Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Lösung (24: 1) führt zur vollständigen Entfernung des Phenols. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 2000 U/min) erfolgt die Fällung der DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 0,5 Volumen Ammoniumacetat und 2,5 Volumen absolutem Ethanol (-20°C gekühlt). Die DNA wird nach einer Inkubation von ca. 2 h bei -20°C durch Zentrifugation (5 min, 1300 U/min) getrennt. Nach dem Trocknen wird das Pellet in Aqua dest. gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch eine photometrische Messung bei 260 und 280 nm ($1 E_{260\text{nm}}$ entspricht $50 \mu\text{g/ml}$ DNA).

2.2.1.3 DNA-Isolierung aus in Paraffin eingebettetem Gewebe

Für die DNA-Isolierung aus in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden je 3-6 Schnitte mit einer Dicke von 5 - 10 μm verwendet. Die Entparaffinierung erfolgt durch die Zugabe von 1 ml Xylol und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Durch eine Zentrifugation bei 1300 U/min für 5 min wird das Gewebe pelletiert und das Xylol anschließend entfernt. Zur vollständigen Entfernung des Paraffins wurde die Xylolbehandlung wiederholt. Anschließend wird das Xylol durch die zweimalige Zugabe von jeweils 500 μl absolutem Ethanol und eine anschließende Zentrifugation

bei 1300 U/min für 5 min entfernt. Nach dem Trocknen des Pellets erfolgte die Zugabe von 50 bis 200 µl Verdaupuffer mit Proteinase K in PBS (300 µg Proteinase K/ml Verdaupuffer), danach die Über-Nacht-Inkubation bei 37° C. Die Proteinase K wurde durch eine Erhitzung der Probe auf 95° C für 5 min inaktiviert. Die nachfolgende Fällung der DNA erfolgte wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.4 RNA-Isolierung aus Zellen und mikrodisektiertem Material

Es wurden RNA aus Zelllinien und Patientengewebe gewonnen. Es wurden ATCC-Zelllinien (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA) verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers kultiviert. Das Zellwachstum erfolgte mit Penicillin/Streptomycin im 37° C- Brutschrank mit 5 % CO₂. Bei allen folgenden Schritten musste mit Handschuhen an RNA-Sterilbänken gearbeitet werden. Dies ist wichtig, um den Abbau der RNA durch Rnasen zu vermindern. Es wurden je ca. 40 ml gutbewachsene Flaschen mit adhärennten Zellen trypsiniert; das Zellpellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (1200 U/min, 10 min, RT), dann in 8 ml PBS aufgenommen und in 1ml-Portionen auf Eppendorfgefäße (2ml) verteilt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge, max. speed, 2 min) wurde das Pellet in 1 ml TRIZOL-Reagenz resuspendiert und 4 min stehengelassen, die Zellstrukturen wurden hierbei aufgebrochen. Nach Zugabe von 1 ml Chloroform, intensivem Mischen und Zentrifugation (Tischzentrifuge, max. speed, 15 min, 4° C) bildeten sich drei Phasen aus: in der unteren befindet sich hauptsächlich das Lösungsmittel, in der mittleren (der Interphase) lysiertes Proteinmaterial und in der oberen wässrigen Phase RNA mit geringen DNA-Anteilen. Die wässrige RNA-haltige obere Phase wird abpipettiert und in neue Eppendorfgefäße (2ml) überführt. Zum Ausfällen der RNA wurden 500µl Isopropanol dazugegeben, und nach 15 min Inkubation bei RT wurde mit der Tischzentrifuge bei max. speed, 15 min bei 4° C zentrifugiert.

Danach folgten ein Reinigungsschritt mit 70% Ethanol, ein weiterer Zentrifugationsschritt und abschließend das Trocknen der RNA im Eksikkator, die dann in 21 µl DEPC-H₂O aufgenommen wurde.

Die Qualitätskontrolle der extrahierten RNA erfolgte durch visuelle Analyse nach der RNA-Elektrophorese (bei der intakten RNA sind in dem Gesamtansatz 3 Banden zu sehen, 28S, 18S, 5S, RNA).

Die RNA wurde mit dem *cDNA-Synthese-Kit* von Amersham in cDNA umgeschrieben und somit stabilisiert.

Um RNA aus mikrodiseziertem Material zu gewinnen, wurde der „*Absolutely RNATM Nanoprep Kit*“ von STRATAGENE benutzt, womit aus $1 - 10^4$ Zellen RNA isoliert werden kann. Die RNA, die aus diesem Material gewonnen wird, konnte mit dem *SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit* von Invitrogen in cDNA umgeschrieben werden.

2.2.1.5 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR

Mittels PCR (Saiki et al., 1988) kann ein definiertes Stück DNA bis zu 10^6 mal vervielfältigt werden. Die Amplifikation der DNA erfolgt in drei Schritten:

1. Denaturierungs-Phase

2. Anlagerungs-Phase (Annealing):

Durch Addition der Anzahl von AT und GC Paaren und Multiplikation mit der spezifischen Gradzahl 2°C bzw. 4°C lässt sich die geeignete Annealing-Temperatur berechnen. Die Formel lautet:

$$(A + T)_n \times 2^\circ \text{C} + (G + C)_n \times 4^\circ \text{C} = \text{Annealing-Temperatur.}$$

3. Synthese-Phase:

Für die Durchführung einer standardisierten Doppelstrang-PCR werden pro 50 μl Gesamtansatz folgende Komponenten benötigt:

10 \times PCR-Puffer (15 mM MgCl_2)	5 μl
dNTP-Lösung	4 μl
Primer 5' (vorwärts) (20 pmol/ μl)	1 μl
Primer 3' (rückwärts) (20 pmol/ μl)	1 μl
Tag-DNA-Polymerase (1U)	0,5 μl
DNA (ca. 10 ng/ μl)	5 μl ad 50 μl H_2O

Tabelle 2.9: Verwendete Komponenten in der Standard PCR.

Die PCR-Reaktion wurde in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß durchgeführt. Das jeweilige PCR-Programm richtete sich nach den Primer-Bedingungen, der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, der gewünschten Produktmenge und der gewünschten Spezifität.

2.2.1.6 LOH-Analyse

Für die LOH-Analyse („loss of heterozygosity“) wurden Mikrosatelliten verwendet. Hierbei handelt es sich um kurze, repetitive Sequenzen, wie z.B. Dinucleotide (-TG-) oder Hexanucleotidrepeats (-AAAAAT-), die in der Population in unterschiedlichen Wiederholungseinheiten vorliegen. Mit bestimmten fluoreszenzmarkierten Primern (z.B. Fluorocromen Cy5 oder FITC) wurden die Mikrosatellitenpolymorphismen mittels einer Standard-PCR amplifiziert (PCR-Bedingungen siehe Anhang). Die Detektion der PCR-Produkte und die quantitative Bestimmung der jeweiligen Produktmenge erfolgten mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzierers und der Fragment Manger Software (Fa. Pharmacia). Die Qualität des PCR-Produktes wurde mittels eines Agarosegels bestimmt, und die entsprechende Menge wurde auf ein Polyacrylamid-Gel des ALF-Sequenzierers aufgetragen. In Proben, die heterozygot bezüglich des Mikrosatellitenpolymorphismus sind, entstehen in der PCR zwei Fragmente. Bei den heterozygoten Fällen wurde eine mögliche Signalreduktion durch den Vergleich von Tumor-DNA mit der Normalen-DNA ermittelt. Das Verhältnis der „Peak“-Flächen der beiden Allele wurde sowohl für das Normal- als auch für das Tumorgewebe [Ratio(normal) und Ratio(Tumor)] bestimmt. Das Allelverhältnis Q wurde aus dem Verhältnis von Ratio(Tumor) zu Ratio(normal) errechnet.

<i>Ratio(normal)</i>	= <i>Fläche (Allel 1) / Fläche (Allel 2)</i>
<i>Ratio(Tumor)</i>	= <i>Fläche (Allel 1) / Fläche (Allel 2)</i>
<i>Allelverhältnis Q</i>	<i>Ratio (Tumor)/ Ratio (Normal)</i>

Tabelle 2.10: Berechnung des Verhältnisses der „Peak“-Flächen der beiden Allele bei der LOH.

Bei einem Verlust des kurzen Allels ergibt sich ein Allelverhältnis > 1 . Zur besseren Vergleichbarkeit wird in diesen Fällen der Kehrwert berechnet.

Man erhielt Werte zwischen 0,0 und 1,0, wobei ein Wert von 1,0 einen hundertprozentigen und ein Wert von 0,6 einen vierzigprozentigen Allelverlust bedeutet (Niederacher D. et al., 1997). Da größtenteils das benutzte Tumormaterial nicht mikrodissiziert war und damit verschieden große Anteile an Normalgewebe enthalten waren, betrug die Signalreduktion auch bei Vorliegen eines LOHs in keinem Fall 100 Prozent.

2.2.1.6.1 Größentrennung von DNA-Fragmenten auf einem Sequenziergerät (A.L.F und A.L.F Express)

Automatische Sequenziergeräte ermöglichen die genaue elektrophoretische Auftrennung und eine quantifizierbare Detektion von fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten. Die Auftrennung wurde auf einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 6%igem Acrylamid und 7 M Harnstoff durchgeführt. Die beiden Glasplatten, davon eine Thermoplatte, über die das Gel temperiert wird, wurden mit Leitungswasser und Aqua dest. gereinigt und anschließend mit absolutem Ethanol entfettet. Zur Stabilisierung der Gelmatrix im Bereich der Gelauftragstaschen wurden die Glasplatten in diesem Bereich mit Bindsilane behandelt. Die Glasplatten wurden, durch 0,5 mm dicke Spacer getrennt, zusammengesetzt. Die Monomerlösung (29: 1 für Fragmentanalyse) des Polyacrylamides wurde mit Aqua dest. und Harnstoff versetzt und zusammen mit 5 g Amberlite 10 min gerührt. Durch Filtration wurde das Amberlite (Pharmacia Bio Tech) abgetrennt und die Gellösung zusammen mit dem TBE für 5 min entgast. Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung sofort zwischen die Glasplatten gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 2 h wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und an das Wasserbad angeschlossen.

Für die Fragmentanalyse wurden die PCR-Produkte mit Aqua dest. verdünnt (Verdünnung je nach DNA-Menge im Kontrollgel zwischen 1 : 5 und 1: 30), und 5µl der Verdünnung wurden mit 5µl ALF-Probenauftragspuffer versetzt. Für die Fragmentanalyse wurden die Proben vor dem Gelauftrag 5 min bei 95° C denaturiert und 3 min auf Eis abgekühlt. Die Gelbedingungen mit 0,6 × TBE als Laufpuffer lauteten wie folgt:

Max. Spannung:	1500 V
Max. Stromstärke:	34 mA
Max. Leistung:	38 W
Temperatur :	40° C
Laufzeit:	90-180 min

Tabelle 2.11: Die Gelbedingungen bei der LOH.

2.2.1.7 DHPLC (“denaturing high performance liquid chromatography“)

Mit dieser Methode wurden die Kandidatengene nach Mutationen untersucht. Die Methode basiert auf dem temperaturabhängigen Schmelzen der DNA-Fragmente auf einer Trennsäule. Abhängig von der Änderung der Sequenz, z.B. bei Mutationen kommt es zu einer Änderung der Schmelztemperatur.

Die Trennsäule besteht aus nicht porösen, alkylierten Polystyren-Divinylbenzidien-Partikeln und erlaubt die Detektion einzelner Nukleotidaustausche in DNA-Fragmenten von bis zu 500 bp Längen. Diese Methode wird mit dem so genannten Wave-Gerät (Firma Transgenomic) durchgeführt. Die DNA-Fragmente werden mit einem UV-Detektor erfasst, und das analoge Signal wird mit Hilfe eines Computersystems digital verarbeitet und in graphischer Form (Signal-, „Peaks“) wiedergegeben.

Bei dieser Methode werden die einzelnen Exons des zu untersuchenden Gens evaluiert. Dabei werden die Lauftemperatur und der Säulengradient bestimmt, um möglichst alle existierenden Varianten zu detektieren.

Material:	2 M Triethylammonium Acetat (TEAA) Puffer (Transgenomic) Acetonitril (Baker)
	Li Chrosolv Wasser für die Chromatographie (Merck)
Puffer A:	100 ml TEAA 500 µl Acetonitril ad 2 l Li Chrosolv Wasser
Puffer B:	100 ml TEAA 500 ml Acetonitril ad 2 l Li Chrosolv Wasser
Puffer C:	750 ml Acetonitril ad 1 l Li Chrosolv Wasser
Syringe (wash Solution):	80 ml Acetonitril ad 1 l Li Chrosolv Wasser

Tabelle 2.12: Verwendete Puffer in der DHPLC.

Die Ermittlung der Methoden zur Reinigung der Säulenmatrix sowie Gradient und Temperatur zur DHPLC-Analyse werden am Beispiel des Fibulin-3-Gens in der Tabellen 2.13 gezeigt.

Methoden	Temp [°C]	Gradient [%B]	Gradient [%C]	Zeit [min]	Flussrate [ml/min]
Sleep	50	50	/	5	0,05
Column Clean UP	56	5-100;100-100	/	30	0,5
Instrument Clean Up	60	/	100	60	0,9

Tabelle 2.13: Allgemeine DHPLC-Methoden zur Reinigung der Säulenmatrix (Column Clean Up und Instrument Clean Up) sowie für den Ruhezustand (Sleep).

Die DHPLC- Bedingungen zur Analyse der einzelnen Kandidatengene sind dem Anhang zu entnehmen.

2.2.1.8 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung erfolgte nach dem durch die Verwendung von Didesoxynukleotiden (ddNTP) hervorgerufenen Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al., 1992. In dem *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (BD) (Applied Biosystems) sind die vier Didesoxynukleotide jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die von einem Laser nach Abschluss der Elektrophorese erkannt werden.

Die automatisierten Sequenzanalysen wurden mit dem *ABI PRISMTM*-System 377 von Perkin Elmer durchgeführt.

Cycle-Sequenzierungs-Reaktion

Beim zyklischen Sequenzieren bedient man sich der PCR-Methode, um die zu sequenzierende DNA zu amplifizieren. Im Gegensatz zur Standard-PCR wird bei der „Cycle“-Sequenzierung nur ein Primer verwendet. Als Ergebnis dieser Reaktion erhält man unterschiedlich lange PCR-Fragmente. Sie besitzen ein übereinstimmendes 5'-Ende, welches durch den Primer festgelegt wird, und ein variables 3'-Ende, festgelegt durch den Einbau der ddNTPs.

Für die Cycle-Sequencing-Reaktion wurden je 50 - 100 ng des gereinigten PCR-Produkts eingesetzt.

Reaktionsansatz:

BD	2,0 µl
DNA	X µl
Primer (20 pmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{bd}	ad 10 µl auffüllen

Tabelle 2.14: Reaktionsansatz des Cycle-Sequenzierung.

Sequenzier-PCR- Programm:

96° C	30 sec
50° C	15 sec
60° C	4 min
⇒ 25 Zyklen	

Tabelle 2.15: Verwendete Sequenzier-PCR- Programm.

Das Produkt der Sequenz-PCR wird in 10 µl NaAc (3 M) und 90 µl H₂O_{bd} aufgenommen und zu 250 µl absolutem Ethanol gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 15 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (1400 U/min, 20 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 170 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (1400 U/min, 15 min) und 15 min in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die Probe kann bis zur Sequenzierung bei 4° C gelagert werden.

Sequenzierung:

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte auf einem Sequenziergel.

Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben in 3 µl Sequenzauftragspuffer gelöst, zwei Minuten bei 90° C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Von diesem Ansatz werden 1,5 µl auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit beträgt ca. 10 h bei 1680 V. Ein Laser detektiert die vier ddNTPs über ihre anhängende fluoreszierende Gruppe.

Sequenzauftragspuffer:	Formamid / 25 mM EDTA pH 8,0 / Dextra-Blau, Verhältnis 5 : 1
Sequenziergel:	30%ige Acrylamid-Lsg. (Acrylamid + Bisacrylamid 29 : 1) 10 × TBE 10%ige Ammoniumpersulfat-Lsg. (APS) TEMED, Harnstoff 7M

Tabelle 2.16: Verwendete Sequenzauftragspuffer und Sequenziergel.

Die Sequenzrohdaten werden mit dem Computerprogramm „*Sequencing Analysis ABI PRISM*“ von Perkin Elmer erfasst, analysiert und als Elektropherogramm ausgedruckt. Zur vergleichenden Analyse verschiedener Sequenzen stand das Programm „*Sequence Navigator*“ von Perkin Elmer zur Verfügung.

2.2.1.9 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) ist eine Variante der Standard-PCR, in der anstelle von genomischer DNA eine cDNA als Matrize eingesetzt wird.

Die RT-PCR-Reaktion wird wie die Standard-PCR-Reaktion angesetzt und durchgeführt (wobei die Annealingtemperatur den Primerbedingungen angepasst wird).

Standardansatz (Σ 25 μ l):

H ₂ O _{bd}	18 μ l
Puffer	2,5 μ l
dNTP	2,0 μ l
Primer	je 0,5 μ l
Ampli-Taq-Gold-Polymerase	2,5 μ l
cDNA	3,0 μ l

Tabelle 2.17: Verwendete Komponenten in der RT-PCR-Reaktion.

Sieht man nach der ersten Runde der RT-PCR noch kein spezifisches oder gar kein Produkt, wird eine zweite Runde durchgeführt. Die Primer der zweiten Runde werden im Vergleich zum Primerpaar der ersten Runde nicht überlappend nach innen versetzt („nested“). Als Matrize werden 0,5 - 2 μ l des Produktes aus der ersten PCR-Runde eingesetzt.

2.2.1.10 Vermehrung von Plasmiden und Isolierung von cDNA-Klonen

Die bei den Blast-Analysen von Genen verwendeten ESTs wurden als cDNA-Klone vom Ressourcenzentrum (RZPD) am Max-Planck-Institut in Berlin in Form von *E. coli*-Agar-Stichkulturen bestellt. Es wurden überwiegend IMAGE-cDNA-Klone (Hillier et al., 1996; Marra et al, 1998 and 1997) bestellt, die in Plasmid-Vektoren, z.B. in Blueskript sK(-) von Stratagene, kloniert sind (Hillier et al., 1996).

Um aus den *E. coli*-Agar-Stichkulturen einzelne Kolonien zu gewinnen, wurde aus diesen Stichkulturen ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatten (2 \times Ampicillin

(1ng/μl)) angelegt. Nach Inkubation bei 37° C im Brutschrank über Nacht wurden pro Verdünnungsausstrich je zwei einzelne Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Flüssigmedium (2 × Ampicillin(1ng/μl)) angeimpft. Diese wurden über Nacht unter ständigem Schütteln bei 200 U/min und 37° C inkubiert. Aus der Über-Nacht-Kultur wurden zur Langzeitlagerung 500 μl Bakteriensuspension entnommen, mit 500 μl Glycerin vermischt und bei -70° C eingefroren; aus dem Rest der Kurzzeitkultur wurde direkt die Plasmid-DNA isoliert.

2.2.1.11 Herstellung von „full-length“- Klonen

Zur Klonierung der cDNA der Kandidatengene in ihre gesamte Länge („full-length“) über Restriktionsschnittstellen des Vektors und des Inserts musste zuerst der richtige Vektor gewählt werden. Zu diesem Zweck wurde primär der *PEF6/V5-His B* der Firma *Invitrogen* benutzt. Die Klonierung eines Gens erfolgte in dem Expressions-Vektor pCEP-Pu/ ACF7 (Kohfeldt et al., 1997). Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Kostka und Frau Dr. Sasaki vom Max-Planck-Institut für Biochemie zur Verfügung gestellt.

In einem Gesamtvolumen von 60 μl wurden 10 μl PEF6/V5-His B mit 6 μl 10 x Puffer, 38 μl H₂O und je 3 μl Xba I (10 U/μl) je nach Klonierungsstelle kombiniert mit Kpn I (10 U/μl), BamH I (10 U/μl) oder EcoR I (10 U/μl) über Nacht bei 37° C die DNA im Heizblock gespalten. Die Spaltung des pCEP-Pu/ ACF7 Vektors erfolgte mit Nhe1- und Xho1-Enzymen. Die nun linearisierten Vektoren wurden über ein präparatives 0,07%-Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und mittels des *QIA quick Gel Extraction Kit* gereinigt.

Die amplifizierte Kandidaten-cDNA wurde durch Restriktionsverdau (48 μl PCR-Produkt in einem Gesamtvolumen von 60 μl) mit dem entsprechenden Enzym geschnitten, und der gereinigte Ansatz wurde mit dem Plasmid ligiert. Die Reinigung des Ansatzes erfolgte über eine Säule. (*QIAquick PCR Purification Kit* von der Firma Qiagen). Im Ligationsansatz wurden DNA-Insert-Fragmente zu Plasmidmolekülen in einem Verhältnis von 7 : 1 eingesetzt. Folgender Ligationsansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert:

PCR-Produkt (50 ng/μl)	7 μl
10 x Ligase-Puffer	1 μl
T4-DNA-Ligase	1 μl
Vektor (10 ng/μl)	1 μl

Tabelle 2.18: Verwendeter Ligationsansatz bei der Herstellung der „full-length“- Klone.

Die Ligation wurde über Nacht bei 15° C im Wasserbad durchgeführt.

Der Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente Bakterienzellen TOP10F' (Invitrogen) transformiert. Die eigentliche Transformation erfolgte mittels eines Hitzeschocks bei 42° C für 45 sec und einer Inkubationszeit von 2 min auf Eis. Die transformierten Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml erwärmten SOC – Mediums (Invitrogen) 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden sie in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (Maximum 30 sec). Die sedimentierten, transformierten Bakterienzellen wurden in 50 μl SOC - Medium resuspendiert und auf LB/AMP/IPTG/X-Gal-Agarplatten ausplattiert.

2.2.1.12 „Expressions-Arrays“

Bei einem Expressions-Array werden cDNAs aus verschiedenen Individuen und Geweben auf eine Trägermembran übertragen. Die in dieser Arbeit verwendeten „Expressions-Arrays“ wurden von der Firma Clontech geliefert. Die Filter enthalten 11 unterschiedliche Normalgewebe mit den entsprechenden Tumorgeweben des gleichen Gewebetyps (*Clontech Cancer Profiling Arrays*).

2.2.1.13 Hybridisierungen

An den Expressions-Arrays wurden radioaktiv markierte cDNA-Sonden hybridisiert. Unter Hybridisierung von Nucleinsäuren versteht man die Anlagerung einer markierten DNA- oder RNA-Probe an komplementäre DNA- oder RNA-Sequenzen, die bei der so genannten Blot-Hybridisierung auf einem Filter immobilisiert sind. Die radioaktive Markierung der in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Fragmente erfolgte durch zufällige Anlagerung von Hexa-Oligonukleotiden („random priming“) und

Einbau von [α^{32} -P]-dCTP. Zur Herstellung einer [α^{32} -P]-dCTP-markierten DNA-Sonde wurden 10 - 20 ng DNA eingesetzt.

Die DNA wurde mit H_2O_{bd} auf 32 μ l verdünnt, 10 min bei 95° C denaturiert und 10 min auf Eis abgekühlt. Auf Eis wurden 2 μ l BSA (10 mg/ml), 10 μ l OLB-C und 0,5 μ l Klenow-Polymerase (2 U/ μ l) hinzugegeben. Die Markierung wurde für 2 h bei RT oder 30 min bei 37° C unter Zugabe von 2,0 - 3,0 μ l [α^{32} -P]-dCTP durchgeführt.

Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l TES-Puffer gestoppt und das markierte DNA-Fragment über eine Sephadex-G50-Säule von freien Nukleotiden gereinigt (2000 U/min, 10 min).

Die Reaktion wurde hier mit 50 μ l TES-Puffer gestoppt, nach der Säulenreinigung wurden zum Eluat 50 μ l 20 \times SSC-Lösung und 80 μ l DNA aus Lachs-Sperma hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurde die synthetisierte doppelsträngige DNA-Sonde 10 min bei 95° C denaturiert.

Die in 2 \times SSC-Lösung geschwenkten Nylonmembranen (Cancer Profiling „Expression Arrays“) wurden in die Hybridisierungsröhren gerollt und nach Zugabe von 10 ml Prähybridisierungs-Mix für 2 h bei 65° C unter ständigem Rotieren prähybridisiert. Kurz vor dem Ersetzen des Prähybridisierungs-Mix durch 10 ml Hybridisierungs-Mix wurden dem Hybridisierungs-Mix 100 μ l bei 95° C für 10 min denaturierte Lachssperma-DNA (10 mg/ ml) zugesetzt. Dann wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde ebenfalls in die Hybridisierungsröhre pipettiert und über Nacht bei 65° C im Hybridisierungssofen hybridisiert.

Die Nylonmembran wurde kurz mit 2 \times SSC-Lösung gespült, ehe sie mit den drei Waschlösungen gewaschen wurde. Das sequenzielle Waschen der Membranen erfolgte in Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Sonde, wobei sich die Bedingungen von 2 \times SSC, 0,1 % SDS, 10 min, RT (niedrige Stringenz) bis 0,1 \times SSC, 0,1 SDS, 10-20 min, 65° C (hohe Stringenz) erstreckten. Die Autoradiographie erfolgte mit FujiRX-Film und CAWO SE6 Verstärkerfolien bei -70° C.

2.2.1.14 BST-Behandlungen von DNA

Die Bisulfitbehandlung von genomischer DNA ist eine selektive, chemische Umwandlung von Cytosinbasen, abhängig von ihrem Methylierungsstatus (Grunau et al., 2001). Unmethylierte Cytosine werden während der Bisulfitbehandlung desaminiert und in Uracil umgewandelt, wohingegen 5-Methyl-Cytosine nicht verändert werden

(Frommer et al., 1992). Bei anschließender PCR-Amplifikation werden Uracilbasen Grundlage einer AT-Basenpaarung, so daß an einer ursprünglichen GC-Paarung an unmethylierten Stellen ein Basenaustausch stattfindet. Diese Methode eignet sich um Methylierungen aufzudecken, die unter anderem eine tumorassoziierte Veränderung darstellen können.

Für die durch Bisulfit verursachte Desaminierung von Cytosin zu Uracil zur folgenden genomischen Sequenzierung sind nach der Entwicklung dieser Methode (Frommer et al., 1992) Modifizierungen dieser chemischen Umwandlung publiziert worden (Tasheva & Roufa, 1993; Reeben & Prydz, 1994; Feil et al., 1994; Raizis et al., 1995; Zeschnigk et al., 1997). Die meisten Veröffentlichungen betonen daher nachdrücklich die Durchführung einer verbesserten Denaturierung der DNA, während die Degradation der Ziel-DNA minimiert werden muss.

Für die Bisulfitbehandlung wurden 2 - 3 µg genomische DNA in einer Endkonzentration von 0,3 M NaOH für 15 min bei 37° C zur Denaturierung inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl 10 mM Hydrochinon und 520 µl 2 M Na₂S₂O₅ (pH5,1) wurde für 16 Stunden bei 50° C inkubiert. Die DNA wurde auf Säulen des *QIAamp DNA mini Kits* nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Nach dem Aufbringen der DNA des Reaktionsansatzes auf die Säule durch Zentrifugation folgten Waschschriffe mit dem Puffer AW-1 und AW-2, danach wurde die DNA getrocknet und mit auf 70° C erwärmtem ddH₂O eluiert. Im nachfolgenden alkalischen Schritt wurden die modifizierten Basen (Uracil-Sulfonate) mit 44 µl 3M NaOH (Endkonzentration 0,3 M) für 15 min bei 37° C zu Uracil desulfoniert. Die Reaktion wurde mit 90 µl 3 M NaOAc (pH 5,4) neutralisiert. Die DNA wurde mit 1 ml Ethanol absolut präzipitiert (Sambrook et al., 1989) und in 30 µl 1 mM Tris (pH 7,4) aufgenommen.

Für die Proben, bei denen nur 1 - 2 µg genomischer DNA zu Verfügung standen, wurde der „*CPG Genome DNA Modifikation Kit*“ der Firma Intergen benutzt.

Bisulfitbehandelte DNA war stark degradiert aber bei Lagerung zwischen -15° C und 25° C bis zu 2 Monate lang in einer Bisulfit-PCR amplifizierbar.

2.2.1.15 Bisulfit-PCR

6 µl der bisulfitbehandelten DNA (50 ng amplifizierbare DNA aus ursprünglich 500 ng (Grunau et al. 2001) wurden in die PCR eingesetzt. Die Bisulfit-PCR ist auf eine

Fragmentlänge von maximal ca. 430 bp begrenzt, weil die DNA durch die Bisulfitumwandlung stark beschädigt wurde und in kleinen Fragmenten vorliegt.

Die modifizierte, bisulfitbehandelte DNA wurde mit entsprechenden Primern amplifiziert. Bei der Primerauswahl musste beachtet werden, dass codierender und nicht-codierender Strang nach der Bisulfitumwandlung nicht mehr komplementär sind. Der Erfolg einer Bisulfit-PCR war stark abhängig von den Primern und musste für jeden Fragmentbereich eigens optimiert werden.

In der optimierten Erstrunden-PCR mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase wurden die Primer BSTx_AF und BSTx_AR (Sequenzen der Primer siehe Anhang) für den *sense*-Strang verwendet. Diese als „methylierungsunabhängig“ bezeichneten Primer liegen im Gegensatz zu methylierungsspezifischen Primern außerhalb der CpG-Dinukleotid-Sequenz und ermöglichen eine Amplifikation aller bisulfitbehandelten DNA-Stränge, unabhängig von ihrem Methylierungsstatus. Die Fragmente für die Erstrunden-PCR wurden größer ausgewählt (maximal 430 bp) als die Fragmente der zweiten Runde (maximal 264 bp), um so größere Bereiche des Promotors abzudecken.

Die Bisulfit-PCRs wurden mit einem modifizierten Protokoll der Ampli-Taq Gold (Roche/Applied Biosystems) mit erhöhter Primerzugabe (25 pmol) durchgeführt. Im Gesamtansatz wurden folgende Komponenten benutzt:

ABI Gold PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Primer F (100 pmol/µl)	2,5 µl
Primer R (100 pmol/µl)	2,5 µl
Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
50 ng BST-DNA oder	6 µl
1. Runde Bisulfit-PCR in 2. Runde	2 µl
ddH ₂ O ad 50 µl Gesamtreaktionsvolumen	34,6 µl

Tabelle 2.19: Verwendete Komponenten bei der Bisulfit-PCR.

PCR- Programm:

95° C	15 min
95° C	30 sec
55° C (1.Runde)	30 sec
oder 57° C (2. Runde)	30 sec
72° C	40 sec
⇒ 35 Zyklen	
72° C	7 min

Tabelle 2.20: Verwendetes PCR Programm bei Bisulfit-PCR.

Die amplifizierten Produkte der Standard-PCR werden mit Hilfe des *QIAquick Spin PCR purification Kit* der Firma Qiagen über Säulen gereinigt. Um eindeutige Sequenzergebnisse von bisulfitbehandelten DNA-Einzelsträngen zu erhalten, wurde das PCR-Produkt subkloniert.

2.2.1.16 Klonierung der BST- Fragmente

Die Klonierung der BST-Fragmente erfolgte mit dem *TOPO TA Cloning Kit* der Firma Invitrogen. Der TA- Klonierungskit beschleunigt und vereinfacht die Klonierungsarbeit. Das direkte Klonieren von PCR-Produkten beruht darauf, dass die zu klonierenden PCR-Produkte am jeweiligen 3'-Ende ein einzelnes Desoxyadenosin (dATP) tragen, das von der Polymerase eingefügt worden ist und das in der Lage ist, sich an das überhängende, einzelne 3'-Desoxythymidin (dTTP) des Vektors an der Insertionsstelle zu binden. In den im Kit beschriebenen Standard-Ligationsansatz werden 4 µl des gereinigten BST-PCR- Produktes eingesetzt. Ansonsten verläuft sowohl die Ligation als auch die Transformation wie in der Arbeitsanleitung angegeben. Die sedimentierten, transformierten Bakterienzellen werden in 250 µl SOC-Medium resuspendiert und davon 210 µl auf LB/AMP/IPTG/X-GAL-Agarplatten ausplattiert.

Die Platten werden bei 37° C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Agarplatten für 1 - 2 h in den Kühlschrank gelegt, da die Blaufärbung der Kolonien oft erst verzögert einsetzt. Durch Auszählen der blauen und weißen Kolonien

kann die Effizienz der Transformation ermittelt werden. Bei gut dephosphoryliertem Vektor liegen fast ausschließlich nur weiße Kolonien vor.

Die verwendeten Plasmide besitzen ein Resistenzgen für Ampicillin, d.h. nur Bakterienzellen mit Plasmid sind in der Lage, auf Agarplatten mit Ampicillin zu wachsen. Über den erfolgreichen Einbau eines Inserts in das Plasmid gibt die α -Komplementation Aufschluss. Die multiple Klonierstelle des Vektors liegt im LacZ-Gen, das für ein β -Galaktosidase codiert.

IPTG induziert die Expression dieses Enzyms, das in der Lage ist, die farblose Substanz X-Gal zu spalten. Durch die Spaltung des X-Gal entsteht ein blauer Indigofarbstoff, der in den blau gefärbten Kolonien zu sehen ist. Blaue Bakterienkolonien tragen zwar ein Plasmid, dieses aber ohne integriertes Insert. Ist ein DNA-Fragment in das LacZ-Gen eingebaut, wird keine β -Galaktosidase gebildet; folglich wird X-Gal nicht in den blauen Farbstoff umgesetzt. Die Bakterienkolonien, die ein Plasmid mit Insert tragen, sind weiß.

Aus den Kolonien werden über Nacht Stichkulturen angelegt. Eine Kolonie wird in 5 ml LB/Amp-Medium bei 37° C unter ständigem Schütteln inkubiert. Aus den Übernachts-Kulturen kann DNA direkt isoliert und in eine PCR- Reaktion eingesetzt werden.

2.2.2 Zellkulturmethoden

Sämtliche verwendeten Gefäße, Pasteur- und Zellkulturpipetten sowie Lösungen wurden vor der Verwendung sterilisiert, um Kontaminationen der Zellen zu vermeiden.

2.2.2.1 Zellkultivierung

Medien und Lösungen für die Zellkultur:

DMEM oder DMEM/HAM'sF12 für die SiHa und MCF7:	2 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) FKS, 1 mg/ml Gentamycin
DMEM für die EBNA 293-Zellen:	40 mM NaHCO ₃ , 2 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) FKS, 200 µg/µl Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium:	80 % Kulturmedium, 10 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) DMSO
Trypsin-Lösung:	1 % Trypsin gelöst in PBS (0,02 % EDTA)

Tabelle 2.21: Verwendete Medien und Lösungen für die Zellkultur.

Die Kultivierung der EBNA 293- Zellen (menschliche Nierenembryonalzellen), SiHa-Zellen (menschliche Endometriumkarzinomzellen) und MCF7- Zellen (menschliche Brustadenokarzinomzellen) erfolgte auf 10 cm- Petrischalen in DMEM-Medium mit Penicillin/Streptomycin oder Gentamycin bei 37° C in einer 5%-haltigen CO₂-Atmosphäre (CO₂ Inkubator 3028, Firma Scientific).

2.2.2.2. Passagierung von Zellen

Um konfluente Zellen zu verdünnen und einzelne, durch Selektion mit Puromycin heranwachsende Zellklone zu vereinzeln, wurden die adhärent wachsenden Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, mit einer 0,01%igen Trypsinlösung von der Schale abgelöst, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in entsprechender Verdünnung in DMEM-Medium in neue Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.

2.2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden hierfür durch Behandlung mit 0,01%igem Trypsin von der Plattenoberfläche gelöst, nach der Zentrifugation pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert.

Im Einfriermedium aufgenommene Zellen wurden bei -196° C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.4 Transiente und stabile Transfektion

Die Transfektion der 293-Zellen mit den Vektorkonstrukten wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Durch Kotransfektion mit dem Plasmid psV2pac wurde eine Selektion der Zellen auf Puromycin- Resistenz ermöglicht.

Präzipitationsansatz: DNA- Konstrukt (25 - 40 µg), Vektor pSV2 pac im Verhältnis 1 : 10 bis 1 : 20, 125 mM CaCl₂, H₂O ad 0,5 ml, 0,5 ml 2 x BBS, pH 6,93.

Die transiente Transfektion wurde durch die Zugabe von 0,5 ml Präzipitationsansatz zu 10⁶ Zellen auf einer 6 cm² Kulturschale durchgeführt. Die Zellen wurden nachdem sie konfluent gewachsen waren mit serumfreiem DMEM- Medium versetzt

2.2.2.5 Bekämpfung von Kontamination mit Pilzen oder Bakterien

Unter normalen Zellkulturbedingungen wurden die Zellen nach Zugabe von Penicillin /Streptomycin kultiviert.

Bei Kontaminationen der Zellen mit Hefepilzen wurde dem Kulturmedium zusätzlich Amphotericin (1 mg/ml), bei Kontaminationen mit Bakterien zusätzlich Gentamycin und Kanamycin (1mg/ml) zugesetzt.

2.2.2.6 Produktionen von konditioniertem Medium

Für die Westen-Blot-Analyse war zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse die Entfernung von Serumalbumin aus dem Kulturansatz erforderlich.

Um die Verunreinigungen des konditionierten Zellüberstandes mit Serumalbumin zu verringern, wurden konfluente Zellklone fünfmal mit PBS-Puffer gewaschen und mit 10 ml serumfreien Medium für 48 h weiter kultiviert. Nach der ersten Mediumabnahme wurde das serumfreie Medium alle 12 bis 24 h ausgetauscht. Das Medium wurde steril filtriert (Porengröße des Filters 0,45 µM, Schleicher & Schül) und bei 4° C gelagert.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE) und Western- Transfer

Für die Proteinanalyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde eine Standardmethode (Laemmli, 1970) mit einem Minigelsystem (Biorad) und ein 10 % Gel mit 4 % Sammelgel verwendet. Die Protein-Proben wurden im Protein-Probenpuffer für 5 min bei 95° C denaturiert. Zur Reduktion von Disulfidbrückenbindungen wurde dem Probenpuffer DTT in einer Endkonzentration von 0,02 M zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte für 2 h bei 200 V (Pharmacia). Als Standard diente ein Proteingemisch mit definierten Molekularmasseh (Broad Range-SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio Rad und Prestained SDS- PAGE Molecular Weight Standards, Bio Rad).

10 ml 10 % Acrylamidgel (Trenngel):	3,33 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-lösung, 4,06 ml H ₂ O, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH= 8,8, 100 µl 10 % APS, 10 µl TEMED
5 ml 4 % Acrylamidgel (Sammelgel):	0,67 ml 30 % Acrylamid/ Bisacrylamid-lösung, 3,03 ml H ₂ O, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH= 6,8, 50 µl 10 % APS, 5 µl TEMED

Tabelle 2.22: Verwendete Gele bei der SDS-Polyacrylamid- Elektrophorese.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Nassblotverfahrens in einer 40 mM Natriumtetraborat-Lösung (4° C, 1 mA/cm², 4 - 16 h) auf eine Immobilon-PVDF-Membran (Millipore, Bedford, USA) transferiert. Die Kontrolle der Transfereffizienz erfolgte durch die Anfärbung der Membran mit Ponceau-S-Färbung (Sigma) für 1 min bei Raumtemperatur.

2.2.3.2 Immunblotting

Der Nachweis bestimmter Proteine auf PVDF-Membran durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Western-Transfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen 1 h mit 2 % normalem Ziegen-serum in 0,1 % Tween 20 in TBS geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1: 500) in 0,1 % Tween 20 in TBS für 1h.

Anschließend wurde die Membran dreimal mit 0,1 % Tween 20 in TBS für je 10 min gewaschen.

Dann erfolgte die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper (HRP-Konjugierter anti-Kaninchen-IgG-spezifischer Ziegen-AK, Bio Rad) in einer Verdünnung von 1 : 10000 in 0,1 % Tween 20 in TBS für 1 h. Danach wurde die Membran dreimal mit 0,1 % Tween 20 in TBS für je 10 min gewaschen. Der Nachweis der spezifischen Antikörperbindung erfolgte über eine HRP-konjugierte ECL-Reaktion mittels Chemolumineszenz. Für die Anfärbung der spezifischen Protein-Detektion wurde der ECL-Kit (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.4 Histologie

2.2.4.1 Fixierung und Einbetten von Geweben und Zell-Clots

Entsprechendes Gewebe wurde präpariert und für 24 h in 4 % Formalin/ PBS fixiert und dann mehrmals mit PBS gewaschen. Zur Fixierung von Zellen wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen, mit dem gleichen Volumen Plasma und Thrombin versetzt und der Zell-Clot in 4 % Formalin oder Aceton für 24 h fixiert und dann mehrmals mit PBS gewaschen.

Für die Anfertigung von Paraffin-Präparaten wurden die fixierten Gewebe in einer sogenannten Zitadelle (Shandon Citadel 2000) automatisch entwässert und in Paraffin überführt (Programmschritt: 70 % EtOH > 4 h, 80 % EtOH 1 h, 90 % EtOH 1 h, 3 x 100 % EtOH je 1 h, 2 x Xylol je 1,5 h, 2 x Paraffin je 1 h).

Danach wurde das Gewebe oder der Zell-Clot in Edelstahlröhrchen mit Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert. Für Gefrierschnitte wurden die Gewebe in einem speziellen Einbettmedium (Shandon; Cryomatrix frozen Specimen Embedding Medium) mit Isopentan, das durch flüssigen Stickstoff abgekühlt war, eingefroren. Die Kryogewebeblöcke wurden bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Anfertigung histologischer Schnitte für die HE-Färbung

Paraffin-Gewebeschnitte wurden mit einem Mikrotom (Gerätetyp 1130, Leica, Wetzlar) angefertigt. Die 5 - 10 μm dicken Schnitte wurden auf Spuer Frost[®] Objektträgern (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und bei 37°C über Nacht getrocknet. Gefrierschnitte mit einer Dicke von ca. 5 μm wurden mit einem Jung CM 3000 Cryotom (Leica, Wetzlar) angefertigt, auf Super Frost[®] Objektträgern (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Hämatoxylin – Eosin-Färbung (HE)

Die Schnitte wurden in einer Shandon Linistatin GLX Färbemaschine nach folgendem Schema gefärbt: 6 x Xylol, absteigende Alkoholreihe (2 x 100 %, 1 x 90 %, 1 x 80 %, 1

x 70 % EtOH), 2 x H₂O, 1 x Hämalaun, 2 x H₂O, 3 x Eosin, 2 x H₂O, aufsteigende Alkoholreihe (1 x 70 %, 1 x 80 %, 1 x 90 %, 1 x 100 % EtOH), 2 x Xylol, jeder Inkubationsschritt entsprach ca 5 min. Die eigentlichen Färbelösungen setzten sich zusammen wie folgt: Hämalaun 3 : 1 mit H₂O verdünntem (Merck) und Eosin (0.1 % w/v) 1 g mit 1000 ml H₂O (Merck), welches nach Filterung mit ca. 30 µl Eisessig angesäuert wurde. Die Schnitte wurden in Roti-Histokit (Roth) eingebettet.

2.2.4.4 Immunofluoreszenz

Die Immunofluoreszenz wurde mit zwei polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen ein humanes EFEMP1-Peptid bzw. ein rekombinantes Maus-EFEMP1-Protein durchgeführt.

Es wurden jeweils verschiedene Peptid-Antikörper gegen das zu untersuchende Protein hergestellt. Die in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebe wurden vor der Herstellung der Schnitte für 30 min auf einer Kühlplatte auf -18° C vorgekühlt; anschließend wurden im Rotationsmicrotom Serienschnitte in der Einstellung 1 µm vorgenommen. Diese wurden in ein auf 40° C temperiertes Wasserbad übertragen, auf Objektträger aufgezogen und dann auf einem auf 50° C vorgeheizten Strecktisch für 30 Minuten zum Antrocknen ausgelegt. Zur besseren Haftung der Paraffinschnitte auf dem Objektträger wurden diese mit einer speziellen Klebstoffmischung (Pritt-Klebstoff und Poly-L-Lysine im Verhältnis 1: 2) überzogen.

Vor der Weiterverarbeitung wurden die zu färbenden Proben über Nacht bei 59° C in einem Brutschrank „angebacken“. Die Paraffinschnitte wurden in einer Entparaffinierungsreihe entparaffiniert, um eine möglichst standardisierte Bearbeitung zu gewährleisten. Hierzu wurden sie sequenziell wie unten beschrieben im angegebenen Protokoll inkubiert.

Xylen	6 min
100 % Ethanol	3 min
96 % Ethanol	3 min
90 % Ethanol	3 min
80 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min

Tabelle 2.23: Verwendete Entparaffinierungsreihe.

Bis zur Weiterbearbeitung wurden die entparaffinierten Objektträger in 1 x PBS aufbewahrt.

Da die Paraffinproben im Verlauf der Formalinfixierung eine sogenannte Maskierung der Epitope durchlaufen, wurden die Schnitte vor der Immunfärbung einer enzymatischen Vorbehandlung unterzogen.

Dieses Verfahren basiert darauf, dass ein proteolytisches Enzym die Epitope, die durch die Fixierung durch Proteinvernetzung verdeckt sind, durch einen enzymatischen Andauvorgang für die Detektion zugänglich macht. Hierfür werden die Objektträger 10 min in dem Protease-Typ XXIV-Lösung in PBS (100 -150 µg/ml) inkubiert. Zusätzlich werden die Objektträger für 45 min in Elastase (0,5 mg/ml) gegeben. Die Proben werden dann mit PBS gewaschen und sofort 30 min in 2 % BSA inkubiert. Danach werden die Präparate aus BSA herausgenommen und für ca. 10 min in PBS gegeben. Nach diesem Waschschrift wird der Primärantikörper (Verdünnung 1 : 100 oder 1 : 500 in BSA/PBS) für 1,5 bis 2 Stunden auf die Schnitte aufgetragen.

Nach dieser Inkubationszeit werden zwei Waschschrift mit 1 x PBS für 10 min, eingeführt. Dann gibt man den Sekundärantikörper (CY3-markierter Ig G1-Anti-Rabbit-Antikörper) für 1 Stunde auf die Präparate. Es folgen zwei letzte Waschschrift mit PBS jeweils für 10 Minuten; zuletzt werden die Präparate mit Xylenol eingedeckt und im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.4.5 Immun- Peroxidasefärbung

Die immunhistochemische Färbung wurde mit *LSAB-Kit* und *Chromogensubstrat-Kit* von der Firma DakoCytomation durchgeführt.

Die Paraffinschnitte wurden in einer Entparaffinierungsreihe entparaffiniert, um eine möglichst standardisierte Bearbeitung zu gewährleisten. Hierzu wurden sie wie unten beschrieben im angegebenen Protokoll inkubiert.

Xylol	2 x 10 min
100 % Isopropanol	2 x 5 min
96 % Ethanol	1 x 5min
70 % Ethanol	1 x 5min
d H ₂ O	aufbewahren

Tabelle 2.24: Verwendete Entparaffinierungsreihe bei der ICH.

Die Demaskierung der Epitope erfolgte mit einer enzymatischen Protease-Behandlung der Schnitte. Hierfür wurden die Schnitte für 20 min in einer Protease- Lösung (50 mg Protease XXIV in 15 ml 0.1 M Tris/HCl (pH 8,0) bei RT inkubiert.

Die Präparate wurden nach der Behandlung 3 mal für jeweils 5 min mit 0,1 M Tris-Puffer gewaschen. Die Inaktivierung endogener Peroxidasen (enthalten in Erythrozyten und Granulozyten) erfolgte mit einer Inkubation der Präparate in einer 20 % Wasserstoffperoxid-Lösung für 10 min bei RT. Nach der Peroxidase-Behandlung wurden die Präparate 3 mal mit Tris-Puffer für jeweils 5 min gespült, und dann mit dem Primärantikörper (1 : 100 mit *Chem MATTM Antibody Dilut* von DakoCytomation) für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit Tris-Puffer für 5 min wurde der Sekundärantikörper (*Link, Biotinylated Secondary Antibody*, von DakoCytomation) für 30 min aufgetragen. Dann wurde nochmals dreimal 5 min mit Tris gewaschen. Nachfolgend wurden die Präparate mit einem Polylinken HRP Brückenantikörper (Anti-Kaninchen, Anti-Maus, Anti-Ziege Immunglobulin von DakoCytomation) für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Spülen der Schnitte mit Tris-Puffer wurde die Substrat-Chromogen-Lösung (von *DakoCytomation*) aufgetragen und 10 min inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen wurden nun sichtbar, indem sich markierte Stellen im Präparat rotbraun darstellten. Die Präparate wurden zum Stoppen der Färbereaktion mit Aqua bidest gespült und mit Hämalaun (1: 1 mit Aqua bidest verdünnt) gegengefärbt. Nach nochmaligem Spülen mit Aqua bidest wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt.

2.2.4.6 Tissue Microarrays (TMAs)

Der Einsatz von TMAs erlaubt die Hochdurchsatz-Analyse eines Gens oder Proteins an einer großen Anzahl von Gewebeproben. Bei der Herstellung eines TMAs werden Gewebestanden aus Paraffin-Material in Array-Format in einen Empfänger-Block gebracht. Dieser Block wird anschließend mikrometerdünn geschnitten, und die Schnitte werden auf Objektträger gebracht. Die TMA-Schnitte können jetzt für immunhistochemische Färbungen verwendet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten TMAs wurden im Institut für Pathologie der Technischen Universität München in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Nöhrig angefertigt, gefärbt und analysiert.

Die immunhistochemische Färbung wurde gemäß dem unter 2.2.4.5 dargestellten Färbeprotokoll durchgeführt.

2.2.5 Affymetrix Microarrays

Mit Hilfe der sogenannten Microarrays kann von Probenmaterial der aktuelle Zustand der Expressionsstärke von Genen (Genexpressionsprofil) bestimmt werden.

Alle Microarray-Technologien basieren auf der Bestimmung der mRNA-Quantität in dem Probenmaterial. Durch eine Erhöhung der Kopienzahl einer bestimmten mRNA kann die Synthese des entsprechenden Genprodukts verstärkt werden, und die größere Menge dieses Genprodukts kann die gewünschte Funktion schneller und stärker ausüben. Indem man die Kopienzahl der mRNAs bestimmt und diese dann in Relation zu der mRNA eines konstant exprimierten Gens setzt oder indem man mRNA Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe vergleicht, kann man eine Veränderung der Genexpressionsstärke gegenüber dem Normalzustand feststellen.

Als Basis für die Herstellung der Affymetrix-Microarrays dient ein Quarz-Plättchen, auf dessen Oberfläche Silan kovalent gebunden wird. Die Qualität und Dichte dieser Silan-Matrix ist entscheidend für die Leistungsfähigkeit des Microarrays, da auf diesem Grundgerüst im folgenden die genspezifischen Oligonukleotide (Sonden) synthetisiert werden. Als Oligonukleotide bezeichnet man relativ kurze Ketten von Nukleotiden. Die Nukleotidketten mit einer Länge von 25 Basen (25-mer Oligonukleotid) werden durch ein Verfahren auf der Silan-Matrix hergestellt, das Elemente aus der Photolithographie und der kombinatorischen Chemie vereint. Die Photolithographie ist der Halbleiterindustrie entlehnt und erlaubt die gezielte schrittweise Synthese der

Oligonukleotide, Base für Base, an definierten Positionen auf dem Array (Fodor, 1993; Fodor, 1991; McGall, 1996).

Das wichtigste des Affymetrix-Microarraydesigns liegt in der Strategie der Perfect Match (PM)-/ Mismatch (MM)-Sondenauswahl. Jede PM-Sonde stimmt perfekt mit der komplementären Sequenz der Ziel-mRNA überein. Zu jeder dieser PM-Sonden wird eine Partner-Sonde hergestellt, die abgesehen von einem 1-Basen-Mismatch im zentralen Bereich der Sonde die identische Sequenz hat. Diese Sonde wird als die Mismatch Sonde bezeichnet. Die MM-Sonden ermöglichen die Quantifizierung von störenden Hintergrundsignalen, unspezifischen Hybridisierungen oder Kreuzhybridisierungen. Die Eliminierung dieser Störsignale erfolgt durch die Verrechnung der Signalintensitäten von PM- und MM-Sonde (Lockhart et al., 1996; Wodicka et al., 1997). Die Unterschiede in der Hybridisierungsintensität zwischen den PM-/MM-Sondenpaaren dienen als Indikator für die spezifische Bindung an die Zielsequenz.

Für jedes Transkript werden aus allen möglichen 25-mer Oligonukleotiden 11 bis 16 Oligonukleotide als (PM-)Sonden ausgewählt. Die Lage der 11 bis 16 verschiedenen Sonden ist dabei über die gesamte Länge des Transkripts verteilt, um unterschiedliche Regionen der mRNA als Zielsequenz und damit eine zuverlässige Detektion zu erreichen.

Die Microarrays, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind von der Firma Affymetrix erstellt. Der verwendete Array ist der HG U133 A Array.

Mit diesen Microarrays ließ sich die Expression von 14 500 verschiedenen humanen Genen untersuchen. Die eigentliche Microarray-Technik umfasste die Arbeitsschritte Probenvorbereitung (RNA-Gewinnung aus nativem Normal- und Tumor-Material), Hybridisierung der Proben mit den Microarrays, Waschen, Färben und Scannen der Arrays sowie abschließende Auswertung der generierten Expressionsdaten der Microarrays.

Eine Voraussetzung für korrekte Ergebnisse der Genexpressionsanalyse ist die Linearität aller experimentellen Schritte zur Aufarbeitung des Probenmaterials. Nur so lassen sich reproduzierbare Aussagen über den Expressionslevel der Gene machen und miteinander vergleichen. Ausgehend von den Zellkulturen bzw. den entnommenen Geweben musste für die Genexpressionsanalyse die gesamte, zelluläre RNA (totalRNA) isoliert werden. Anschließend wurde zu Amplifikationszwecken über die

Zwischenschritte der einzelsträngigen und der doppelsträngigen, komplementären DNA (ds-cDNA) eine In-Vitro-Transkription (IVT) durchgeführt. Um die RNA später auf dem Microarray detektieren zu können, wurden in der IVT-Reaktion Biotin-markierte Ribonukleotide eingesetzt. Die resultierende amplifizierte RNA (aRNA) wurde abschließend fragmentiert und als Hybridisierungsprobe für die Microarrays benutzt. Bei den Syntheseschritten zur ds-cDNA-Synthese handelt es sich um 1 : 1-Umschreibungen. Die IVT ist eine lineare Amplifikation. Ebenso besteht zwischen der Menge an fluoreszenzmarkierter Probe und der detektierten Signalintensität ein linearer Zusammenhang (Freeman et al., 2000).

Nach der Hybridisierung waren die Biotin-markierten und fragmentierten Proben (aRNA und Kontrollen) an die entsprechenden Sonden auf der Microarray-Oberfläche gebunden. Die Quantifizierung der hybridisierten Proben erfolgte durch eine Färbung, die auf dem Nachweis des Biotins in den Proben beruhte. Unter Ausnutzung der Konjugat-Bildung von Biotin mit Streptavidin konnten die Proben mit einem Streptavidin-gekoppelten Phycoerythrin (SAPE, 1 mg/ml; Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) markiert werden. Phycoerythrin gehört zu der Gruppe der Fluoreszenzfarbstoffe, deren Lichtemission durch die Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge induziert werden kann.

Nach dem Färben wurden die Microarrays mit dem „Agilent Gene Array Scanner G2500A“ (Agilent Technologies Deutschland GmbH) gescannt. Der konfokale Laserscanner verwendet einen Argon-Laser, um das bei der Färbung an die fragmentierte aRNA gebundene Phycoerythrin nachzuweisen. Der Laser regt den Fluoreszenzfarbstoff mit Licht einer definierten Wellenlänge (488 nm) an, und das resultierende, emittierte Licht der Wellenlänge 570 nm kann quantitativ detektiert werden.

Bei der Vergleichsanalyse wurden die Kontrolle (Normalgewebe) und die experimentelle Probe (Tumorgewebe) miteinander verglichen, um Unterschiede in der Genexpression zu detektieren und zu quantifizieren. Das Microarray des Normalgewebes wurde als Bezugsgröße für das Microarray des Tumorgewebes benutzt. Während der Analyse wurde der Signalunterschied zwischen PM- und MM-Sonde ($\text{Signal}_{\text{PM}} - \text{Signal}_{\text{MM}}$) jedes Sondenpaars des Normalgewebe-Arrays mit dem entsprechenden Sondenpaar des Experiment-Arrays verglichen. Es wurden zwei verschiedene Algorithmen verwendet, um die Signifikanz einer Genexpressionsveränderung bzw. die Stärke der Veränderung zu berechnen. Beide

Rechenalgorithmen wurden automatisch von der für die Analyse benutzten Software „Microarray Suite 5.0“ (Affymetrix) angewendet.

Bei der Detektion der Genexpressionsveränderung wurde anhand der Signalintensitätsstärke und –detektion auf der Basis der miteinander zu vergleichenden Signalintensitäten ein p -Wert errechnet. Der p -Wert ist ein Maß für die statistische Signifikanz, ein niedriger p -Wert ist ein verlässlicher Indikator für ein verlässliches Resultat mit nur kleiner Fehlerwahrscheinlichkeit. Dieser p -Wert stellt ein Maß für die statistische Signifikanz der Genexpressionsveränderung dar. Je nach Höhe des p -Werts wird von der Software für das entsprechende Transkript eine Einschätzung vorgenommen, ob in den Tumorproben im Vergleich mit den Normalproben eine gleichbleibende oder eine veränderte Expressionsstärke detektiert wurde. Die Einstufung in die verschiedenen Gruppen erfolgte anhand der Grenzwerte γ_1 (Affymetrix-Software) und γ_2 . Siehe Abb. 2.1. Neben der Gruppe der Transkripte mit unveränderter Expressionsstärke (No Change, NC) wurde in 4 weitere Gruppen unterteilt. Die Transkripte mit erhöhter Expression wurden entsprechend der Stärke der Veränderung in die Gruppen „Marginal Increase“ (MI) bzw. „Increase“ (I) und die Transkripte mit abnehmender Expression entsprechend in die Gruppen „Marginal Decrease“ (MD) bzw. „Decrease“ (D) eingeteilt.

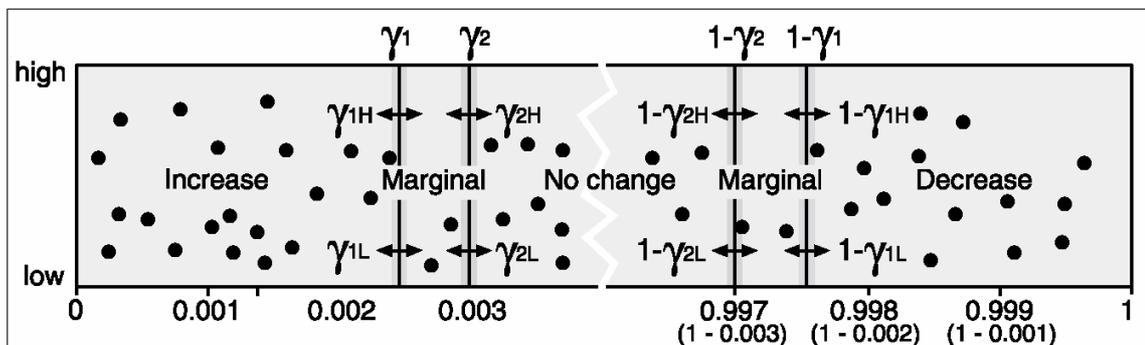


Abb. 2.1: Darstellung der Einstufungskriterien γ_1 und γ_2 für die Genexpressionsveränderung (aus:https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf)

Unabhängig von der Detektion der Genexpressionsveränderung wurde mit einem zweiten Rechenalgorithmus die Stärke der Veränderung quantifiziert. Die sogenannte „Signal Log Ratio“ wurde bei der Vergleichsanalyse mit der Software „Microarray Suite 5.0“ automatisch berechnet. Die Signal Log Ratio liefert ein Maß für die Stärke und Richtung der Genexpressionsveränderung eines Transkripts der zu vergleichenden Microarrays. Für die logarithmische Skalierung wurde die Basis 2 gewählt, d.h. eine Signal Log Ratio von 1,0 bedeutet einen Anstieg der Gentranskription um den Faktor 2,

wohingegen ein Wert von $-1,0$ eine Reduktion um den Faktor 2 bedeutet. Eine Signal Log Ratio von 0 steht entsprechend für eine unveränderte Genexpression. Die Berechnung erfolgt durch den Vergleich der Sondenpaare (PM- und MM-Sonde) von Normal- und Tumor-Array. Dabei werden die Signalintensitäten der Sondenpaare auf den zu vergleichenden Arrays miteinander verrechnet; aus den entsprechenden logarithmischen Verhältnissen wird ein Mittelwert berechnet und als Signal Log Ratio ausgegeben.

Die Ergebnisse der mit den Microarrays erhobenen Daten wurden zu Beginn mit den Affymetrix-Programmen „Microarray Suite 5.0“, „MicroDB 3.0“ und „Data Mining Tool 3.0“ ausgewertet. Aufgrund von limitierten Computer-System-Ressourcen konnten bei steigender Anzahl der parallel zu analysierenden Microarrays die Affymetrix-Programme „MicroDB“ und „Data Mining Tool“ nicht mehr genutzt werden. Die Analyse der gesamten Arrays wurde dann alternativ mit den Programmen „Microsoft Excel“ (Version 97) durchgeführt.

Dafür wurden die Daten nach Bestimmung der Signalintensitäten und Berechnungen der Signaldetektion, Genexpressionsveränderung und Stärke der Veränderungen mit der Microarray Suite 5.0 als Text-Datei (*.txt) abgespeichert und in eine Excel-Datenbank überführt. Mit Hilfe der Statistikfunktionen von Excel wurden für jedes der Gene die mittlere Signalintensität und die entsprechende Standardabweichung sowie die absoluten und relativen Angaben bezüglich der Genexpressionsveränderung (I, MI, NC, MD, D) ermittelt.

2.2.6 Datenbanken und Computerprogramme

2.2.6.1 Datenbanken im Internet

Mit Hilfe von Computerprogrammen ist es möglich, Gene vorherzusagen. Die Programme untersuchen die genomischen Sequenzen auf ihren GC-Gehalt, Spleißstellen, Leserahmen, konservierte Übergänge zwischen Exons und Introns und andere für das Gen charakteristische Merkmale. Die meisten Gene sind vermutlich durch ESTs in den Datenbanken repräsentiert. Homologien zu anderen, schon bekannten Genen, können mit Hilfe der Computerprogramme *BLAST* und *FASTA* festgestellt werden.

FASTA	im Rahmen des HUSAR-Pakets des DKFZ, Heidelberg http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de
BLAST	

Tabelle 2.25: Verwendete Computerprogrammen bei der Gen vorhersage.

Auf den im Sanger-Center sequenzierten PACs kann man Gene nach codierenden Bereichen absuchen lassen. Die folgenden Datenbanken bzw. Genvorhersageprogramme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Genscan	http://genomic.stanford.edu/GENSCAN/htm
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Repeat-Masker	http://www.ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/Repeat-Masker
OMIM	http://www.2.ncbi.nlm.nih.gov/omim
Sanger-Center	http://www.sanger.ac.uk
UCSC Genome Bio- informatics	http://genome.ucsc.edu/
Ensemble Human Map View	http://www.ensembl.org/Homo_sapiens

Tabelle 2.26: Allgemein verwendete Computerprogramme.

Um putative Gene vorherzusagen, wurde das folgende Programm benutzt:

UK HGMP Ressource Center	http://www.hgmp.mrc.ac.uk
--------------------------	---

Tabelle 2.27: Verwendete Computerprogramme bei der putativen Gen vorhersage.

2.2.6.2 Suche nach Promotoren

Um putative Promotorregionen unbekannter Gene zu analysieren und Primer für die BST-behandelte DNA zu designen, wurden folgende Programme benutzt:

Genomatix	http://www.genomatix.de/
WEBGENE	http://www.itb.cnr.it/webgene/
MethPrimer - Design Primers for Methylation	http://www.urogene.org/methprimer/
Epigenomic	http://www.epigenomics.com/de

Tabelle 2.28: Verwendete Computerprogramme bei der suche nach putative Promotorregionen.

2.2.7 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der TMA-Färbung erfolgte am Institut für medizinische Statistik an der Technischen Universität München. Hierfür wurde die Software SPSS Version 10.0 (SPSS Software GmbH, München) verwendet. Um die Korrelation zwischen der Expression des Kandidatengens und anderen prognostischen Faktoren bzw. klinischen Parametern zu bewerten, wurde der Fisher-Exakt-Test und der χ -Quadrat-Test benutzt. Für die Überlebensanalyse wurden die Daten mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet. Mit Hilfe des log-Rang-Testes konnten die errechneten Kaplan-Meier-Überlebenskurven miteinander verglichen werden. Zur Identifizierung von unabhängigen Prognose-Parametern wurde eine multivariante Überlebensanalyse anhand von Cox-Regressions-Modellen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl und Bestätigung der differentiellen Expression der Kandidatengene auf RNA-Ebene in sporadischen Mamma-, Ovarial- und Uteruskarzinomen

Die „*in silico*“-Expressionsanalyse in Normalgeweben und den korrespondierenden Tumorgeweben bildete die Grundlage für die Auswahl der Kandidatengene, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Zunächst musste die mögliche differentielle Expression einiger potentieller Tumorsuppressor-Gene und Onkogene auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden verwendet:

- a. Hybridisierung von Cancer Profiling Array (CPA)-Filter der Firma Clontech
- b. Hybridisierung von Affymetrix-Chips.

Die untersuchten Gene sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

3.1.1 Expressionsanalyse der Kandidaten-Gene mittels Cancer Profiling Array (CPA)

Auf einem CPA sind jeweils das Normalgewebe und das korrespondierende Tumorgewebe des/der gleichen Patienten/in aufgebracht. Diese Arrays beinhalten 106 cDNAs aus verschiedenen Tumorgeweben und die entsprechenden cDNAs der Referenzgewebe. Es handelt sich um 50 Mammakarzinome, 14 Ovarialkarzinome und 42 Uteruskarzinome. Details zu den klinischen Daten der jeweiligen Patientin sind unter der Internet-Adresse www.Clontech.com/techinfo/manual/pdf/pt34241.pdf zu erhalten. Mit 25 ng einer genspezifischen Sonde, welche mit 32-P markiert war, wurden diese Arrays hybridisiert. Die Filter wurden mit dem „Housekeeping“-Gen Ubiquitin, das überall gleich stark exprimiert sein sollte (10ng/Dot), hybridisiert und somit normalisiert (Siehe Abb 3.1 und 3.2).

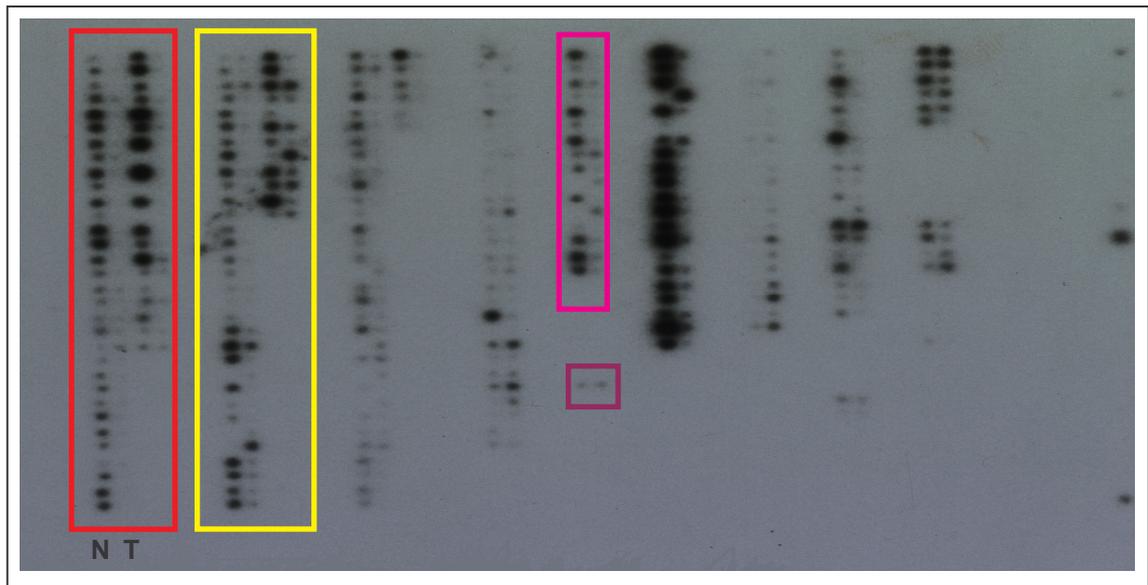


Abb. 3.1: Expressionsmuster des CAV1-Gens auf CPA-Filtern. Rot umrandet Mammanormal/karzinom, gelb umrandet Uterusnormal/karzinom, rosa umrandet Ovarialnormal/karzinom, violett umrandet Cervix-normal/karzinom. Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T) jeweils einer Patientin sind nebeneinander aufgetragen. Eine eindeutig differenzielle Expression ist in Brust-, Uterus- und Ovarialkarzinom im Vergleich zum Normalgewebe zu sehen.

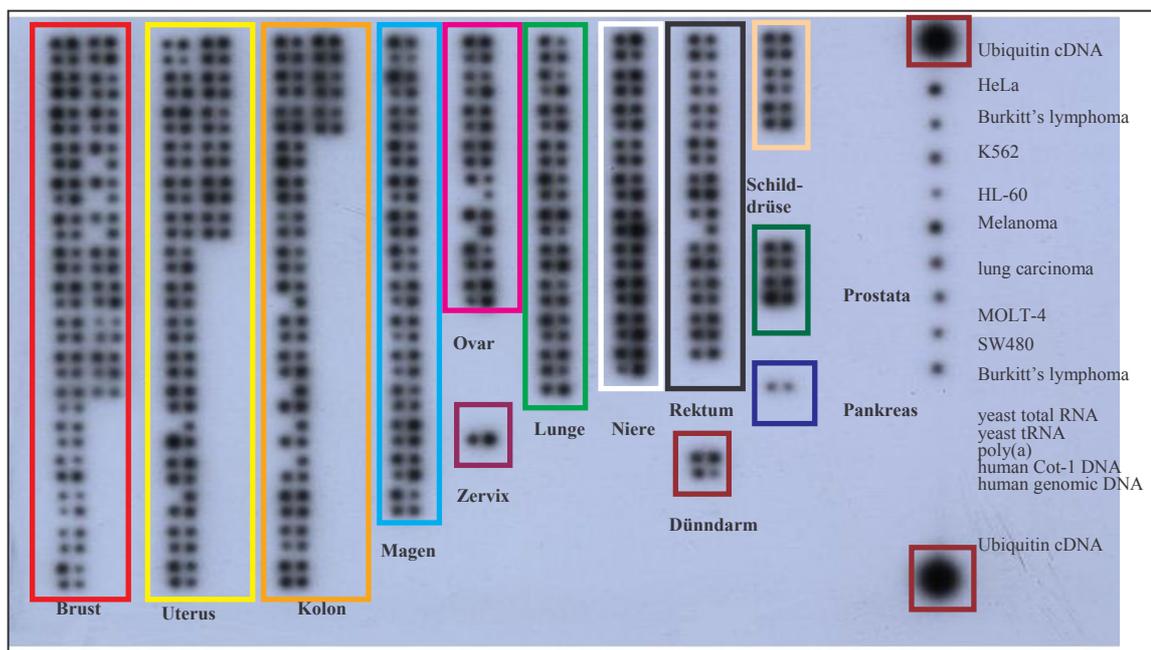


Abb. 3.2: Normalisierung des gleichen CPA-Filtern mit Ubiquitin. Es ist eindeutig, dass die gleiche Menge cDNA vom Normal- und Tumorgewebe der gleichen Patientin aufgetragen ist. Dunkelrot umrandet sind die Kontroll-Dots mit dem Housekeeping-Gen.

Eine differenzielle Expression wird durch den Vergleich der Hybridisierungssignale nachgewiesen. Die Intensität der Signale wurde mit Hilfe eines STORM-860 Phosphoimager (Molecular Dynamics, Eurogen, OR) gemessen. Die Auswertung der

Signale erfolgte unter der Berücksichtigung des Hintergrundsignals und der Normalisierung mittels eines „Housekeeping“-Gens. Die Messung erfolgte in Berlin bei der Firma Metagen. Als differenziert exprimiert wurden die Kandidatengene definiert, die in mindestens 20 % der untersuchten Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe ein Signal von zweifach höherer oder niedrigerer Intensität zeigten (Dahl. et al., 2005). Die einzelnen Daten zur Messung einzelner Gene sind dem Anhang zu entnehmen.

Im Rahmen des Gynecological Cancer Consortium (GCC) wurden 40 Kandidatengene mittels eNorthern zur Validierung und molekularen Charakterisierung ausgewählt. Von diesen Genen wurden 18 Gene der Arbeitsgruppe München zur Hybridisierung zugeteilt. Davon waren 12 putative Tumorsuppressorgene und 6 putative Onkogene. Von diesen 18 Genen wurden schließlich 12 Gene München, 5 Gene Düsseldorf und 1 Gen Bonn zur vollständigen Validierung zugeteilt. Vier der Münchener Tumorsuppressorgene wurden im Rahmen der Diplomarbeit getestet. Diese Gene waren DPT, EFEMP1, EPLIN, PLCG1. Die zwei Gene EPLIN und DPT wurden auf den *Matched Tumor/Normal Expression Arrays* der Firma Clontech getestet, welche insgesamt nur 69 cDNAs enthalten, davon 9 cDNAs Mammakarzinome und 3 cDNAs Ovarialkarzinome. Die Hybridisierung dieser zwei Gene wurde im Rahmen der Dissertation auf den CPA-Filtern wiederholt. Die Auswertung der Daten, die mit Hilfe des Phosphoimager regeneriert worden sind, erfolgte im Rahmen der Dissertation. Die Ergebnisse der Untersuchung mittels CPA zur differentiellen Expression der Gene im Mammakarzinom und Ovarialkarzinom sind in Tabelle 3.1 aufgeführt:

↓, Gen-Expression-herunterreguliert

Ts: putatives Tumorsuppressorgen

↑, Gen-Expression-hochreguliert

On: putatives Onkogen

K.di, keine differenzielle Expression

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Expression in Mamma- karzinom n = 50	Expression in Ovarial-karzinom n = 14
Dermatopontin (Ts)	DPT	↓ 57 % (29/50)	↓ 94 % (13/14)
Fibulin-3 (Ts)	EFEMP1	↓ 36 % (18/50)	↓ 50 % (7/14)
Eplin (Ts)	EPLIN	↓ 36 % (18/50)	↓ 50 % (7/14)
secretory leukocyte protease inhibitor precursor (On)	SLPI	↓ 62 %	↑ 64 %
Hypothetical protein DKFZP761F214 (Ts)	bis jetzt nicht vorhanden	Sehr schwache Expression Auswertung daher nicht möglich	↓ 64 %
CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast) (On)	CSE1L/CAS	↑ 22 %	↑ 62 %
WAP four-disulfide core domain 2 (On)	WFDC2	K.di	↑ 50 % (7/14)
Integrin-linked kinase (On)	ILK	K.di 14 % (7/50)	↑ 31 % (5/14)
likely orthologue of mouse gene rich cluster, C10 gene (Ts)	PTP1c/HCP	K.di (0/50)	K.di 14 % (2/14)
Phospholipase C-gamma 1 (Ts)	PLCG1	K.di (0/50)	K.di (0/50)
Human orthologue of mouse fsp-27 (Ts)	bis jetzt nicht vorhanden	K.di (0/50)	K.di (0/50)
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) (On)	MRP14	K.di 18 % (9/50)	K.di 14 % (2/14)
crystallin, alpha B (Ts)	CRYAB	↓ 72 % (36/50)	↓ 56 % (8/14)
Ras-associated protein RAB5c (Ts)	RAB5C	K.di (0/50)	↓ 50 % (7/14)
Capping protein, gelsolin-Like (On)	CAP G	↑ 31 % (15/50)	↑ 56 % (8/14)
insulin-like growth factor binding protein 4 (Ts)	IGFBP4	↓ 28 % (14/50)	↓ 56 % (8/14)
polymerase I and transcript release factor(Ts)	PTRF	K.di	K.di
Caveolin 1 (Ts)	CAV-1	↓ 94 % (47/50)	↓ 88 % (12/14)

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Untersuchung zur differentiellen Expression der Gene im Mammakarzinom und Ovarialkarzinom mittels CPA. Schwarz sind die Gene die der Münchner Gruppe zugeteilt worden. Rot die Gastgene aus Düsseldorf, und Blau das Gastgen aus Bonn.

Das Expressionsmuster von 13 der 18 Gene zeigte damit auf CPA-Ebene eine Übereinstimmung mit den e-Northern-Ergebnissen.

Bei den 6 so genannten Gastgenen (5 aus der Arbeitsgruppe in Düsseldorf und 1 aus Bonn), zeigt 5 Gene eine differenzielle Expression (Siehe Tabelle 3.1).

Von den 12 Genen, die unserer Gruppe zur vollständigen Validierung zugeteilt wurden, zeigten die 8 Gene DPT, EFEMP1, EPLIN, SLPI, Hypothetical protein DKFZP761F214, CSE1L/CAS, WFDC2, ILK eine differenzielle Expression.

3.1.2 Vergleichende Analyse der Genexpression mit Affymetrix-Microarrays an Tumor-Material der Brust und des Ovars

Die RNA für die Arrays der Firma Clontech wurde aus Gesamttumorgewebe gewonnen, und die Herkunft des Materials ist außerdem nicht klar zu verfolgen. Aus diesem Grund wurde eine Expressionsanalyse an nativen mikrodisezierten Proben und zum Vergleich mit makrodisezierten Proben an Affymetrix-Chips durchgeführt.

Die Microarrays, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind bei der Firma Affymetrix hergestellt worden. Mit diesen Arrays ließ sich das Genexpressionsprofil von 14. 500 humanen Genen untersuchen.

Die Auswertung der generierten Expressionsdaten für die Gene des GCC-Konsortiums erfolgte im Rahmen der vorliegenden Dissertation. Die Herstellung des Probenmaterials erfolgte am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Scherneck bei Frau Dr. S. Seitz. Die Ergebnisse der mit den Microarrays erhobenen Daten wurden zu Beginn mit den Affymetrix-Programmen „Microarray Suite 5.0“, „MicroDB 3.0“ und „Data Mining Tool 3.0“ ausgewertet. Aufgrund von limitierten Computer-System-Ressourcen konnten bei steigender Anzahl der parallel zu analysierenden Microarrays die Affymetrix-Programme „MicroDB“ und „Data Mining Tool“ nicht mehr genutzt werden. Die Analyse der gesamten Arrays wurde dann alternativ mit den Programmen „Microsoft Excel“ (Version 97) durchgeführt.

Dafür wurden die Daten nach Bestimmung der Signalintensitäten und Berechnung der Signaldetektion, Genexpressionsveränderung und Stärke der Veränderungen mit der Microarray Suite 5.0 als Text-Datei (*.txt) abgespeichert und in eine Excel-Datenbank überführt. Mit Hilfe der Statistikfunktionen von Excel wurden für jedes der Gene die mittlere Signalintensität und die entsprechende Standardabweichung sowie die

absoluten und relativen Angaben bezüglich der Genexpressionsveränderung (I, MI, NC, MD, D) ermittelt.

Es wurden 9 Gene (6 Gene aus der Arbeitsgruppe in München (DPT, EFEMP1, EPLIN, SLPI, CSE1L/CAS, WFDC2 (Schwarz)) und 3 Gastgene (CRYAB, CAPG (Rot), CAV-1) (Blau)) des GCC-Konsortiums, die auf diesem Filter vorhanden waren, im Rahmen der Dissertation anhand der Excel-Tabelle analysiert.

Es wurden die Arrays zweimal mit zwei Ansätzen hybridisiert.

Beim ersten Mal wurden 7 Mammakarzinomgewebe (6 duktales Mammakarzinome, 1 lobuläres Mammakarzinom mit einem Tumoranteil zwischen 50 % und 100 %) verwendet. Ein Metastasen-Pool aus 5 Hirnmetastasen bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom wurde hinzugefügt.

Um die differenzielle Genproduktenmenge in den Tumoren und den jeweiligen Metastasen feststellen zu können, wurde diese gegen einen Normalpool von 4 Normalgeweben bei den Tumoren und beim Metastasen-Pool abgeglichen.

Die Ergebnisse für den ersten Datensatz waren folgende:

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Nukleotid „accession number“ im NCBI	Tumor und Zelllinien	%MI/I/NC/ MD/D	Log-Ratio
Dermatopontin (Ts)	DPT	NM_001937	7 Mammakarzinom- Tumore (6 duktales, 1 lobuläres)	D: 57 % I: 0 % NC: 38 % MD: 5 %	[-3,7, -1] [-0,3, 0,7] [-0,6]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn- metastasen	D: 100 %	[-5,9, -3,7]
Fibulin-3 (Ts)	EFEMP1	NM_004105	7 Mammakarzinom- Tumore (6 duktales, 1 lobuläres)	D: 50 % NC: 50 %	[-3,5, -0,8] [-0,3, 0,2]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn- metastasen	D: 100 %	[-2,4, -2]

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Nukleotid „accession number“ im NCBI	Tumor und Zelllinien	%MI/I/NC/ MD/D	Log-Ratio
Eplin (Ts)	EPLIN	NM_016357	7 Mammakarzinom- Tumore (6 duktale, 1 lobuläres)	D: 14,3 % I: 14,3 % NC: 71 %	[-1,7] [0,3] [-0,3, 0,1]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn- metastasen	D: 100 %	[-1, 2]
secretory leukocyte protease inhibitor precursor (On)	SLPI	NM_003064	7 Mammakarzinom- Tumore (6 duktale, 1 lobuläres)	D: 71 % I: 14,2 % NC: 14,2%	[-3,5, -1,5] [2] [0,3]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn- metastasen	NC: 100 %	[0,1]
CSE1 chromosome segregation 1- like (yeast) (On)	CSE1L/ CAS	NM_001316	7 Mammakarzinom- Tumore (6 duktale, 1 lobuläres)	I: 65 % NC: 30 %	[0,5, 1,8] [0,3, 0,7]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn- metastasen	I: 100 %	[0,8, 1,4]
WAP four- disulfide core domain 2 (On)	WFDC2	NM_006103	7 Mammakarzinom- Tumore (6 duktale, 1 lobuläres)	D: 43 % I: 29 % NC: 29 %	[-1,3, -1] [1, 5,2] [-0,7, 0,6]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn- metastasen	I: 100 %	[1,9]
crystallin, alpha B (Ts)	CRYAB	NM_001885	7 Mammakarzinom- Tumore (6 duktale, 1 lobuläres)	D: 86 % NC: 14 %	[-5,7, -1,1] [0,8]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn- metastasen	NC: 100 %	[0]

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Nukleotid „accession number“ im NCBI	Tumor und Zelllinien	%MI/I/NC/MD/D	Log-Ratio
Capping protein, gelsolin-Like (On)	CAP G	NM_001747	7 Mammakarzinom-Tumore (6 duktale, 1 lobuläres)	I: 86 % NC: 14 %	[0,5, 2] [0]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn-metatstasen	NC: 100 %	[-0,2]
Caveolin 1 (Ts)	CAV-1	NM_001753	7 Mammakarzinom-Tumore (6 duktale, 1 lobuläres)	D: 100 %	[-3,5, -1]
			Metastasen-Pool aus 5 Hirn-metatstasen	D: 100 %	[-3,1, -3]

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Auswertung des ersten Datensatzes der Affymetrix-Chips. Schwarz sind die Gene die der Münchner Gruppe zugeteilt worden. Rot die Gastgene aus Düsseldorf, und Blau das Gastgen aus Bonn.

Ts: putatives Tumorsuppressorgen, on: putatives Onkogen, MI: Marginal Increase: leicht erhöhte Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript, I: Increase: Stark erhöhte Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript, NC: No Change: Keine Veränderung in der Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript, MD: Marginal Decrease: leicht erniedrigte Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript, D: Decrease: Stark erniedrigte Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript

In den 7 Mammakarzinomen, welche gegen einen Pool von 4 Mammanormalgeweben abgeglichen wurden, zeigten die Gene DPT, EFEMP1, SLPI, WFDC2, CRYAB und CAV-1 eine reduzierte Expression (Decrease). Die Gene CSE1L und CAP G zeigten hingegen eine erhöhte Expression (Increase) im Tumor-Transkript im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript.

Im Metastasenpool, welcher aus 5 Hirnmetastasen bestand und gegen einen Pool aus 4 Mamma-Normalgeweben abgeglichen wurde und hier im ersten Datensatz nur als Anhaltspunkt dient für weitere Analysen, zeigten die Gene DPT, EFEMP1, EPLIN und CAV-1 eine Reduktion der Expression. Die Gene CSE1L und WFDC2 zeigten ein eindeutiges Increase. Die Gene SLP1, CRYAB und CAP G zeigten keine Veränderung der Signalintensität im Metastase-Pool. Weitere Einzelheiten der Genexpressions-Veränderungen für jedes einzelne Gen ist der Tabelle mit dem Datensatz 1 (siehe oben) zu entnehmen.

Für einen zweiten Ansatz wurde ein größeres Probenet ausgewählt: Es handelt sich um 3 mikrodisezierte Mammakarzinome (2 duktale und 1 lobuläres) mit einem

Tumoranteil von über 90 %, welche gegen einen Normalpool von 5 Mammanormalgeweben abgeglichen wurden. Insgesamt waren es 14 makrodissezierte Mammakarzinome, davon 10 duktale und 2 lobuläre Mammakarzinome mit einem Tumoranteil zwischen 50 % und 100 %; (bei zwei Tumoren stehen keine Histologie-Daten zur Verfügung). Die makrodissezierten Mammakarzinome wurden gegen einen Normalpool von 4 Mammanormalgeweben abgeglichen. Die gebildeten Metastasen der primären Tumoren wurden in 2 Pools bzw. Gruppen von 2 Kleinhirn- und 2 Knochenmetastasen (Metastasen-Pool-A) und 5 Hirnmetastasen, abstammend von 4 getrennten invasiven duktalem Karzinomen (Metastasen-Pool-B), zusammengefasst. Diese wurden gegen einen Pool aus 4 Mammanormalgeweben abgeglichen.

Außerdem wurde im zweiten Ansatz ein Proben-Set von 3 serösen/papillären Ovarialkarzinomen verwendet. Diese wurde gegen einen Normalpool von Gewebe aus zwei Peritoneum abgeglichen.

Die Ergebnisse für den zweiten Datensatz waren folgende:

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Nukleotid „accession number“ im NCBI	Tumor und Zelllinien	%MI/I/NC/MD/D	Log-Ratio
Dermatopontin (Ts)	DPT	NM_001937	3 mikrodissezierte Mammakarzinome (2 duktale und 1 lobuläre)	NC: 77,3% D: 11 % I: 11 %	[-3,2, 0,6] [-4,2] [2,2]
			6 makrodissezierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 26 % D: 55 % I: 18 %	[-1, 2,2] [-6,8, -1,4] [0,2, 2,8]
			8 makrodissezierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	NC: 37,5 % D: 58,3 % I: 4 %	[-0,6, 0,7] [-3,7, -1] [0,4]
			Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn und 2 Knochenmetastasen)	NC: 66,6 % D: 33,3 %	[0, 0,1] [0,9]
			Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	D: 100 %	[-5,9, -3,7]
			3 Ovarial-karzinome	D: 100 %	[-5,5, -3,6]

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Nukleotid „accession number“ im NCBI	Tumor und Zelllinien	%MI/I/NC/MD/D	Log-Ratio
Fibulin-3 (Ts)	EFEMP1	NM_004105	3 mikrodisszierte Mammakarzinome (2 duktale und 1 lobuläres)	NC: 50 % D: 50 %	[-1, -0,9] [-1,8, -1]
			6 makrodisszierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 17 % D: 67 % I: 17 %	[0, 02] [-2,9, -0,7] [0,8, 1]
			8 makrodisszierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	NC: 37,5 % D: 62,5 %	[-0,3, 0,2] [-3,5, -1]
			Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn und 2 Knochenmetastasen)	NC: 50 % D: 50 %	[-0,7] [-0,6]
			Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	D: 100 %	[-2,4, -2]
			3 Ovarialkarzinome	D: 100 %	[-3,4, -1,3]
			Eplin (Ts)	EPLIN	NM_016357
6 makrodisszierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 88,8 % I: 11,1 %	[-0,4, 0,2] [0,3]			
8 makrodisszierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	NC: 62,5 % D: 12,5 % I: 25 %	[-0,4, 0,3] [-1,7] [0,3, 0,4]			
Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn und 2 Knochenmetastasen)	NC: 100 %	[0,2]			
Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	D: 100 %	[-1,2]			
3 Ovarialkarzinome	D: 100 %	[-1,8, -1,4]			

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Nukleotid „accession number“ im NCBI	Tumor und Zelllinien	%MI/I/NC/MD/D	Log-Ratio
secretory leukocyte protease inhibitor precursor (On)	SLPI	NM_003064	3 mikrodisszierte Mammakarzinome (2 duktale und 1 lobuläres)	D: 100 %	[-4,1, -1,7]
			6 makrodisszierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 22,2 % D: 55,5 % I: 22,2 %	[-0,1, 0,1] [-3,8, -1,2] [1,3, 1,9]
			8 makrodisszierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	NC: 25 % D: 62,5 % I: 12,5 %	[-0,3, 0,1] [-2,9, -1,5] [2]
			Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn und 2 Knochenmetastasen)	D: 100 %	[-2,5]
			Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	NC: 100 %	[0,1]
			3 Ovarialkarzinome	I: 100 %	[6,1, 3,9]
			CSE1 chromo-some segregation 1-like (yeast) (On)	CSE1L/CAS	NM_001316
6 makrodisszierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 41 % I: 59 %	[-0,1, 0,4] [0,3, 1,3]			
8 makrodisszierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	NC: 42 % I: 58 %	[-0,4, 0,4] [0,6, 1,8]			
Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn- und 2 Knochenmetastasen)	NC: 66,6 % I: 33,3 %	[0,1, 0,1] [0,4]			
Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	I: 100 %	[0,8, 1,4]			
3 Ovarialkarzinome	I: 66,6 % NC: 33,3 %	[0,4, 1,2] [1,5, 2,7]			

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Nukleotid „accession number“ im NCBI	Tumor und Zelllinien	%MI/I/NC/MD/D	Log-Ratio
WAP four-disulfide core domain 2 (On)	WFDC2	NM_006103	3 mikrodyssezierte Mammakarzinome (2 duktale und 1 lobuläres)	NC: 33,3 % D: 66,6 %	[-1,1] [-1,7, -2,4]
			6 makrodyssezierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 11,1 % D: 55,5 % I: 33,3 %	[0,4] [-2,4, 0,8] [0,4, 1]
			8 makrodyssezierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	NC: 38,5 % D: 25 % I: 36,5 %	[-0,7, 0,5] [-1,3, -1,2] [1,1, 2]
			Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn- und 2 Knochenmetastasen)	MD: 100 %	[-0,7]
			Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	I: 100 %	[1,9]
			3 Ovarialkarzinome	I: 100 %	[4,9, 6,8]
			crystallin, alpha B (Ts)	CRYAB	NM_001885
6 makrodyssezierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 22,2 % D: 77,7 %	[-1,3, -0,1] [-0,9, -3,6]			
8 makrodyssezierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	NC: 12,5 % D: 87,5 %	[-0,8] [-1,1, -3,8]			
Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn und 2 Knochenmetastasen)	D: 100 %	[-2,2]			
Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	NC: 100 %	[0]			
3 Ovarialkarzinome	D: 100%	[-1,5, -2,9]			

Gen-Name	Gen-Symbol (HUGO Name)	Nukleotid „accession number“ im NCBI	Tumor und Zelllinien	%MI/I/NC/MD/D	Log-Ratio
Capping protein, gelsolin-Like (On)	CAP G	NM_001747	3 mikrodisezierte Mammakarzinome (2 duktale und 1 lobuläres)	NC: 66,6 % I: 33,3 %	[-0,1, 0,3] [1,2]
			6 makrodisezierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 11,1 % D: 22,2 % I: 66,6 %	[0,6] [-1,2,-0,5] [0,8, 1,6]
			8 makrodisezierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	I: 100 %	[0,5, 2,2]
			Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn und 2 Knochenmetastasen)	I: 100 %	[0,4]
			Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	NC: 100 %	[-0,2]
			3 Ovarialkarzinome	NC: 66,6 % D: 33,3 %	[0,2, 1,1] [-1,1]
			Caveolin 1 (Ts)	CAV-1	NM_001753
			6 makrodisezierte Mammakarzinome (4 duktale, 2 unbekannter Histologie)	NC: 22,2 % D: 66,6 % I: 11,1 %	[-0,3, 0] [-0,9, 2,1] [0,9]
			8 makrodisezierte Mammakarzinome (6 duktale, 2 lobuläre)	D: 100 %	[-0,8, 3,5]
			Metastasen-Pool A (2 Kleinhirn und 2 Knochenmetastasen)	D: 100%	[-1,6]
			Metastasen-Pool B (5 Hirnmetastasen)	D: 100%	[-3]
			3 Ovarialkarzinome	D: 100 %	[-3,8, -2,9]

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Auswertung des zweiten Datensatzes der Affymetrix-Chips. Schwarz sind die Gene die der Münchner Gruppe zugeteilt worden. Rot die Gastgene aus Düsseldorf, und Blau das Gastgen aus Bonn.

Ts: putatives Tumorsuppressorgen, on: putatives Onkogen, MI: Marginal Increase: leicht erhöhte Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript, I: Increase: Stark erhöhte Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript, NC: No Change: Keine Veränderung in der Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript, MD: Marginal Decrease: leicht erniedrigte Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript, D: Decrease: Stark erniedrigte Signalintensität in Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript.

Bei der detaillierten Betrachtung in den 3 mikrodisezierten Mammakarzinomen, bestehend aus 2 duktalem und 1 lobulärem Mammakarzinom mit einem Tumoranteil von größer als 90% zeigten die Gene EFEMP1, SLPI, WFDC2, CRYAB und CAV-1 eine sehr deutliche Reduktion der Signalintensität. Das Gen CSE1 zeigte eine Erhöhung der Signalintensität in diesen mikrodisezierten Mammakarzinomen. Die Gene DPT, CAPG zeigten keine Veränderung der Signalintensität bei den Tumor-Transkripten im Vergleich zum Normalgewebe-Transkript. Das Gen EPLIN zeigt keine Veränderung seiner Signalintensität.

In den 14 makrodisezierten Tumoren (Siehe Tabelle 3.3), zeigten die Gene DPT, EFEMP1, SLPI, CRYAB, und CAV-1 ein eindeutiges Decrease. Keine Veränderung bis hin zu einer leichtm „Increase“ der Signalintensität bei den 14 makrodisezierten Tumoren zeigte das Gen EPLIN. Eine Erhöhung der Signalintensität bei diesen 14 makrodisezierten Tumoren zeigten die Gene CSE1 und CAP G.

Das Gen WFDC2 zeigte bei den 6 makrodisezierten Tumoren eine Reduktion des Signals und bei den 8 makrodisezierten Tumoren ist ein leicht erhöhtes „Increase“ in ca 40 % der Mamatumore zu erkennen (siehe Tabelle 3.3).

Im Metastasen-Pool A (siehe Tabelle 3.3) zeigten die Gene SLPI, CRYAB und CAV-1 ein eindeutiges „Decrease“. Das Gen WFDC2 zeigte ein MD, d.h. eine schwache Reduktion der Signalintensität im Metastasen-Pool-Transkript im Vergleich zum Normal-Pool-Transkript. Das Gen CAP G zeigte im Metastasen-Pool A eine Erhöhung der Expression. Keine Veränderung der Signalintensitäten im Metastasen-Pool A zeigten die Gene DPT, EFEMP1, EPLIN und CSE1.

Im Metastasen-Pool B (siehe Tabelle 3.3), zeigten die Gene DPT, EFEMP1, EPLIN und CAV-1 eine Reduktion der Expression. Die Gene CSE1 und WFDC2 zeigten eine Erhöhung der Expression. Die Gene SLPI, CRYAB und CAP G hingegen zeigten keine Veränderung der Expression im Metastasen-Pool B.

Beim Ovarialkarzinom (siehe Tabelle 3.3), zeigten die Gene DPT, EFEMP1, EPLIN, CRYAB und CAV-1 eine eindeutige Reduktion der Expression. Die Gene SLPI, CSE1 und WFDC2 zeigten einen Increase. Das Gen CAP G zeigte keine Veränderung der Signalintensität im Ovarialkarzinom.

Beim Vergleich der Daten von Proben-Set 1 und 2 wurde, bei den Genen DPT und EFEMP1 eine Herunterregulierung der Signalintensität, d.h. eine Verminderung der Expression im Mammakarzinom, in den Hirnmetastasen des Primär-Tumores und im Ovarialkarzinom beobachtet.

Das Gen EPLIN zeigte eine Reduktion der Signalintensität in den Hirnmetastasen, die vom primären Mammakarzinom ausgingen, und im Ovarialkarzinom. Besonders war die Reduktion in den Hirn-Metastasen zu beobachten. Im primären Mammakarzinom ist diese Gen zum Teil leicht erhöht Exprimiert.

Das Gen SLPI zeigte eine eindeutige Herunterregulierung der Signalintensität in primären Mammakarzinomgeweben und in den Kleinhirn- und Knochenmetastasen. Hingegen zeigte es im Ovarialkarzinom eine Erhöhung der Signalintensität.

Das Gen CSE1L zeigte eine eindeutige Erhöhung der Signalintensität im Primär-Tumor, in den Hirnmetastasen und im Ovarialkarzinom.

Das Gen CRYAB zeigte im Mammakarzinom, den Kleinhirn- und Knochenmetastasen und im Ovarialkarzinom eine eindeutige Herunterregulierung der Signalintensität.

Das Gen CAV-1 zeigte in den Primär-Tumoren des Mammakarzinoms, der Hirn- und Kleinhirn- und Knochenmetastasen und im Ovarialkarzinom eine eindeutige Herunterregulierung der Signalintensität.

Das Gen WFDC2 zeigt eine Erhöhung der Signalintensität im Ovarialkarzinom. Im Mammakarzinom ist in ca nur 40 % ein „Increase“ zu sehen. Während die Daten für das Ovarialkarzinom sehr gut mit den Daten bei den CPA-Filtern übereinstimmen, ist es schwierig, für das Mammakarzinom eine konkrete Aussage zu treffen.

Das Gen CAP G zeigt eine Erhöhung der Signalintensität im Mammakarzinom und in Kleinhirn- und Knochenmetastasen. Im Ovarialkarzinom ist keine Erhöhung der Signalintensität zu beobachten, was in Diskrepanz zu den CPA-Daten steht.

Zusammenfassend stimmten die Ergebnisse der Affymetrix-Analyse weitgehend mit den CPA-Daten (siehe Abschnitt 3.1.1) überein.

3.2 LOH-Analyse bei Tumorsuppressorgenen in sporadischen gynäkologischen Mammakarzinomen

Eine LOH-Analyse zur Detektion eines Allelverlustes im Mammakarzinom wurde bei den Genen EFEMP1, DPT, EPLIN und PLCG durchgeführt.

Bei der LOH-Analyse wurden vergleichend Normal- und Tumorgewebe der gleichen Patientin untersucht. Das Normalgewebe gab Auskunft darüber, ob der benützte Marker bezüglich der Unterscheidung der allelischen Chromosomen informativ war. War ein Marker informativ, wurden zwei unterschiedlich große PCR-Produkte amplifiziert, da die Allele der homologen Chromosomen eine unterschiedliche Anzahl an repetitiven Einheiten besaßen. Bei Homozygotie erhält man nur identische PCR-Produkte, es kann also keine Auskunft über einen eventuellen Allelverlust gewonnen werden (nicht informativ). Nach PCR-Amplifikation wurden die fluoreszenzmarkierten Produkte, die durch den Einsatz Cy5-markierter Primer gewonnen wurden, elektrophoretisch auf einem DNA-Sequenzier (A.L.F; Pharmacia, Biotech) aufgetrennt.

In Abbildung 3.3 ist je ein Beispiel für einen homozygoten, nicht informativen Marker, für einen informativen Marker ohne Allelverlust und einen informativen Marker mit Allelverlust anhand des EFEMP1-Gens gezeigt.

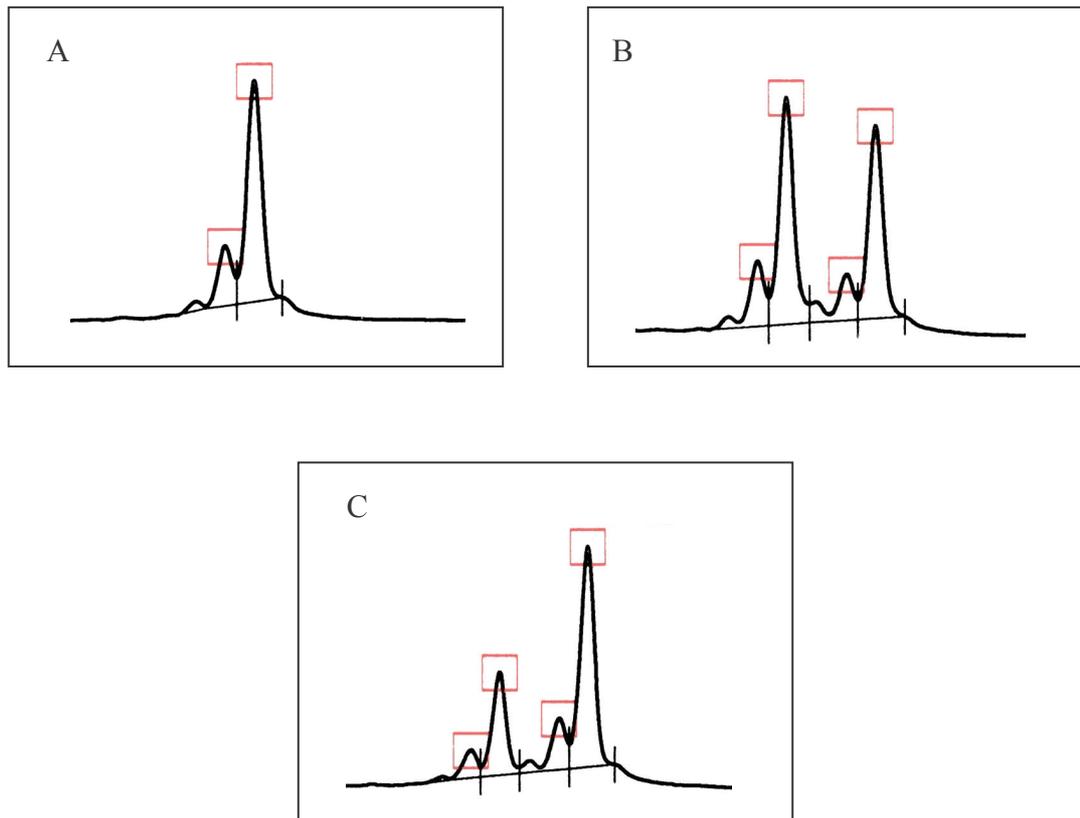


Abb. 3.3: Beispiele für A: einen nicht informativen Marker, B: einen informativen Marker ohne LOH und C) für einen informativen Marker mit LOH im EFEMP1-Gen (Sadr-Nabavi Diplomarbeit., 2001).

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden die Marker und die PCR-Bedingungen für die LOH- Analyse der 4 Gene EFEMP1, DPT, EPLIN und PLCG, welche in den „in silico“-Daten als putative Tumorsuppressorgene nominiert waren, etabliert. Für das EFEMP1-Gen wurde der repetitive Marker, der innerhalb des Gens liegt, gewählt. Dieser Marker besteht aus einer TAAA-Wiederholung. Die flankierenden Primer wurden so gewählt, dass ein PCR-Produkt von 201 bp entstand. Da dieser Marker eine nicht genügend hohe Informativität (42 %) besaß und im weiteren Verlauf der Dissertation dieses Gen als Hauptziel für weiterführende Analysen gewählt worden war, wurde ein zweiter Marker mit einer höheren Informativität (72 %) für weiterführende Analysen benutzt. Dieser Marker besteht aus einer TTTC-Wiederholung. Die flankierenden Primer wurden so gewählt, dass ein PCR-Produkt von 230 bp entstand. Für das DPT-Gen wurde der D1-Marker, welcher Wiederholungseinheiten eines TG-Dinukleotids enthielt und innerhalb des Dermatopontin-Gens lag, gewählt. Das dazugehörige PCR-Produkt war 252 bp lang. Für das Gen EPLIN wurde der E1-Marker, ein Dinukleotid-Repeat, welcher im EPLIN lag, gewählt. Das dazugehörige PCR-Fragment war 227 bp groß. Für das Gen PLCG wurde der Marker B1 mit einer Wiederholungseinheit aus Dinukleotid (TG) innerhalb des Phospholipase-C- γ -1-Gens

so gewählt, dass ein PCR-Produkt von 149 bp entstand. Für jeden Marker wurde, je nach Primer, eine andere Annealing-Temperatur gewählt. Die Primer Sequenzen und PCR-Bedingungen sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Ergebnisse für die LOH- Analyse waren folgende:

Gen-Name	Im Rahmen der Diplomarbeit				Im Rahmen der Dissertation			
	Mar-ker	Anzahl der Tumor/Normalpaare	Max. Heterozygotie	LOH ⁺ /LOH %	Mar-ker	Anzahl der Tumor/Normalpaare	Max. Heterozygotie	LOH ⁺ /LOH %
EFEMP1	F3	57	42 %	5LOH ⁺ 21 %	F2	101	72 %	23LOH ⁺ 32 %
DPT	D1	58	40 %	8LOH ⁺ 33 %	D1	137	45 %	18 LOH ⁺ 29 %
EPLIN	E1	66	84 %	15LOH ⁺ 27 %	n.b	n.b	n.b	n.b
PLCG	B1	59	61 %	11LOH ⁺ 31 %	B1	92	67 %	19LOH ⁺ 31 %

Tabelle 3.4: Ergebnisse der LOH-Analyse. n.b.: Nicht bearbeitet. max. Heterozygotie: Anzahl informativer Fälle/Gesamtzahl der Tumorkaare. LOH %: LOH-positive Tumore/Anzahl informativer Fälle

Für das EFEMP1-Gen wurden im Rahmen der Diplomarbeit 57 Tumor/Normalpaare untersucht. Es wurde ein LOH von 21 % mit dem Marker F3 erhoben. Im Rahmen der Dissertation wurden zusätzlich 101 Tumor/Normalpaare untersucht und ein LOH von 32 % mit dem F2-Marker erfasst. Zusätzlich wurde beim EFEMP1-Gen in 4 mikrodisszierten Tumoren/ Normalpaaren, bei denen eine quantitative PCR-Analyse und Methylierungsanalysen durchgeführt wurden, eine LOH-Analyse mit dem F2-Marker (ein Tetranukleotid, max. Hetero: 72 %) untersucht. Keiner dieser Tumoren zeigte ein LOH.

Für das DPT-Gen wurden im Rahmen der Diplomarbeit 58 und im Rahmen der Dissertation 137 Tumor/Normalpaare mit dem D1-Marker untersucht. Es wurde ein LOH von 33 % bzw. 29 % ermittelt.

Für das Gen PLCG wurde im Rahmen der Diplomarbeit und Dissertation ein LOH von 31 % bei 59 Tumor/Normalpaaren und bei 92 Tumor/Normalpaaren ermittelt.

Das Gen EPLIN zeigte ein 27%iges LOH in 66 untersuchten Tumor/Normalpaaren. Dieses Gen wurde im Rahmen der Dissertation aufgrund von Materialmangel nicht mehr weiter bearbeitet.

In Tumoren, die einen Allelverlust zeigten, wurde eine Mutationsanalyse mittels DHPLC und Sequenzierung angeschlossen.

3.3 Mutationsanalysen in Tumorsuppressorgenen mittels DHPLC und direkter Sequenzierung im Mammakarzinom

Die DHPLC ist eine Methode zur Mutationsdetektion, bei der die Art und Position der Mutation nicht direkt sichtbar ist. Positive DHPLC-Ergebnisse, d.h. Signale, welche vom Wildtyp abweichen, müssen durch Sequenzierung weiter charakterisiert werden. Somit kann diese Methode nur zum „Vorscreening“ eingesetzt werden (siehe Abb 3.4).

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden die PCR- und DHPLC - Bedingungen für die drei Gene EFEMP1 mit 7 Fragmenten, DPT mit 4 Fragmenten und EPLIN mit 13 Fragmenten etabliert. In der Diplomarbeit wurden für das EFEMP1-Gen 5 LOH-positive Tumoren, für das DPT 8 LOH-positive und für das EPLIN 15 LOH-positive und 10 Tumoren mit einem unbekanntem LOH-Status mittels DHPLC analysiert und mit der direkten Sequenzierung verifiziert. Im Rahmen der Dissertation wurden 16 weitere Tumoren im EFEMP1 nachbearbeitet. Bei 6 weiteren Fragmenten des EFEMP1, welches zwei Splice-Varianten hatte, die zur Zeit der Diplomarbeit noch nicht bekannt waren, wurden die PCR- und DHPLC-Bedingungen etabliert und in 21 LOH-positiven Tumoren analysiert. Für das Gen DPT wurden 14 weitere LOH-positive Tumoren im Rahmen der Dissertation analysiert. Für das Gen PLCG wurden in 32 Exons die PCR- und DHPLC - Bedingungen etabliert und in 22 LOH-positiven Tumoren auch im Rahmen der Dissertation analysiert.

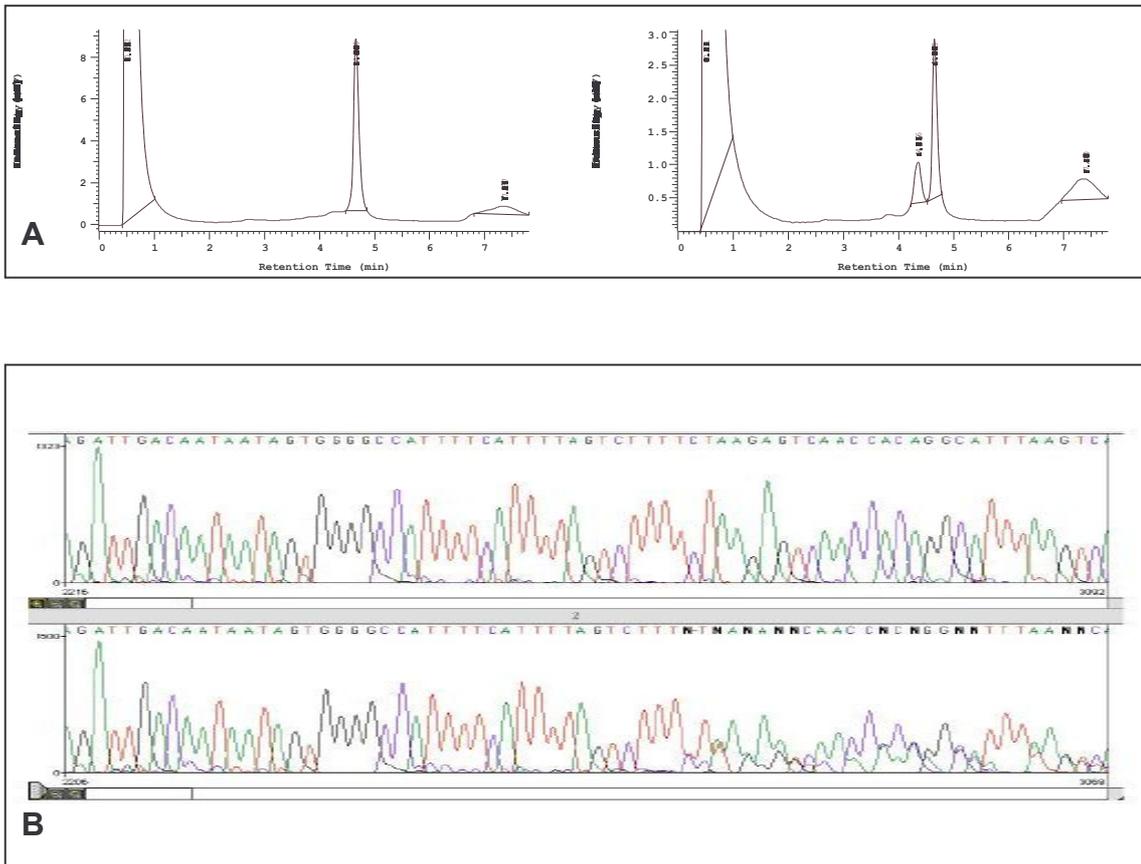


Abb. 3.4: A: Vergleich zwischen Wildtyp und einer Mutation DelT im EFEMP1-Gen Exon 8
 B: Mutation im EFEMP1-Gen DelT im Exon 8, mittels Sequenzierung verifiziert im Mammakarzinom (Sadr-Nabavi Diplomarbeit., 2001).

Die Muationsanalyse ergab folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 3.5).

Gen-Name	Exon-Zahl	Anzahl untersuchter Tumoren in der Diplomarbeit	Anzahl untersuchter Tumoren in der Dissertation	Gesamtzahl an Tumoren, bei denen eine Mutationsanalyse durchgeführt wurde	Ergebnisse der Mutationsanalyse in der Diplomarbeit	Ergebnisse der Mutationsanalyse in der Dissertation
EFEMP1		5	16	21	1 „frameshift“-Mutation: Exon 8, nt Pos 1623 delT, F597X, 1 Poly (-13 IVS 1 , A →G)	1 „missens“-Mutation: Exon 1b1, nt Pos 228 A → C, D 26 A, 2 Polys (+20 IVS 1a, G→C und +84 IVS 1d, T→C)
NM_004105	11					
NM_018894	10					

Gen-Name	Exon-Zahl	Anzahl untersuchter Tumoren in der Diplomarbeit	Anzahl untersuchter Tumoren in der Dissertation	Gesamtzahl an Tumoren, bei denen eine Mutationsanalyse durchgeführt wurde	Ergebnisse der Mutationsanalyse in der Diplomarbeit	Ergebnisse der Mutationsanalyse in der Dissertation
DPT NM_001937	4	8	14	22	<u>1 "missens"-Mutation:</u> Exon 2, nt Pos 432 C → T, P 140 L, <u>1 "silent"-Mutation:</u> Exon 1, nt Pos 252 A → G, R 80 R, <u>1 Poly</u> (+39 IVS 4, Ins A)	<u>1 "silent"-Mutation:</u> Exon 2, nt Pos 426 A → G, R 138 R, <u>1 Poly</u> (+42 IVS 3, A → G)
EPLIN NM_016357	11	15 LOH-positive + 10 ohne bekannten LOH-Status	Während der Dissertation keine Analyse	15	<u>1 Poly</u> (+18 IVS 11, G → A)	
PLCG NM_002660	32	Während der Diplomarbeit keine weitere Analyse	22	22		<u>6 Polys</u> (Exon 9, nt Pos 903 A → G, S 280 G, -23 IVS 11 C → T, Exon 16, nt Pos 1984 A → G, Y 572 C, Exon 19 nt Pos 2354 G → A, E 762 E, Exon 21 nt Pos 2506 C → T, I 846 Y, +20 IVS 30 G → A)

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Mutationsanalyse.

Um die „missens“-Mutationen in den beiden Genen EFEMP1 (Exon 1b1, nt Pos 228 A → C, D 26 A) und DPT (Exon 2, nt Pos 432 C → T, P 140 L) bestätigen zu können, stand zu den jeweiligen Tumoren kein Normalgewebepaar zu Verfügung. Aus diesem Grund wurden 50 Blut-DNAs mittels DHPLC untersucht. Keine der Probandinnen zeigte die entsprechenden „missens“-Mutationen.

Durch die Mutationsanalyse wurden in zwei Genen (EPLIN und PLCG) nur Polymorphismen, in zwei Genen (EFEMP1 und DPT) Polymorphismen, eine Deletion und zwei Missens-Mutationen im kodierenden Bereich gefunden.

Interessanterweise wurden diese zwei Gene in den meisten sporadischen Mammakarzinomen reduziert exprimiert gefunden. Damit sind diese Gene geeignete Kandidaten als Tumorsuppressorgene.

Mit speziellem Aspekt auf das EFEMP1-Gen war auffällig, dass trotz reduzierter Expression eine Mutation nur in 10 % (2 von 20 Tumoren) der Fälle nachzuweisen war. Eine Erklärung dafür könnte die Methylierung ("imprinting") des zweiten Allels sein, die auch schon für andere Tumoren beobachtet wurde (Engemann et al., 2000; Paulsen et al., 2000). Deshalb wurde die Promotorregion des EFEMP1 Gens untersucht.

Im Rahmen der Dissertation wurden zusätzlich zwei weitere Gene auf DNA-Hypermethylierung im Promotorbereich untersucht. Zum einen wurden das CAV-1-Gen und zum anderen das SASH1-Gen in einem „Nebenprojekt“ untersucht.

3.4 Epigenetische Analysen

Zur Analyse des Methylierungsstatus von CpG-Dinukleotiden vor dem Transkriptionsstart der Gene SASH1, CAV-1 und EFEMP1 wurde zu erst einmal eine Promotoranalyse beim jeweiligen Gen durchgeführt, da die Promotorregion dieser Gene zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht bekannt war. Zum zweiten wurde eine genomische Bisulfidsequenzierung in diesem Bereich durchgeführt.

3.4.1 Promotoranalyse des CAV-1

Im Bereich von – nt862 am 5'-Ende des CAV1-Gens nach dem Initiationscodon liegt eine CPG-Insel, die 35 CPG-Dinukleotide enthält. Die potenzielle Promoterregion und das Exon 1 des CAV1-Gens sind in dieser CPG-Insel eingebettet. Die Sequenz weist mit einem GC-Anteil von über 61 % (siehe Abb. 3.5) auf 0,919 kb (im Vergleich zu ca. 40 % im übrigen Genom) und einem hohen CPG-Vorkommen mit einem Verhältnis $\text{CPG}_{\text{beobachtet}} / \text{CPG}_{\text{erwartet}}$ von 0,61 (im Vergleich zu einem Wert von 0,25 im übrigen Genom) die typischen Charakteristika einer CPG-Insel auf. (Gardiner-Garden et al. 1987; Antequera et al. 1993 ; Milanesi. et al. 1999).

3.4.2 Bisulfitsequenzierung des Promotorbereichs beim CAV-1-Gen

Die reduzierte Expression des CAV-1-Gens im Mammakarzinom konnte mittels CPA-, und Affymetrix-Chip-Analyse gezeigt werden. Aus der Literatur ist eine Hypermethylierung des CAV-1-Promotors im Prostatakarzinom bekannt (Cui et al., 2001). Darüber hinaus wurde über die Hypermethylierung des CAV-1-Gens in der Promotorregion in Brustkarzinomzelllinien berichtet (Engelman et al., 1999). Mit diesem Wissen wurde DNA aus 3 mikrodisszezierten Tumor-/Normalgewebe-Paaren aus Kryoschnitten extrahiert und anschließend bisulfit behandelt. Diese 3 mikrodisszezierten Tumor-/Normalgewebe-Paare wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. R. Schmutzler mittels Real-Time-PCR auf differenzielle Expression untersucht. Alle 3 Mammatumoren zeigten eine Herunterregulation der Expression im Vergleich zum Normalgewebe.

Um eine mögliche differenzielle Methylierung zu untersuchen, wurde eine Bisulfitsequenzierung durchgeführt. Es wurde DNA aus allen 3 mikrodisszezierten Brust-Tumor-/Normalgewebe-Paaren bisulfitsequenziert. Durch die Behandlung mit Natriumbisulfit und Natronlauge wurde die DNA stark fragmentiert und zu ca. 90 % degradiert (Grunau et al. 2001). Nach der Bisulfitbehandlung von 1 µg genomischer DNA war photometrisch keine DNA-Konzentration mehr messbar. Dennoch ließ sich die bisulfitbehandelte DNA amplifizieren.

In der optimierten PCR mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase bei 36 Zyklen wurden für das Fragment A mit 352 bp die Primer AF und AR und für das Fragment B mit 275 bp die Primer BF und BR verwendet. (Primer-Sequenz siehe Anhang). Die Primer erhielten keine CPG-Dinukleotide, somit war eine Amplifikation aller bisulfitbehandelten DNA-Stränge unabhängig von ihrem Methylierungsstatus möglich. Aus diesem Grunde wurde die Bisulfit-PCR als „methylierungsunabhängig“ bezeichnet. Das amplifizierte Produkt A enthielt 7 CPG-Dinukleotide und war von -526 bis -878 vor dem Initiationscodon auf dem codierenden Strang von CAV-1 lokalisiert. Das amplifizierte B-Produkt enthielt 17 CPG-Dinukleotide und war von -202 bis -527 auch vor dem Initiationscodon auf dem codierenden Strang von CAV-1 lokalisiert (siehe Abb. 3.5). Mit der Subklonierung dieser methylierungsunabhängigen Bisulfit-PCR-Amplifikate und der anschließenden Sequenzierung von 16 Klonen pro Probe wurde das Methylierungsmuster der 1 bis 24 CPG-Dinukleotide vor dem Translationsstart analysiert.

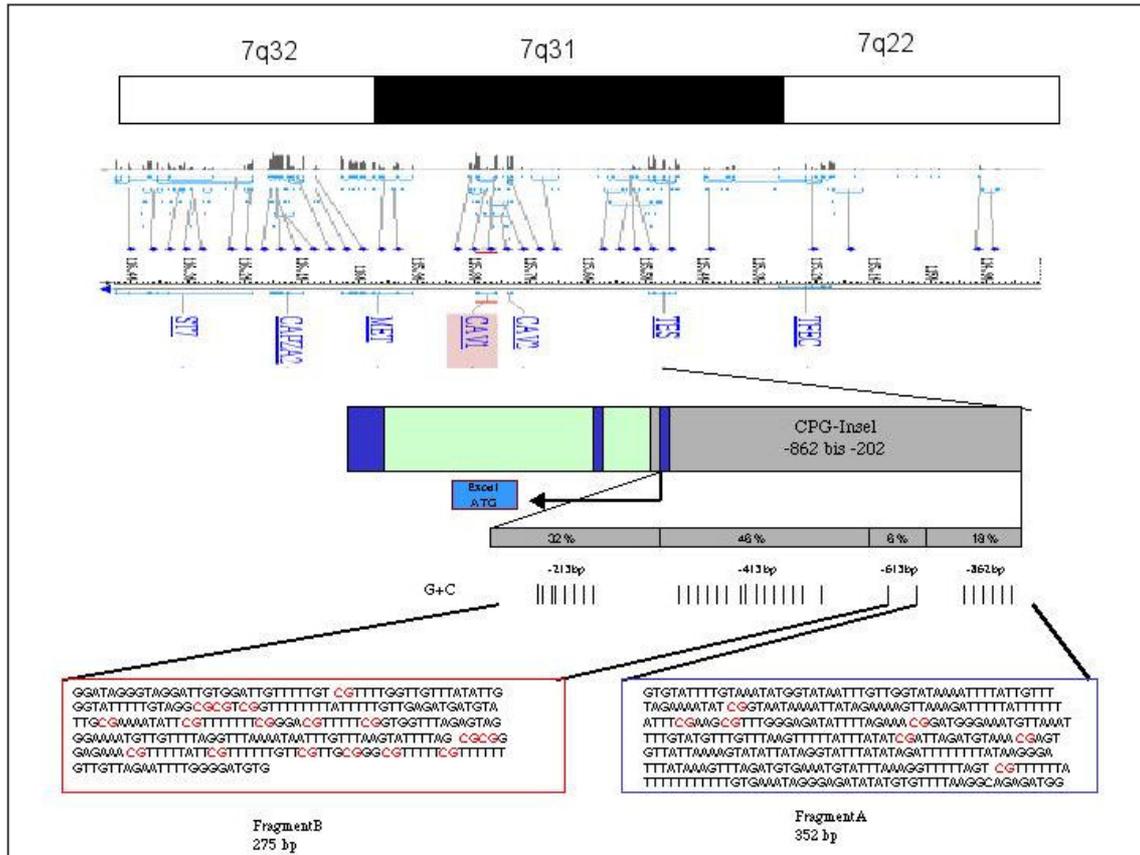


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der genomischen Struktur von CVA-1 auf Chromosom 7q31.1. Die als graues Rechteck gekennzeichnete CPG-Insel beherbergt 24 CPG-Dinukleotide und reicht von der Promotorregion bis in das Exon 1 hinein. Darunter ist der G+C-Gehalt in % angegeben. Die vertikalen schwarzen Striche darunter stellen die Verteilung der CPGs in diesem Bereich dar. Die darunter vergrößert dargestellte Teilsequenz zeigt die Sequenz des Fragments A (blauer Kasten) und die Sequenz des Fragments B (roter Kasten) nach der Bisulfitemwandlung. Das Fragment A beherbergt 7 und das Fragment B 17 CPG-Dinukleotide (rot gekennzeichnet).

Die Ergebnisse der genomischen Bisulfitemsequenzierung für die Fragmente A und B bei den 3 mikrodisszezierten Mammakarzinomen, die eine Reduktion der Expression zeigten, sind im folgenden tabellarisch aufgeführt:

Tumor-DNA-Nummer	Histologie	Alter der Patientin bei der Gewebeentnahme	Fragment A		Fragment B		Real-Time-PCR	Ergebnisse
			Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone		
T2127	Invasiv duktal	79	16	7	16	7	98 % im Tumor herunterreguliert	Methylierung in A und B

Tumor-DNA-Nummer	Histologie	Alter der Patientin bei der Gewebeentnahme	Fragment A		Fragment B		Real-Time-PCR	Ergebnisse
			Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone		
T4276	Invasiv duktal	53	16	11	16	4	85 % im Tumor herunterreguliert	Methylierung in A, Partielle Methylierung in B
T4264	Invasiv duktal	73	16	8	16	4	90 % im Tumor herunterreguliert	Methylierung in A, Partielle Methylierung in B

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Bisulfitequenzierung des CAV-1-Gens in 3 mikrodisezierten Mammakarzinomen.

Die Ergebnisse für die 3 Mammanormalgewebe sind folgende:

DNA-Normalgewebe Nummer	Alter der Patientin bei der Gewebeentnahme	Fragment A		Fragment B		Ergebnisse
		Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	
N2127	79	16	3	16	0	Keine Methylierung in A und B

DNA-Normal- gewebe Nummer	Alter der Patientin bei der Gewebe - entnahme	Fragment A		Fragment B		Ergebnisse
		Anzahl sequen- zierter Klone	Anzahl methyl- ierter Klone	Anzahl sequen- zierter Klone	Anzahl methylierter Klone	
N4276	53	16	9	16	0	Methylierung in A, keine Methylierung in B
N4264	73	16	4	16	0	Partielle Methylierung in A, keine Methylierung in B

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Bisulfitequenzierung des CAV-1-Gens in 3 mikrodisezierten Mammanormalgeweben.

Zusammenfassend kann dargestellt werden, dass 1 von 3 mikrodisezierten Brust-Tumoren, die eine reduzierte Expression in Mammatumoren im Vergleich zum Normalgewebe zeigten, eine eindeutige Methylierung in der Region von – nt862 am 5'- (Fragment B) Ende des CAV-1-Gens aufwies. Die zwei weiteren Tumoren zeigten hingegen eine schwache Methylierung in dieser Region. Aufgrund von Materialmangel konnte kein größeres Tumorsset untersucht werden. Um eine genaue Aussage zu treffen, wäre es notwendig, ein größeres Tumorsset zu analysieren. Außerdem sollte eine weitere Region im Exon-Bereich des Gens untersucht werden.

3.4.3 Promotoranalyse von SASH1

Im Bereich von – nt1440 am 5'- Ende des Gens nach dem Initiationscodon liegt eine CPG-Insel, die insgesamt 88 CPG-Dinukleotide enthält. Die potenzielle Promoterregion und das Exon1 des Gens sind in dieser CPG-Insel eingebettet (siehe Abb. 3.6). Die Sequenz weist mit einem GC-Anteil von über 62 % auf 1,44 kb und einem hohen

CPG-Vorkommen mit einem Verhältnis $\text{CPG}_{\text{beobachtet}} / \text{CPG}_{\text{erwartet}}$ von 0,94 die typischen Charakteristika einer CPG-Insel auf.

3.4.4 Bisulfitsequenzierung des Promotorbereichs beim SASH1-Gen

Mittels „in Silico“-Analysen und LOH-Studien konnte gezeigt werden, dass einzelne Gene, die im genomischen Intervall auf Chromosom 6q23-25 lokalisiert sind, eine Reduktion der Expression in Mammatumoren zeigen. Das SASH1 („SH3 domain containing 1“) gehört zu diesen Genen. Es konnte auch gezeigt werden, dass 30 % der primären Mammakarzinome einen Allelverlust (LOH) in diesem Gen aufweisen (Zeller et al., 2003). Aus der gleichen Literatur-Quelle ist bekannt, dass der LOH mit einem schnelleren Wachstum der Tumoren und einem kürzeren rezidivfreien Überleben korreliert. Mittels CPA-Analyse konnte in der gleichen Arbeitsgruppe (Prof. S. Schereneck, MDC Berlin) gezeigt werden, dass SASH1 in 74 % der Mammatumoren eine Herunterregulation der Expression im Vergleich zum Normalgewebe zeigt. Somit ist SASH1 möglicherweise ein neuer Tumorsuppressor, welcher in der Entstehung des Mammakarzinoms eine Rolle spielt.

Mit diesen Informationen wurde in einem Kooperationsprojekt außerhalb des GCC-Konsortiums mit der Arbeitsgruppe von Prof. S. Schereneck differenzielle Methylierung im Rahmen der Dissertation untersucht. Zu diesem Zweck wurde DNA aus 5 mikrodisszierten Tumor-/Normalgewebe-Paaren, bei denen ein LOH in diesem Gen vorlag und bei denen bei der Mutationsanalyse keine funktionelle Mutation gefunden wurde, uns zugesendet. Diese DNA wurde anschließend mit Bisulfit behandelt. Es wurde DNA aus allen 5 mikrodisszierten Brust-Tumor-/Normalgewebe-Paaren amplifiziert und anschließend bisulfitsequenziert. Zur Amplifikation der Proben wurde eine nested PCR durchgeführt.

In der optimierten Ersterunde-PCR mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase bei 36 Zyklen wurden für das Fragment A1 mit 527 bp die Primer AF1 und AR1 und für das Fragment B1 mit 489bp die Primer BF1 und BR1 verwendet. In der Zweiterunde-PCR („nested“) mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase wurden bei 40 Zyklen für das Fragment A2 mit 384 bp die Primer AF2 und AR2 und für das Fragment B2 mit 333 bp die Primer BF2 und BR2 gewählt (Primer-Sequenz siehe Anhang). Das amplifizierte Produkt A2 enthielt 59 CPG-Dinukleotide und war von +22 bis -480 im Verhältnis zum Initiationscodon auf dem codierenden Strang von SASH1 lokalisiert. Das amplifizierte B2-Produkt enthielt 29 CPG-Dinukleotide und war von -561 bis -1012 vor dem

Initiationscodon auf dem codierenden Strang lokalisiert (siehe Abb. 3.6). Mit der Subklonierung dieser methylierungsunabhängigen Bisulfit-PCR-Amplifikate und der anschließenden Sequenzierung von über 10 Klonen pro Probe wurde das Methylierungsmuster der 1 bis 88 CPG-Dinukleotide vor dem Translationsstart des SASH1-Gens analysiert. Abb. 3.6 zeigt schematisch die genomische Struktur von SASH1 auf Chromosom 6 q24.3, den G+C-Gehalt in % für die CpG-Insel und die Sequenz des Fragments A2 (blauer Kasten) und des Fragments B2 (roter Kasten) nach der Bisulfitumwandlung.

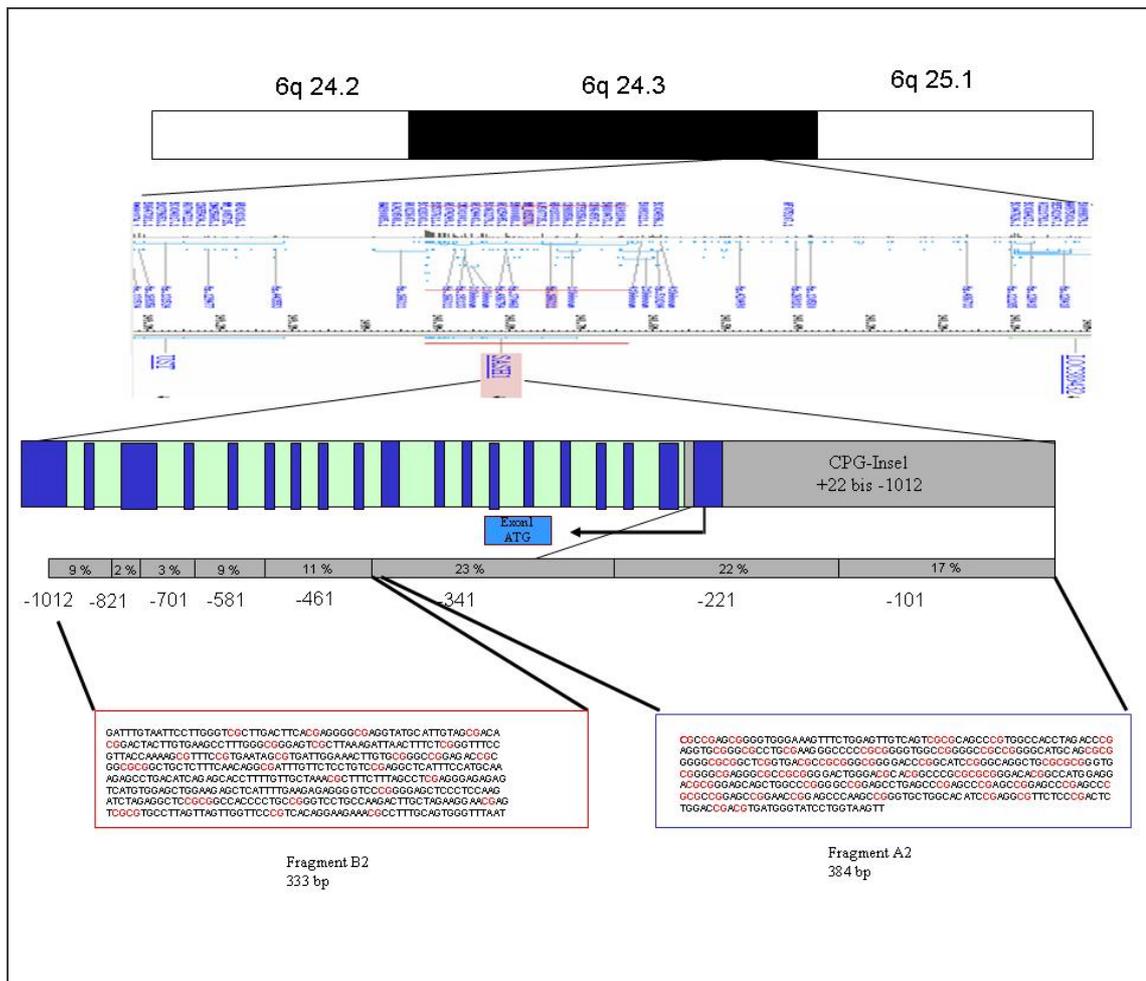


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der genomischen Struktur von SASH1 auf Chromosom 6q24.3. Die als graues Rechteck gekennzeichnete CPG-Insel beinhaltet 88 CPG-Dinukleotide und reicht von der Promotorregion bis in das Exon 1 hinein. Darunter ist der G+C-Gehalt in % angegeben. Die darunter vergrößert dargestellte Teilsequenz zeigt die Sequenz des Fragments A2 (blauer Kasten) und Sequenz des Fragments B2 (roter Kasten) nach der Bisulfitumwandlung. Das Fragment A2 beherbergt 59 und das Fragment B2 beherbergt 29 CPG-Dinukleotide (rot gekennzeichnet).

Die Ergebnisse der genomischen Bisulfitsequenzierung für die Fragmente A2 und B2 bei den 5 makrodissezierten Mammakarzinomen, die ein LOH zeigten, sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt:

Tumor-DNA - Nummer	Histologie	Alter der Patientin bei der Gewebentnahme	Fragment A2		Fragment B2		Allel-Verhältnis zwischen Normalgewebe und Tumor	Allelverlust im Tumor in %	Ergebnisse
			Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone			
183	invasiv duktal	46	16	14	16	16	0,72	28 %	Methylierung in A2, und in B2
185	invasiv duktal	60	27	1	12	0	0,72	28 %	Keine Methylierung in A2, und in B2
189	invasiv duktal	67	13	13	9	0	0,70	30 %	Methylierung in A2, keine in B2
202	invasiv duktal	58	/	/	16	16	0,70	30 %	Methylierung in B2
237	invasive lobulär	45	9	2	16	0	0,70	30 %	Keine Methylierung in A2, und in B2

Tabelle 3.8: Ergebnisse der Bisulfittsequenzierung des SASH1-Gens in 5 mikrodisszierten Mammakarzinomen.

Die Ergebnisse für die 5 Mammanormalgewebe sind folgende:

DNA- Normalgewebe- Nummer	Alter der Patientin bei der Gewebe - entnahme	Fragment A2		Fragment B2		Ergebnisse
		Anzahl sequen- zierter Klone	Anzahl methyl- ierter Klone	Anzahl sequen- zierter Klone	Anzahl methyl- ierter Klone	
183	46	/	/	/	/	/
185	60	11	11	17	0	Keine Methylierung in B2
189	67	15	0	6	0	Keine Methylierung in A2 und B2
202	58	12	0	15	0	Keine Methylierung in A2 und B2
237	45	11	4	18	0	Keine Methylierung in A2 und B2

Tabelle 3.9: Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des SASH1-Gens in 5 mikrodisezierten Mammanormalgeweben.

Zusammenfassend zeigten 3 von 5 makrodisezierten Brust-Tumoren, die ein LOH in Mammatumoren aufwiesen eine eindeutige Methylierung in der Region von – nt1440

am 5'-Ende des Gens. Auch hier wäre es notwendig, ein größeres Tumorsset zu analysieren.

3.4.5 Promotoranalyse von EFEMP1

Hier liegt im Bereich von – nt1671 am 5'-Ende des EFEMP1-Gens nach dem Initiationscodon eine CPG-Insel, die 76 CPG-Dinukleotide enthält. Die potenzielle Promoterregion und das Intron1 des EFEMP1-Gens sind in dieser CPG-Insel eingebettet. Die Sequenz weist mit einem GC-Anteil von über 64 % (siehe Abb. 3.7) auf 1,6 kb und einem hohem CPG-Vorkommen mit einem Verhältnis $\text{CPG}_{\text{beobachtet}} / \text{CPG}_{\text{erwartet}}$ von 0,7 die typischen Charakteristika einer CPG-Insel auf.

3.4.6 Bisulfitsequenzierung des Promotorbereichs beim EFEMP1-Gen

Um die differenzielle Methylierung zu untersuchen, wurde eine Bisulfitsequenzierung durchgeführt. Es wurde DNA aus Mammagewebe bisulfitsequenziert. Dabei handelte es sich um 15 makrodissezierte Mammakarzinome, die für EFEMP1 ein LOH auf einem Allel zeigten, 4 mikrodissezierte Mammakarzinome und deren Normalgewebe als Referenz, bei denen kein LOH vorhanden war und bei 3 Tumoren mittels Real-Time-PCR eine reduzierte Expression festgestellt wurde, und 4 mikrodissezierte Normalgewebe von Frauen verschiedenen Alters.

Die mikrodissezierten Gewebe wurden aus Kryoschnitten (TU München, Pathologie) gewonnen. Die DNA aus makrodissezierten Geweben war teils aus Paraffingewebe und teils aus Kryoschnitten extrahiert worden. Zur Bisulfitbehandlung wurde 1 µg genomischer DNA eingesetzt. Dennoch ließ sich die bisulfitbehandelte DNA nach Optimierung des Bisulfit-PCR-Protokolls und der verwendeten Primersequenzen amplifizieren. Generell war eine Amplifikation bisulfitbehandelter DNA bis zur Fragmentgröße von maximal 450 bp erreichbar.

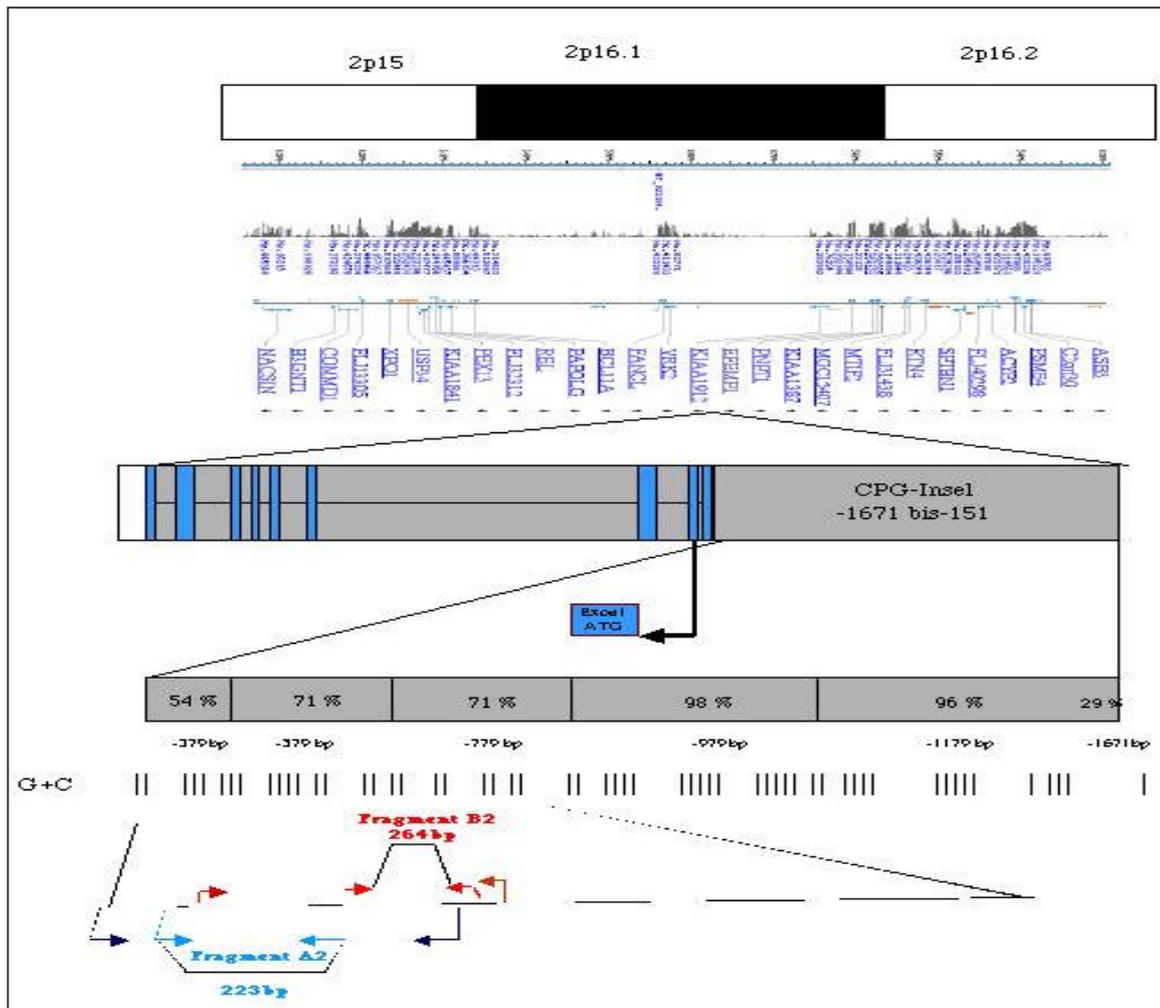


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der genomischen Struktur von EFEMP1 auf Chromosom 2p16.1. Der schwarze Pfeil zeigt den Translationsstart von EFEMP1. Die als graues Rechteck gekennzeichnete CPG-Insel beherbergt 76 CPG-Dinukleotide und reicht von der Promotorregion bis in das Intron 1 des EFEMP1 hinein. Darunter ist der G+C-Gehalt in % angegeben. Die vertikalen schwarzen Striche darunter stellen die Verteilung der CPGs in diesem Bereich dar. Die darunter vergrößert dargestellte Teilsequenz zeigt die Bisulfit-PCR mit den Primern AF1, AR1, BF1 und BR1 für die Ersterunde-PCR und AF2, AR2, BF2 und BR2 für die „nestetd“ PCR.

In der optimierten Ersterunde-PCR mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase bei 36 Zyklen wurden für das Fragment A1 mit 430 bp die Primer AF1 und AR1 und für das Fragment B1 mit 429 bp die Primer BF1 und BR1 verwendet. In der Zweiterunden-PCR („nestetd“) mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase wurden bei 40 Zyklen für das Fragment A2 mit 223 bp die Primer AF2 und AR2 und für das Fragment B2 mit 264 bp die Primer BF2 und BR2 gewählt (Primer-Sequenz siehe Anhang). Die Primer erhielten keine CPG-Dinukleotide, somit war eine Amplifikation aller bisulfitbehandelten DNA-Stränge unabhängig von ihrem Methylierungsstatus möglich. Aus diesem Grunde wurde die Bisulfit-PCR als „methylierungsunabhängig“ bezeichnet. Das amplifizierte Produkt A2 enthielt 14 CPG-Dinukleotide und war von -285 bis -508 vor dem Initiationscodon

auf dem codierenden Strang von EFEMP1 lokalisiert. Das amplifizierte B2-Produkt enthielt ebenfalls 14 CPG-Dinukleotide und war von -412 bis -676 auch vor dem Initiationscodon auf dem codierenden Strang von EFEMP1 lokalisiert (siehe Abb. 3.11). Mit der Subklonierung dieser methylierungsunabhängigen Bisulfit-PCR-Amplifikate und der anschließenden Sequenzierung von 16 Klonen pro Probe wurde das Methylierungsmuster der 4 bis 27 CPG-Dinukleotide vor dem Translationsstart des EFEMP1-Gens analysiert.

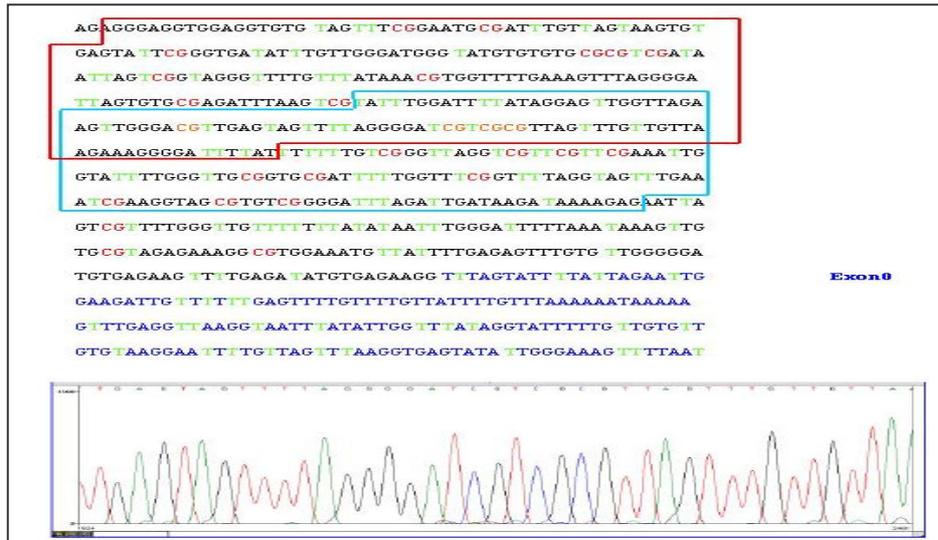


Abb. 3.8: Ausschnitt aus der Promotorsequenz von EFEMP1 in der Tumor-DNA Nummer 77. Blauer Kasten zeigt die Sequenz des Fragments A2 und roter Kasten zeigt die Sequenz des Fragments B2 nach der Bisulfitumwandlung. Jedes Fragment beherbergt 14 CPG-Dinukleotide, die drei gelb eingezeichneten CPGs sind zwischen Fragment A2 und B2 gemeinsam. In grün sind unmethylierte Cytosine gekennzeichnet, die während der Bisulfitbehandlung in Uracil-Bausteine umgewandelt und in der PCR als Thymin gelesen wurden. Die rot markierten Cytosine waren methyliert und wurden nicht chemisch umgewandelt.

In der optimierten Ersterunden-PCR mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase bei 36 Zyklen wurden für das Fragment A1 mit 430 bp die Primer AF1 und AR1 und für das Fragment B1 mit 429 bp die Primer BF1 und BR1 verwendet. In der Zweiterunden-PCR („nested“) mit Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase wurden bei 40 Zyklen für das Fragment A2 mit 223 bp die Primer AF2 und AR2 und für das Fragment B2 mit 264 bp die Primer BF2 und BR2 gewählt (Primer-Sequenz siehe Anhang). Die Primer enthielten auch hier keine CPG-Dinukleotide. Das amplifizierte Produkt A2 enthielt 14 CPG-Dinukleotide und war von -285 bis -508 vor dem Initiationscodon auf dem codierenden Strang von EFEMP1 lokalisiert. Das amplifizierte B2-Produkt enthielt ebenfalls 14 CPG-Dinukleotide und war von -412 bis -676 auch vor dem Initiationscodon auf dem codierenden Strang von EFEMP1 lokalisiert (siehe Abb. 3.8). Mit der Subklonierung dieser methylierungsunabhängigen Bisulfit-PCR-Amplifikate

und der anschließenden Sequenzierung von 16 Klonen pro Probe wurde das Methylierungsmuster der 4 bis 27 CPG-Dinukleotide vor dem Translationsstart des EFEMP1-Gens analysiert.

Die Ergebnisse der genomischen Bisulfitsequenzierung für die Fragmente A2 und B2 bei den 15 makrodissezierten Mammakarzinomen, die ein LOH auf einem Allel zeigten, sind im folgenden tabellarisch aufgeführt:

Tumor-DNA - Nummer	Histologie	Alter der Patientin bei der Gewebeentnahme	Fragment A2		Fragment B2		Allelverhältnis zwischen Normalgewebe und Tumor	Allelverlust im Tumor in %	Ergebnisse
			Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone			
77	invasiv duktal	62	16	16	16	0	0,30	70 %	Methylierung in A2, keine in B2
193	invasiv lobulär	44	16	16	/	/	0,43	57 %	Methylierung in A2
273	?	?	16	14	/	/	0,64	36 %	Methylierung in A2
156	invasiv duktal	52	16	10	16	0	0,60	40 %	Methylierung in A2, keine in B2
168	invasiv duktal	78	16	9	/	/	0,64	36 %	Methylierung in A2
191	invasiv duktal	67	16	8	/	/	0,70	30 %	Methylierung in A2
331	invasiv duktal	56	16	7	/	/	0,42	58 %	Methylierung in A2

Tumor DNA-Nummer	Histologie	Alter der Patientin bei der Gewebeentnahme	Fragment A2		Fragment B2		Allelverhältnis zwischen Normalgewebe und Tumor	Allelverlust im Tumor in %	Ergebnisse
			Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone			
276	invasiv duktal	35	16	6	16	0	0,44	56 %	partielle Methylierung in A2, keine in B2
214	?	?	16	5	16	0	0,59	41 %	partielle Methylierung in A2, keine in B2
79	?	?	16	4	16	0	0,62	38 %	partielle Methylierung in A2, keine in B2
86	invasiv duktal	51	16	0	16	0	0,52	48 %	Keine Methylierung in A2 und B2
336	?	?	16	0	16	0	0,62	38 %	Keine Methylierung in A2 und B2
183	invasiv duktal	63	16	0	16	0	0,59	41 %	Keine Methylierung in A2 und B2
301	invasive duktals	66	16	0	16	0	0,57	43 %	Keine Methylierung in A2 und B2
271	invasive duktals	51	16	?	16	0	0,55	35 %	Methylierungsmuster auffällig in A2, keine Methylierung in B2

Tabelle 3.10: Ergebnisse der Bisulfidsequenzierung des EFEMP1-Gens in 15 makrodissezierten Mammakarzinomgeweben

Als Referenzgewebe für diese 15 makrodissezierten Mammakarzinomgewebe wurden 4 mikrodissezierte Normalgewebe untersucht. Die Ergebnisse der genomischen Bisulfidsequenzierung für die Fragmente A2 und B2 und bei den 4 mikrodissezierten Referenzgeweben sind folgende:

DNA- Nummer	Alter der Patientin bei der Gewebe- entnahme	Fragment A2		Fragment B2		Ergebnisse
		Anzahl sequen- zierter Klone	Anzahl methyl- ierter Klone	Anzahl sequen- zierter Klone	Anzahl methyl- ierter Klone	
14	35	16	1	16	1	Keine Methylierung in A2 und B2
5	45	16	2	16	0	Keine Methylierung in A2 und B2
25	68	16	0	16	0	Keine Methylierung in A2 und B2
16	80	16	1	16	1	Keine Methylierung in A2 und B2

Tabelle 3.11: Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des EFEMP1-Gens in 4 mikrodisezierten Mammanormalgeweben

Zusammenfassend konnte bei den 15 makrodisezierten Mammakarzinomen bei 7 Fällen eine eindeutige Methylierung und bei 3 Fällen eine partielle Methylierung gefunden werden. Ein Tumor zeigte ein auffälliges Methylierungsmuster.

Außerdem wurde bei 4 mikrodisezierten Mammakarzinom-Tumoren und deren korespondierenden Geweben, welche kein LOH zeigten, aber bei denen eine differenzielle Expression des EFEMP1-Gens mittels Real-Time-PCR festgestellt wurde, eine Bisulfitsequenzierung in Fragment A2 und B2 durchgeführt.

Die Ergebnisse für die 4 mikrodisezierten Mammakarzinom-Tumoren sind folgende:

Tumor-DNA-Nummer	Histologie	Alter der Patientin bei der Gewebentnahme	Fragment A2		Fragment B2		Real-Time-PCR	Ergebnisse
			Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone		
2127/01	invasiv duktal	79	16	10	16	1	98 % im Tumor herunterreguliert	Methylierung in A2, keine in B2
4264/00	invasiv duktal	73	15	10	16	0	97 % im Tumor herunterreguliert	Methylierung in A2, keine in B2
15239/99	invasiv duktal	89	16	2	16	0	82 % im Tumor herunterreguliert	Keine Methylierung in A2 und B2
4276/01	invasiv duktal	53	16	0	15	0	94 % im Tumor hochreguliert	Keine Methylierung in A2 und B2

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Bisulfidsequenzierung des EFEMP1-Gens in 4 mikrodisezierten Mammakarzinomgeweben.

DNA-Nummer	Alter der Patientin bei der Gewebentnahme	Fragment A2		Ergebnisse
		Anzahl sequenzierter Klone	Anzahl methylierter Klone	
2127/01	79	16	1	keine Methylierung in A2
4264/00	73	16	0	keine Methylierung in A2
15239/99	89	16	2	keine Methylierung in A2
4276/01	53	16	0	keine Methylierung in A2

Tabelle 3.13: Ergebnisse der Bisulfidsequenzierung des EFEMP1-Gens in 4 mikrodisezierten Mammanormalgeweben.

Da bei den Tumoren nur in Fragment A2 Methylierung beobachtet wurde und von der Normalgewebe-DNA keine ausreichende Menge mehr vorhanden war, wurde das Referenzgewebe ebenfalls nur für das Fragment A2 untersucht.

Die Ergebnisse für die 4 Referenzgewebe aus Mammanormalgewebe sind der Tabelle 3.13 zu entnehmen.

Die beiden Tumoren 2127/01 und 4264/00 zeigten eine Reduktion der Expression des EFEMP1 im Vergleich zum Normalgewebe, außerdem zeigten sie auch eine klare Methylierung im Fragment A2. Der Tumor 15239/99 zeigte auch eine Reduktion der Expression des EFEMP1, aber keine Methylierung in A2. Der Tumor 4276/01 zeigte eine Erhöhung der Expression des EFEMP1-Gens im Vergleich zum Referenzgewebe und keine Methylierung des Promotors.

Zusammenfassend war in insgesamt 63 % (12/19) der Tumoren eine eindeutige Methylierung in der Region von – nt1671 am 5'-Ende des Gens (putative Promoterregion) zu erkennen. Diese beschreibt sehr wahrscheinlich die reduzierte Expression des EFEMP1 im sporadischen Mammakarzinom.

Die Bilanz der Daten, die für das EFEMP1 bis jetzt erzielt wurden, sind, dass EFEMP1 eine eindeutige Reduktion seiner Expression im sporadischen Mammakarzinom gezeigt hat. Diese Daten wurden auf RNA-Ebene mittels CPA und Affymetrix-Chips erzielt. Um diese Ergebnisse weiterhin zu überprüfen, wurden die Expressionsergebnisse mittels Real-Time-PCR in der Arbeitsgruppe von Frau. Prof. Schmutzler an insgesamt 19 Tumor-/Normalgewebe-Paaren untersucht (siehe auch Diskussion). Auch hier wurde eine eindeutige Reduktion bis zu 80 % (14/19) nachgewiesen. Es wurde eine Mutationsanalyse angeschlossen, um die mögliche Ursache für die reduzierte Expression zu analysieren. Eine Mutationsanalyse am LOH-positiven Mammakarzinom zeigte nur eine Mutationfrequenz von 20 % in den Tumoren. Daraufhin wurde eine Methylierungsanalyse angeschlossen. Die Methylierungsanalyse zeigt eindeutig eine Methylierung des EFEMP1-Gens im sporadischen Mamakarzinom. Die Methylierungsergebnisse wurden weiterhin über eine 5-Azacytidin-Behandlung (Arbeitsgruppe Frau Dr. Seitz, siehe ebenfalls Diskussion) überprüft. Es wurde an 18 verschiedenen Zelllinien, bestehend aus Brust-Epithel, Brustadenokarzinom, Ovarialkarzinom, Cervixkarzinom und Endometriumkarzinom vor und nach der Behandlung mit 5-Azacytidin die Expression des EFEMP1-Gens untersucht. Insgesamt

zeigten 56 % der Zelllinien (10/18) einen Anstieg der Expression des EFEMP1-Gens nach der 5-Azacytidin Behandlung.

Diese Methylierungsergebnisse erklären möglicherweise die reduzierte Expression des EFEMP1-Gens im sporadischen Mamakarzinom. Deshalb wurde das EFEMP1-Gen als extrazelluläres Matrix-Protein gewählt, um die Rolle bei der Entstehung von sporadischem Mamakarzinom näher zu untersuchen und seinen klinischen Verlauf und die prognostische Relevanz zu analysieren.

3.5 Prognostische Relevanz von EFEMP1

Die Bestimmung von Prognosefaktoren beim Mamakarzinom hat das Ziel, den Krankheitsverlauf für die individuelle Patientin prospektiv möglichst genau abzuschätzen.

3.5.1 Charakterisierung eines EFEMP1-spezifischen Antikörpers

Die zuvor beschriebenen Experimente gaben Aufschluss über die Expression von EFEMP1 auf RNA-Ebene und zeigten eine differenzielle Expression von EFEMP1 in Brusttumoren. Andererseits konnte gezeigt werden, dass ein epigenetischer Effekt, nämlich die Methylierung, Ursache für die Reduktion der Expression in Mamakarzinomen ist. Um die EFEMP1-Expression auf Proteinebene zu analysieren, wurden polyklonale Antikörper gegen spezifische Peptide, abgeleitet aus der humanen EFEMP1-Aminosäuresequenz, von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Die Seren aus Kaninchen wurden affinitätsgereinigt, anschließend charakterisiert und auf Spezifität getestet. Die Peptid-Antikörper detektierten im Western-Blot unspezifische Banden im serumfreien Medium (EFEMP1 ist ein extrazelluläres Protein und wurde sezerniert) von Zellen, bei denen auf RNA-Ebene das EFEMP1-Gen detektiert wurde. Freundlicherweise stellte aber Frau Dr. Sasaki vom MPI einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen ein rekombinantes Maus-Efemp1-Protein zur Verfügung. Die Homologie zwischen dem humanen EFEMP1-Protein und Maus-Efemp1-Protein beträgt 94% (siehe Abb. 3.9).

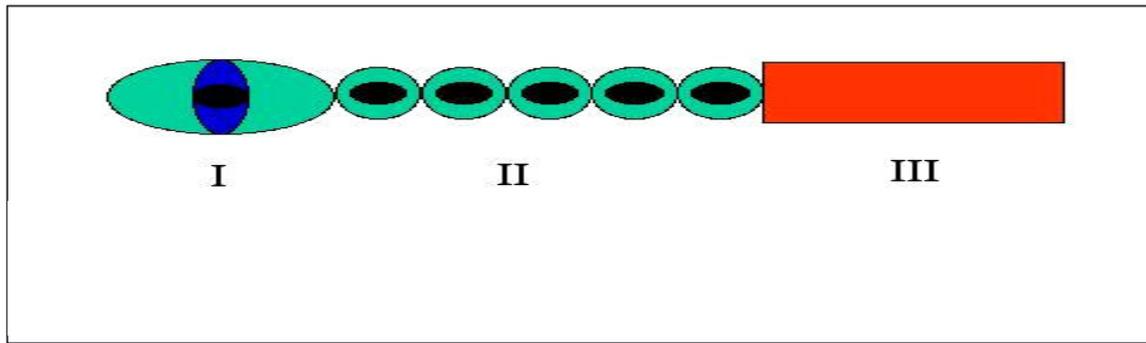


Abb.3.9: A: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des EFEMP1-Proteins. Es besteht aus 3 verschiedenen Domänen. Domäne III beinhaltet das carboxyterminale Ende. Domäne II besteht aus 5 „epidermal growth factor (EGF)“-ähnlichen Modulen, die aus Cystein-Resten zusammengesetzt sind, die wiederum über Disulfidbrücken stabilisiert werden und Calcium-Ionen binden (cbEGF). Domäne I ist eine modifizierte Form von cbEGF und beinhaltet das aminoternale Ende (verändert nach Timpl et al.,2003). B: Darstellung der Homologie zwischen EFEMP1 (Human) und Efemp1 (Maus). Die blauen Balken zeigen schematisch den Bereich der Proteinsequenz, die zwischen EFEMP1 und Efemp1 identisch ist. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, sind EFEMP1 und Efemp1 in 94% ihrer Aminosäuresequenz identisch.

Um den rekombinanten Maus-Antikörper zu charakterisieren und seine Spezifität zu testen, wurde ein Western-Blot angefertigt. Im Western-Blot wurden nach Möglichkeit serumfreie Zellüberstände von MCF7 (Brustadenokarzinom), SiHa (Endometriumkarzinom) und transfizierten EBNA 239-Zellen mit EFEMP1- und Efemp1 cDNA eingesetzt. Die MCF7-Zelllinie zeigt auf RNA-Ebene (mittels quantitativer RT-PCR getestet) keine Expression und diente als Negativkontrolle. Die SiHa-Zelllinie exprimiert sehr stark EFEMP1 und wird als Positivkontrolle eingesetzt. Als Kontrolle für die Proteingröße dient die transfizierten Zelle EBNA 239 mit der

EFEMP1-cDNA. Als Kontrolle wurde auch die transfizierten EBNA 239 mit der Efemp1-cDNA eingesetzt.

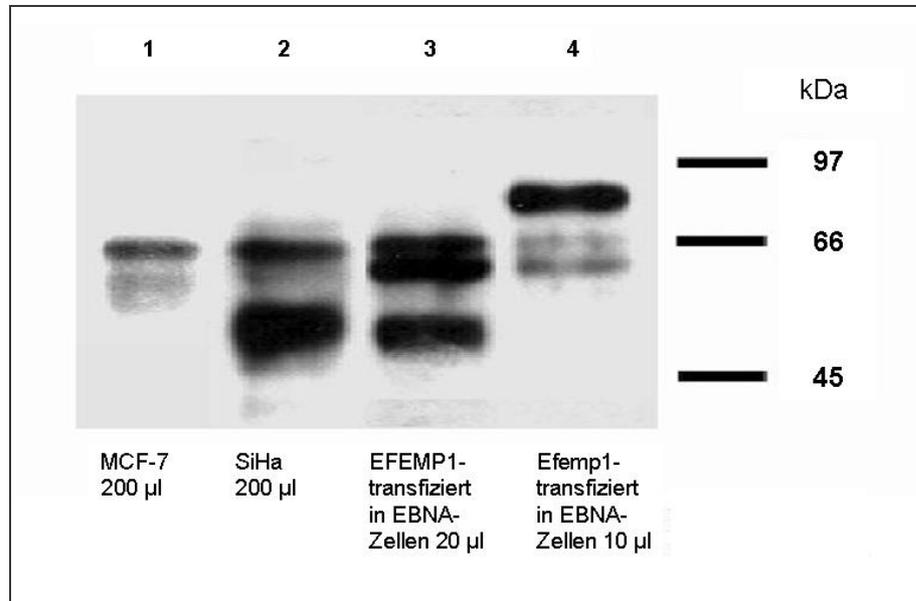


Abb. 3.10: Charakterisierung des Anti-Efemp1-Antikörpers auf serumfreien Zellüberständen mittels Western-Blot, (1) Negativkontrolle, (2) Positivkontrolle, (3) humane EFEMP1-cDNA transfizierte in EBNA-Zellen als Kontrolle für die Proteingröße, (4) Murine Efemp1- cDNA transfizierte in EBNA-Zellen als Zusatzkontrolle.

Das Protein EFEMP1 zeigt die erwartete Größe von ca. 58 kDa. Wie aus der Abbildung 3.10 zu entnehmen ist, zeigt die Negativkontrolle (1) kein Fragment der erwarteten Größe. Die Positivkontrolle und die transfizierte humane Zelllinie (2+3) zeigen bei ca. 58 kDa eine sehr klare Bande. Die Bande, die bei den transfizierten EBNA-Zellen mit EFEMP1-cDNA im Vergleich zu SiHa-Zellen noch zusätzlich erscheint, kann ein Produkt von proteolytischem Verdau sein oder an der unterschiedlichen Glycosylierung der SiHa und der EBNA 293-Zellen liegen. Diese Zusatz-Bande ist auch bei den transfizierten EBNA-Zellen mit Efemp1-cDNA zu beobachten. Außerdem ist bei 66 kDa bei allen Proben eine Bande zu erkennen, die eine Kreuzreaktion mit FCS darstellt. Trotz mehrmaligen Waschens mit PBS war das FCS aus den Zellüberständen nicht komplett zu entfernen.

3.5.2 Lokalisierung von EFEMP1 in Brustgewebe

Die Lokalisierung von EFEMP1 in Brustgewebe wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen untersucht. In Abb. 3.11 ist eine typische EFEMP1-Färbung von Brustnormalgewebe in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt. Die extrazelluläre Matrix (ECM) um die Milchgänge (zentral und peripher) sowie die terminalen duktulo-lobulären Einheiten (TDLE) ist stark gefärbt. Es ist aber auch eine schwächere Färbung der Myoepithelschicht sowie des sekretorischen Epithels nachzuweisen, wobei neben einer Kernfärbung auch eine Cytoplasma-Färbung zu sehen ist. Diese Verteilung der Färbung der duktaalen bzw. lobulären Epithelien war variabel ausgeprägt. Weiterhin ist eine schwächer kernständige Färbung der Milchgang-Epithelien zu beobachten.

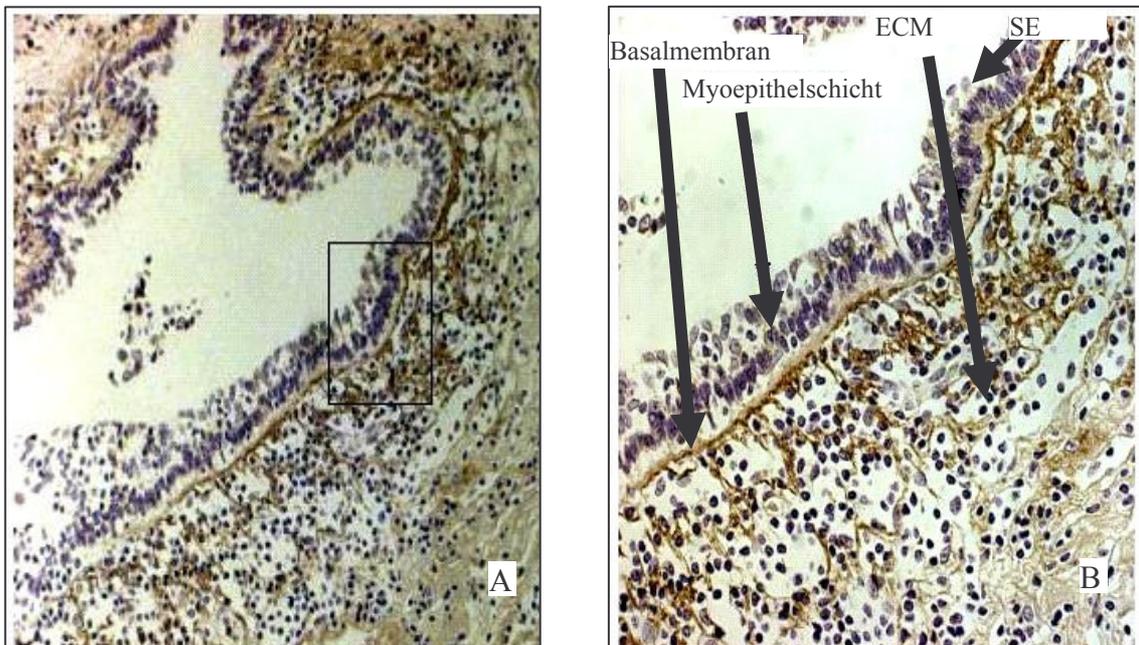


Abb. 3.11: Lokalisierung von EFEMP1 in Brustnormalgewebe. Immunhistochemische Färbung mit dem Efemp1-Antikörper. A: Normaler Duktus mit umgebendem Bindegewebe. Vergrößerung 100x. B: Ausschnitt aus A, doppelschichtiges Epithel und ECM im angrenzenden Bindegewebe, Vergrößerung 300x, ECM: Extrazelluläre Matrix, SE: Sekretorisches Epithel.

Um die Kolokalisation des EFEMP1 im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der Fibulin-Familie (extrazelluläre Matrix-Proteine), zu denen auch EFEMP1 (Fibulin-3) gehört, festzustellen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung am Brustnormalgewebe durchgeführt. Die Immunfluoreszenz erlaubt die gleichzeitige Färbung mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern, deren Nachweis mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern erfolgt. Die anschließende Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale erlaubt eine Aussage über die Kolokalisation.

Die Ergebnisse für die Kolokalisation des EFEMP1, verglichen mit den Mitgliedern der Fibulin-Familie sind in der Abbildung 3.12 und 3.13 dargestellt. Als Marker für die Färbung der elastischen Fasern wurde das humane Fibulin-1 gewählt. Wie aus der Abbildung 3.12 zu entnehmen ist, färbt Fibulin-1 hauptsächlich die elastischen Fasern der extrazellulären Matrix. Eine Duktus- und Lobulusfärbung der Brustnormalgewebe ist hier nicht zu beobachten.

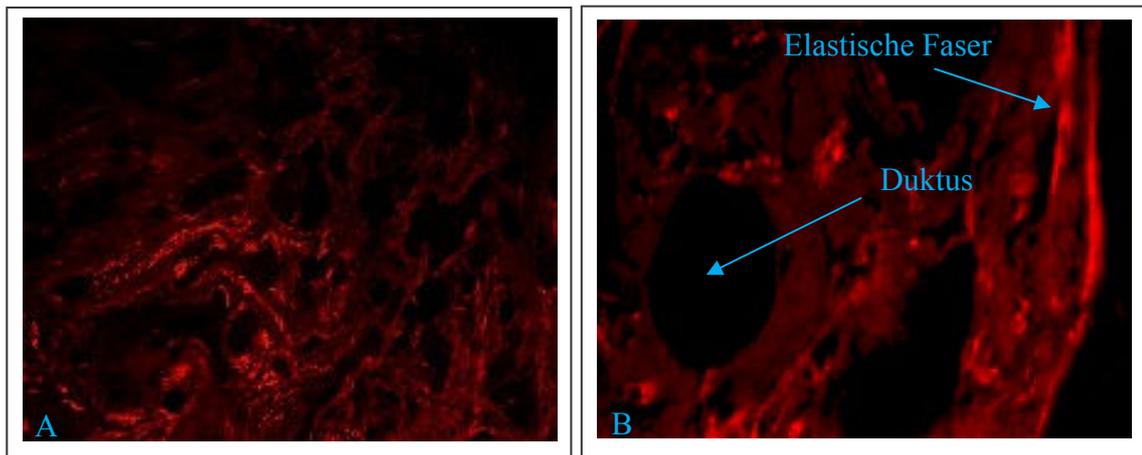


Abb. 3.12: Lokalisierung des humanen Fibulin-1 in Brustnormalgewebe. Die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte mit einem Kaninchen-Primärantikörper gegen das humane Fibulin-1, der Sekundärantikörper ist CY3-markiert A: Normales Brustgewebe mit umgebendem Bindegewebe. Vergrößerung 100x. B: Ausschnitt aus A, ein rot leuchtendes Signal ist in den elastischen Fasern zu sehen. Vergrößerung 1200x.

Zur Charakterisierung des Bindegewebes wurde Fibulin-5 als Marker für die Färbung der Endothelzellen der großen Arterien und der elastischen Lamina in der Nähe der Endothelzellen der extrazellulären Matrix verwendet (siehe Abb. 3.13 A). Die Abbildung 3.13 B zeigt eine eindeutige Expression des EFEMP1 in Duktus (und Lobulus, hier nicht abgebildet) des Brustnormalgewebes. Die Überlagerung mit der Fibulin-5-Färbung zeigt deutlich, dass Fibulin-5 und EFEMP1-Färbung sich abgrenzen. Die EFEMP1-Färbung ist eindeutig in Duktus und Lobulus des Brustnormalgewebes und in der extrazellulären Matrix im Bereich der Myoepithelzellen zu sehen, während Fibulin-5 das Bindegewebe färbt. (siehe Abb. 3.13.C).

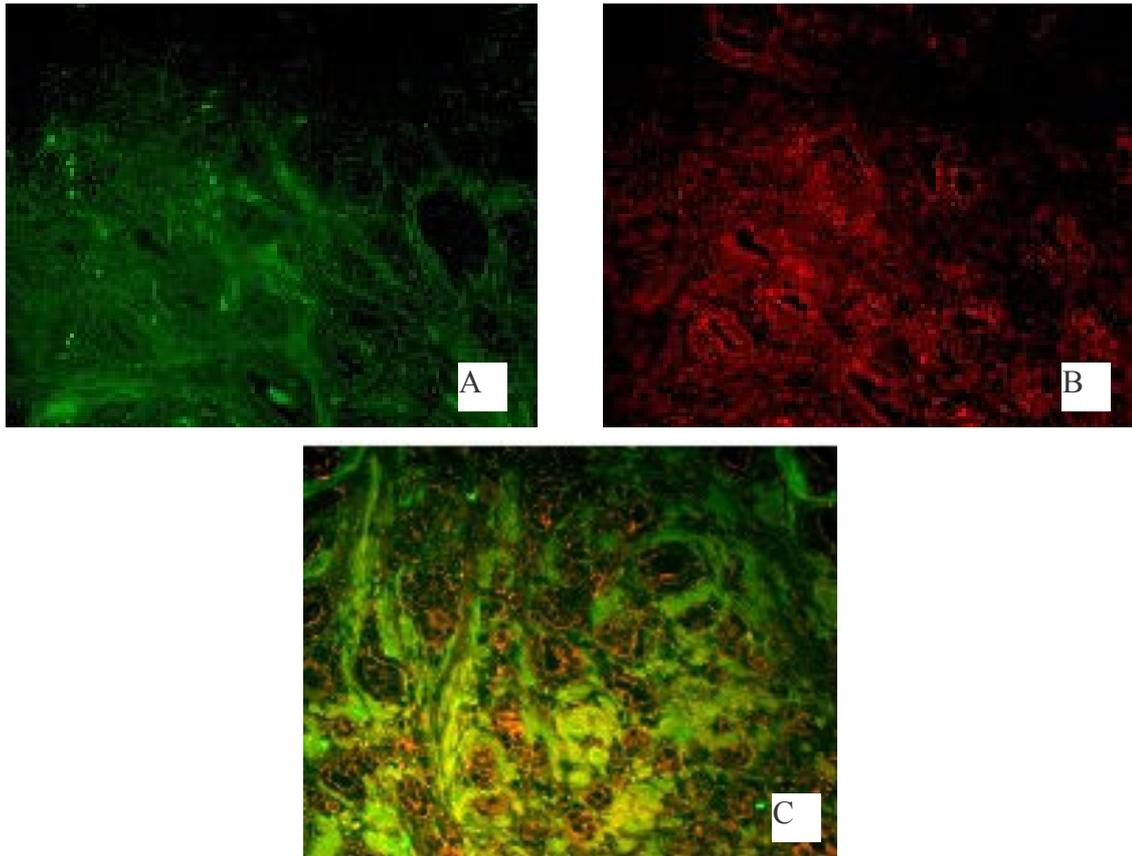


Abb. 3.13: Kolokalisierung von EFEMP1 und Fibulin-5 im Brustnormalgewebe. A: Immunfluoreszenzfärbung mit Fibulin-5. B: Immunfluoreszenzfärbung mit Efemp1-Antikörper. C: Überlagerung der Färbungen (grün= Fibulin-5, rot= EFEMP1)

EFEMP1 ist im normalen Brustgewebe folglich hauptsächlich in der extrazellulären Matrix vorhanden. Aus dem Expressionsmuster ist zu schliessen, dass EFEMP1 von den Epithelzellen gebildet und danach in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird. Um dies nachzuweisen, wurde eine immunhistochemische Färbung von Zellen (MCF7 und SiHa) angefertigt. Dabei zeigte sich, dass SiHa-Zelllinien, die im Western-Blot ein positives Signal zeigten (Zellüberstände), in der Immunhistochemie (Zellextrakte) eine schwache Färbung aufwiesen, d.h. der größte Anteil des EFEMP1-Protein wird in die extrazelluläre Matrix abgegeben. Als Positivkontrolle für die Färbung wurde Lungengewebe verwendet (siehe Abb. 3.14).

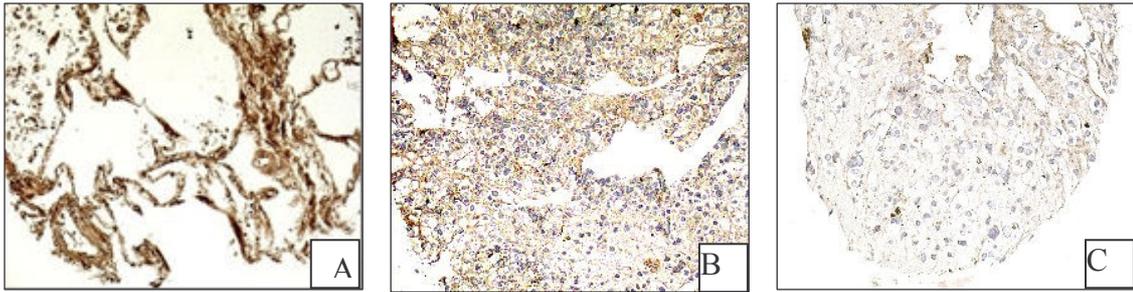


Abb. 3.14: Immunhistochemische Färbung von EFEMP1 in Zellen (Zellextrakte). Färbung mit dem Efemp1-Antikörper. A: Lungengewebe als Positivkontrolle. Die immunhistochemische Färbung zeigt ein stark positives Signal. B: SiHa-Zelllinien, die im Western-Blot (Zellüberstände) ein positives Signal zeigten, sind in der immunhistochemischen Färbung (Zellextrakte) schwach gefärbt. C: MCF7-Zelllinien die im Western-Blot (Zellüberstände) ein negatives Signal zeigten, sind in der immunhistochemischen Färbung (Zellextrakte) nicht gefärbt. Vergrößerung 100 x.

3.5.3 Korrelation von EFEMP1-Expression mit klinischen Parametern

Mit Hilfe des Efemp1-Antikörpers wurde zunächst die Expression von EFEMP1 in Mammakarzinom an einer Serie von 8 Mammatumoren untersucht (Paraffinmaterial zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München). EFEMP1 war besonders stark in der extrazellulären Matrix der normalen Epithelzellen der Brust exprimiert (siehe Abb.3.15. A). Die Färbung im Epithel war kernständig, und in einigen Fällen war eine Konzentration im apikalen Bereich der Epithelzellen erkennbar. In allen 8 Fällen war Normal- und Tumorgewebe einer Patientin vorhanden. Diese Fälle wurden zur Beurteilung der differentiellen Expression verwendet. Ein Verlust bzw. eine reduzierte Expression wurde in 62,5 % (5/8) der Mammatumoren im Vergleich zum Referenz-Normalgewebe beobachtet. Die Tumorzellen zeigten eine schwache oder gar keine Färbung (siehe Abb. 3.15. B), das tumoreigene (sogenannte desmoplastische) Stroma war in der Mehrzahl der Fälle negativ. (siehe Abb. 3.15 C).

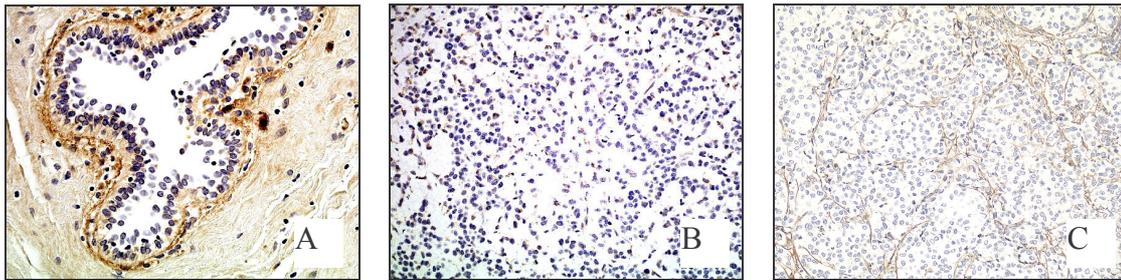


Abb. 3.15: IHC-Färbungsmuster von EFEMP1 in normalem und malignem Brustgewebe. A: In normalem Brustgewebe (hier TDLU) war eine starke EFEMP1-Expression in der extrazellulären Matrix und im apikalen Bereich der Epithelzelle zu beobachten. B: Tumorzellen eines invasiv duktales Karzinoms zeigten schwache oder keine EFEMP1-Expression. C: Das desmoplastische Stroma ist sehr schwach gefärbt. Messbalken: 50 μ m

Um die Signifikanz von EFEMP1 als prognostischen Marker in Brustkarzinomen in einem größeren Tumorkollektiv zu untersuchen, wurde die EFEMP1-Expression auf einem „tissue microarray“ (TMA) analysiert. Die Arrays bestanden aus 215 gut charakterisierten Brusttumor-Proben des Pathologischen Institutes der TUM. Die Färbung wurde nach dem „immunoreactivity score (IRS)“ beurteilt, der auch für die Beurteilung des Hormonrezeptor-Status in Brusttumoren eingesetzt wird und einer semiquantitativen Abschätzung der Immunhistochemischen Färbung dient (Rommel und Stegner, 1987). Der resultierende Wert (Score) besteht aus dem Produkt aus Intensität der Färbung (SI-Werte: 0-1-2-3) und dem Anteil der positiven Zellen in Prozent (PP-Werte: 0: negativ, 1: < 10 %, 2: 10 – 50 %, 3 > 50%). Der Scorewert SI X PP kann demnach zwischen 0 und 9 Punkten betragen. In dieser Arbeit wurden von jedem Tumor drei Bereiche (2 peripher und 1 zentral) gewählt, und es wurde ein Mittelwert aus dem Score einzelner Bereiche gebildet. Es ist aus Publikationen bekannt, dass bei der Untersuchung von Tumoren mittel TMA eine Mindestzahl von Entnahmestellen für die Repräsentativität benötigt wird (Kononen et al., 1998). Aus diesem Grund haben wir in einem Pilotversuch 15 Tumore aus dem untersuchten Kollektiv an gesamten Tumorschnitten untersucht, um die Frage der Homogenität oder Heterogenität bezüglich der EFEMP1-Expression auf Proteinebene zu beantworten. Da sich dabei eine homogene Verteilung der Expression zeigte, konnten wir davon ausgehen, dass die IHC-Untersuchung der EFEMP1-Expression an TMA repräsentativ möglich ist. Es wurden folgende Gruppen definiert und verglichen: EFEMP1-negative Tumoren (IRS 0-1) und EFEMP1-positive Tumoren (schwache Expression IRS 2-4, moderate/starke Expression IRS 6-9). Ein IRS von 0-1 bedeutet keine Färbereaktion oder eine schwache Färbereaktion in weniger als 10 % der Zellen (siehe Abb. 3.16).

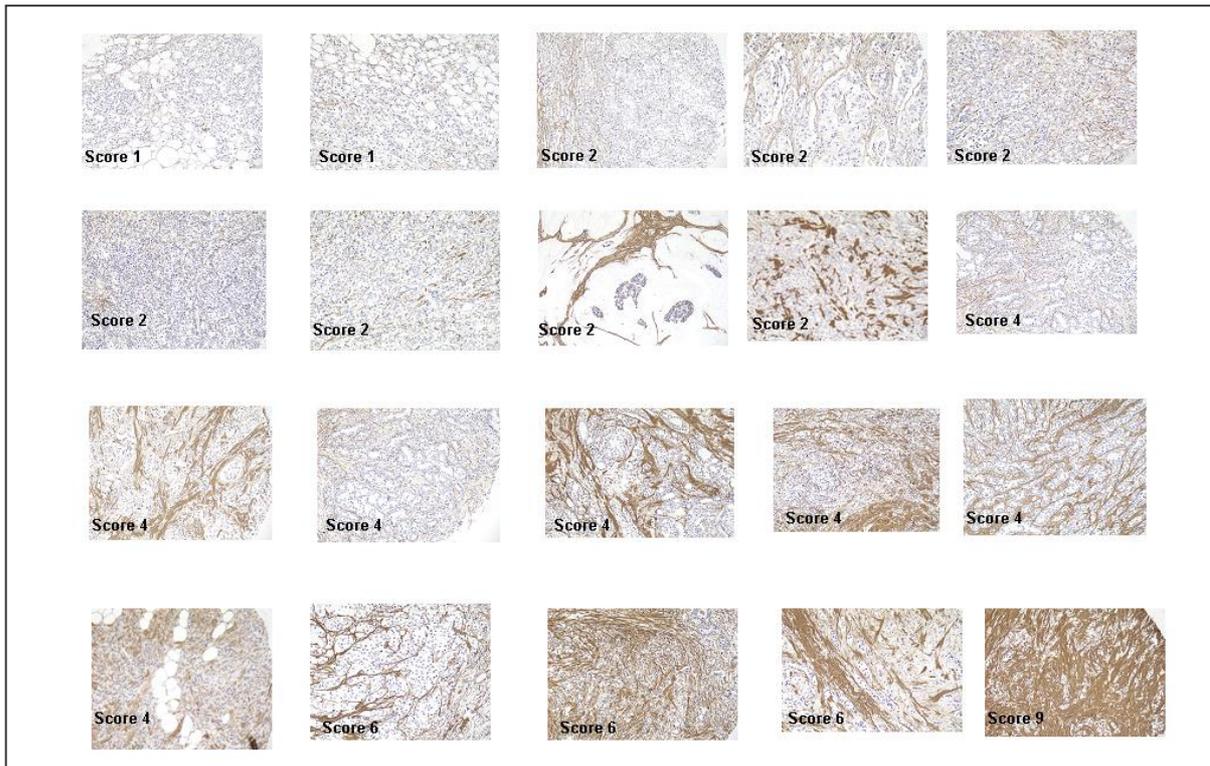


Abb. 3.16: TMA-Färbungsmuster von EFEMP1 in malignem Brustgewebe. Die Abbildung zeigt die Färbereaktionen des EFEMP1 in invasiven Mammakarzinomen des TMA's mit dem entsprechenden semiquantitativen immunoreaktiven Scorewerten.

Bei der Auswertung des prognostischen TMAs wurde für 8,8 % der invasiven Brustkarzinome eine starke EFEMP1-Expression (IRS 6-9), in 34 % der Tumoren eine moderate Expression ermittelt, während eine schwache Expression (IRS 2-4) oder ein Verlust der Expression (IRS 0-1) in 56 % der Fälle beobachtet wurde.

Mit Hilfe der univariaten Regressionsanalyse wurde die Beziehung zwischen EFEMP1-Expression und klinischen Parametern wie Tumorgröße (pT), Tumorgrad (G), Lymphknotenstatus (pN), Rezeptorstatus (Negativ oder Positiv), HER-2-neu-Status untersucht.

Es ist eine Tendenz zwischen der EFEMP1-Expression mit dem Tumorgrad und dem HER-2 neu-Status zu erkennen. Zwischen den übrigen klinischen Parametern war keine statistische signifikante Korrelation erkennbar. Die Abb. 3.17 zeigt den Zusammenhang zwischen Tumorgrad / HER-2-neu-Status und EFEMP1-Expression.

Bei dieser vergleichenden Analyse konnte eine Beziehung zwischen der EFEMP1-Proteinexpression und dem Tumorgrad sowie dem HER-2-neu-Status gezeigt werden. So zeigen Tumore mit einer niedrigen Graduierung (G1/G2) relativ höhere Expression-Scores, umgekehrt zeigen Tumoren mit einer hohen Graduierung (G3), niedrigere Expression-Scores (siehe Abb. 3.17 A). Für den HER-2-neu-Status ergab sich ein gleichartiges Verhalten. Tumoren mit hoher HER-2-neu-Amplifikation zeigen niedrigere EFEMP1- Expression-Scores, und Tumoren mit niedriger HER-2-neu-Amplifikation zeigen höhere Expression-Scores (siehe Abb. 3.17 B).

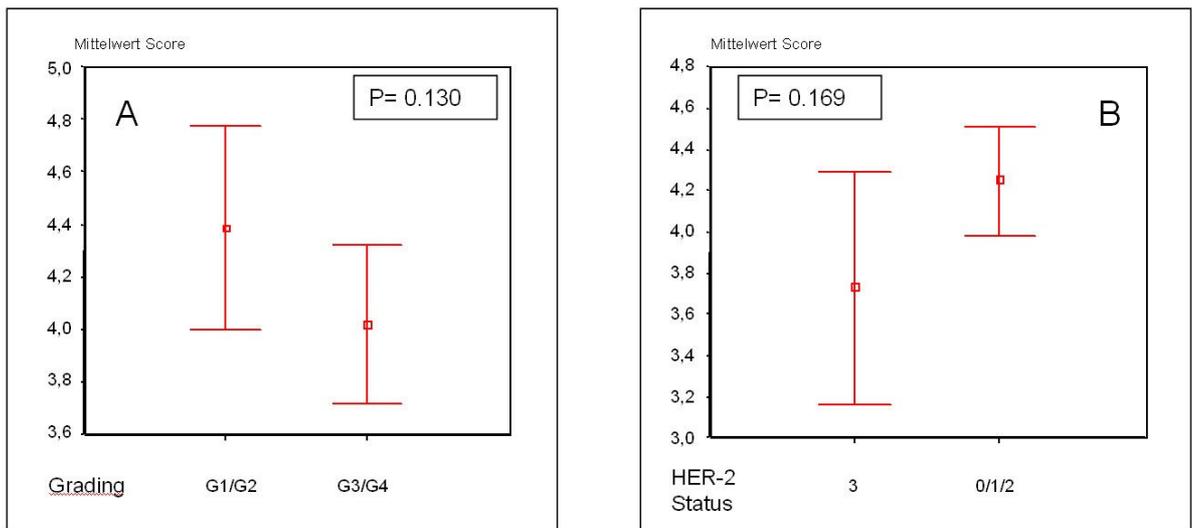


Abb. 3.17: A: Tendenz zwischen EFEMP1-Expression und Tumorgrad (Grading). G1/G2 sind gut bzw. mäßig differenzierte Tumoren, G3/G4 sind schlecht und nicht differenzierte Tumoren ($p=0,130$). B: Tendenz zwischen HER-2-neu-Status und EFEMP1-Expression. 0/1/2 sind Tumoren, die in der IHC eine schwache bis negative HER-2-neu-Expression zeigen. 3 sind Tumoren, die in der IHC für HER-2-Status eine stark positive Reaktion zeigen ($P=0,169$).

Für alle 215 Patienten, deren Tumoren untersucht wurden, standen neben den klinischen Parametern Überlebensdaten mit langen Beobachtungszeiten zur Verfügung, so dass es möglich war, auch statistische Analysen mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode durchzuführen.

Die multivariate Regressionsanalyse ergab zwischen der Überlebensrate und der Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Therapie eine Korrelation.

Patientinnen, bei denen in größerer Ausdehnung ein Tumor von einer Größe von 2 cm oder weniger diagnostiziert wurde, zeigten eine höhere Überlebensrate als Patientinnen, bei denen ein Tumor, der größer als 2 cm war, diagnostiziert wurde ($p = 0,0034$). Patientinnen, bei denen keine befallenen Lymphknoten diagnostiziert wurden ($p =$

0,001) und die eine Chemotherapie erhielten ($p = 0,0345$), hatten eine längere Überlebensrate als ihre Referenz-Gruppe.

Es war eine deutliche Tendenz zwischen der EFEMP1-Expression und der gesamten Überlebensrate zu erkennen. Der Verlust der EFEMP1-Expression (Score $< 3,5$) zeigt die Tendenz zu einer kürzeren Überlebensrate ($p = 0,1632$) (siehe Abb. 3.18A).

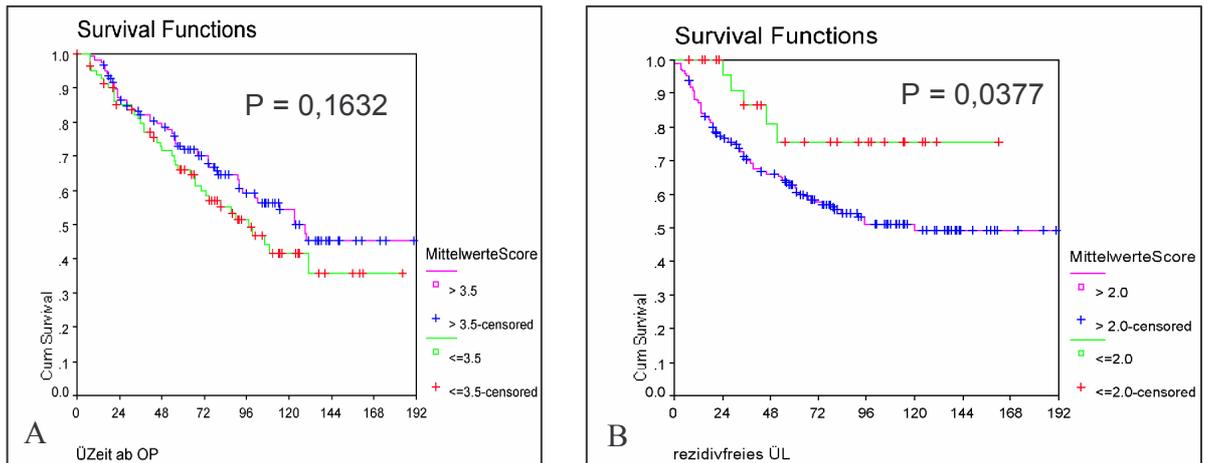


Abb. 3.18: A: Tendenz von EFEMP1-Expression und tumorspezifischem Überleben (Kaplan-Meier-Kurven). Die Tumoren, die einen Score von $>3,5$ zeigen, sind durch blau/violette Kurven angezeigt. Die Tumoren, welche einen Score $\leq 3,5$ zeigen, sind durch rot/grüne Kurven angezeigt ($P = 0,1632$). B: Korrelation von EFEMP1-Expression und rezidivfreiem Überleben (Kaplan-Meier-Kurven). Die Tumoren, die einen Score von >2 zeigen, sind durch blau/violette Kurven gekennzeichnet. Die Tumoren, die einen Score von ≥ 2 zeigen, sind durch rot/grüne Kurven markiert. Die Korrelation ist mit einem Wert von $p = 0,0377$ statistisch signifikant.

Bei der rezidivfreien multivariaten Regressionsanalyse war eine eindeutige Assoziation zur Tumorgöße und Lymphknoten-Status zu sehen. Patientinnen mit einem kleinen Tumor ($p = 0,0050$) und negativen Lymphknoten ($p = 0,0003$) zeigten ein längeres rezidivfreies Überleben.

Es war eine Tendenz zwischen rezidivfreiem Überleben, Tumorgrad ($p = 0,0898$) und HER-2-neu-Status ($p = 0,1442$) zu sehen.

Schlecht differenzierte Tumoren und Tumoren, die eine stark positive HER-2-neu-Reaktion zeigten, hatten ein kürzeres rezidivfreies Überleben.

Im Zusammenhang mit der EFEMP1-Expression zeigten Patientinnen, bei denen eine moderate bis starke Expression (Score > 2) vorhanden war, ein längeres rezidivfreies Überleben. Die Korrelation von EFEMP1-Expression und rezidivfreiem Überleben war

statistisch signifikant. Die Prognose-Relevanz von EFEMP1 war mit einem Wert von $p = 0,0377$ eindeutig (siehe Abb. 3.18 B).

4. Diskussion

4.1 Allgemeins

Mittlerweile ist die These akzeptiert, dass die Tumorgenese die schrittweise Anhäufung von genetischen Veränderungen beinhaltet, welche die relative Balance verschiedener biologischer Prozesse beeinflusst. Begleitet wird die Tumorprogression durch Veränderungen in der Genexpression. Eines der Ziele des Konsortiumsprojekts war auch die Identifizierung und Validierung von neuen Genen, die an der Entstehung sporadischer Formen des Brust-, Ovarial-, und Endometriumkarzinoms beteiligt sind. Die wichtigsten Ziele des Gesamtprojekts waren die Identifizierung und Charakterisierung neuer Tumorsuppressor- und Onkogene sowie die Beschreibung der Funktion dieser Gene und deren Rolle bei der Karzinogenese. Außerdem sollten neue karzinomspezifische Markergene für diagnostische Anwendungen identifiziert werden. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren folgende: Nach der Nominierung von Kandidatengenen sollte eine Bestätigung ihrer differentiellen Expression in Tumorgegenüber Normalgewebe stattfinden. Dies wurde durch die Hybridisierung von Cancer Profiling Arrays (CPA)-Filter der Firma Clontech und Affymetrix-Microarrays erreicht. Die Bestätigung der Ergebnisse erfolgte teilweise mittels Durchführung von Echtzeit-PCRs. Durch die LOH-, Mutations- und epigenetischen Analysen wurden Ursachen der differentiellen Expression an ausgewählten Kandidatengenen überprüft. Nachdem die Ursache dieser differentiellen Expression untersucht worden war, sollten anhand nominierten Kandidatengene der klinische Verlauf und die prognostische Relevanz der Markergene untersucht werden.

Mit den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Dissertation erzielt wurden, und in Anbetracht dessen, dass der Basalmembran eine besonders wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Tumoren zugeteilt wird und die Basalmembran eine hochspezifische Ausprägung der extracellulären Matrix (ECM) ist, wurde die Rolle eines ECM-Proteins im sporadischen Mammakarzinom näher untersucht. Mit anschließender Immunfluoreszenz und immunhistochemischen Untersuchungen konnte ein Einblick in die prognostische Bedeutung eines extrazellulären Matrix-Proteins im Mammakarzinom gewonnen werden.

4.2 Validierung der Expression putativer Tumorsuppressor- und Onkogene

Die Datenbankanalysen zur Genexpression von gynäkologischen Karzinomen wurden in der Firma meta Gen (Berlin) durchgeführt. Unter Verwendung hauseigener Software wurden vier Millionen ESTs und EST-Cluster, die in öffentlichen (db EST, UNIGENE, TIGR, THC) und kommerziellen (incyte LIFESEQ) Datenbanken verfügbar sind, „in silico“ analysiert, im Folgenden als „in silico“-Analyse zitiert. Diese Daten waren Bezugspunkte zur Überprüfung eigener Daten. Es wurden mehr als 600 Gene identifiziert, deren Expression im Brust-, Ovarial- und Endometriumkarzinom deutlich von der Expression im entsprechenden Normalgewebe abweicht. Mit Hilfe des „Radiation Hybrid Mapping“ wurde die chromosomale Lokalisation von mehr als 400 dieser Gene bestimmt. Weiterhin wurde eine Untergruppe von 195 Genen identifiziert, welche in chromosomalen Regionen liegen, die ein beträchtliches Maß an DNA-Verlusten und –Zunahmen in gynäkologischen Karzinomen aufweisen. Schließlich wurden 40 Gene identifiziert, die in Form von Genclustern auftreten, aber in chromosomalen Regionen liegen, die bisher nicht mit der Entstehung gynäkologischer Karzinome in Zusammenhang gebracht wurden. Aus dieser Gruppe von 235 Genen hat das Konsortium 40 Gene ausgewählt, die nach dem bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisstand für eine nähere Betrachtung sehr aussichtsreich sind.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden davon 12 putative Tumorsuppressorgene (München: DPT, EFEMP1, EPLIN, Hypothetical protein DKFZP761F214, PTP1c/HCP, PLCG1, human orthologue of mouse fsp-27 (Schwarz in Tabelle 4.1), Gastgene: CRYAB, RAB5C, IGFBP4, PTRF (Rot in Tabelle 4.1), CAV-1 (Blau in Tabelle 4.1)) und 6 putative Onkogene (München: SLPI, CSE1L/CAS, WFDC2, ILK, MRP14 (Schwarz in Tabelle 4.1), Gastgen: CAPG (Rot in Tabelle 4.1)) zur Bestätigung ihrer differentiellen Expression in Tumor- und Normalgewebe der Mamma und des Ovars untersucht.

Die Expressionsdaten für alle 18 Gene die mittels CPA, Affymetrix-Microarrays und Echtzeit-PCR erzielt worden sind, sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Gen-Symbol	CPA-Daten		Affymetrix-Daten					Echtzeit – PCR-Daten für Brusttumoren
	Expression in Mammakarzinom n = 50	Expression in Ovarialkarzinom n = 14	makrodissezierte Mammakarzinome	mikrodissezierte Mammakarzinome	Hirnmetastasen	Kleinhirn- und Knochenmetastase	Ovarialkarzinom	
DPT	↓	↓	↓	≈	↓	≈	↓	↓
EFEMP1	↓	↓	↓	≈	↓	≈	↓	↓
EPLIN	↓	↓	≈	≈	↓	≈	↓	↓
SLPI	↓	↑	↓	↓	≈	↓	↑	↓
Hypothetical protein DKFZP761F214	Keine Auswertung möglich	↓	/	/	/	/	/	↓
CSE1L/CAS	↑	↑	↑	↑	↑	≈	↑	/
WFDC2	≈	↑	↓	↓	↑	↓	↑	/
ILK	≈	↑	/	/	/	/	/	/
PTP1c/HCP	≈	≈	/	/	/	/	/	40%↑, 40% ↓
PLCG1	≈	≈	/	/	/	/	/	/
Human orthologue of mouse fsp-27	≈	≈	/	/	/	/	/	/
MRP14	≈	≈	/	/	/	/	/	/
CRYAB	↓	↓	↓	↓	≈	↓	↓	/
RAB5C	≈	↓	/	/	/	/	/	/
CAP G	↑	↑	↑	≈	≈	↑	≈	/
IGFBP4	↓	↓	/	/	/	/	/	/
PTRF	≈	≈	/	/	/	/	/	/
CAV-1	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	/

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Expressionsdaten. Schwarz sind die Gene die der Münchner Gruppe zugeteilt worden. Rot die Gastgene aus Düsseldorf, und Blau das Gastgen aus Bonn.

↓: Herunterregulation der Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe.

↑: Hochregulation der Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe.

≈: Keine Differenzielle Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe.

/: Keine Expressionsdaten vorhanden.

CPA-Daten:

Mittels der CPA-Arrays der Firma Clontech wurden 18 Gene untersucht, von diesen zeigten 13 Gene eine differenzielle Expression.

Die Gene, die eine Herunterregulation ihrer Expression in Mammatumoren zeigten, waren folgende: DPT, EFEMP1, EPLIN, CRYAB, ICFBP4, CAV-1 und SLP1.

Die Gene, die eine Herunterregulation ihrer Expression in Ovarialtumoren zeigten, waren folgende: DPT, EFEMP1, EPLIN, CRYAB, ICFBP4, CAV-1, RAB5C und Hypothetical Protein DKFZP761F214.

Die Gene, die eine Hochregulation ihrer Expression in Mammatumoren zeigten, waren folgende: CSE1L und CAPG.

Die Gene, die eine Hochregulation ihrer Expression in Ovarialtumoren zeigten, waren folgende: SEL1L, CAPG, SLP1, WEDC2 und ILK.

Die Gene, die keine differenzielle Expression in Mamma- und Ovarialtumoren zeigten, waren folgende: PTP1c, PLCG1, fsp-27, PTRF und MRP-14.

Beim Vergleich der „in silico“-Daten, die als Ausgangspunkt für diese Arbeit gelten, mit den CPA-Daten war eine ca. 80%ige Übereinstimmung der Daten in Bezug auf die Genanalysen zu beobachten. Von den 18 analysierten Genen waren 12 als putative Tumorsuppressorgene zugeordnet, von diesen 12 Genen zeigten 9 Gene eine Herunterregulierung der Expression zwischen 28 % und 94 % in Mamma- und/oder Ovarialtumoren. Drei putative Tumorsuppressorgene zeigten keine Veränderung ihrer Expression in Mamma- und/oder Ovarialtumoren. Insgesamt wurden 6 Gene als putative Onkogene klassifiziert, davon zeigten 5 eine Hochregulation der Expression in 22 % bis 64 % in Mamma- und/oder Ovarialtumoren. Ein putatives Onkogen zeigte keine Veränderung seiner Expression in Mamma- und/oder Ovarialtumoren (siehe Tabelle 3.1).

Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass die CPA-Filter eine schnelle Möglichkeit boten, die „in silico“-Daten für Brust- und Ovarialtumoren zu validieren.

Affymetrix-Chips:

Um die Expressionsanalyse in eigenen Proben zu analysieren, wurde eine Microarray-Analyse mit den Affymetrix-Chips zusätzlich mit makro- und mikrodissezierten Proben durchgeführt. Die mikrodissezierten Proben bestanden aus einer reinen Population von Epithelzellen bzw. Tumorzellen, d.h. sie enthielten zu 90 % reine Epithel- bzw. Tumorzellen ohne Bindegewebe- oder Gefäßanteile.

Die Problematik der statistischen Analyse dieser Microarray-Daten besteht darin, dass die Anzahl n der untersuchten Proben (Zelllinien, Patientenproben) klein ist. Dem gegenüber steht die sehr große Anzahl p der in einem Ansatz untersuchten Parameter (Gene). In der Literatur wird vom „large p , small n “-Problem gesprochen. Es werden über dieses Problem zurzeit viele Artikel mit Ergebnissen aus Genexpressionsanalysen veröffentlicht. Die Zahl der Arbeiten, die sich gezielt mit den Möglichkeiten zur Auswertung befassen, ist allerdings vergleichsweise gering (Ben-Dor et al., 2000; Ben-Dor et al., 2001; Brazma et al., 2001; Thomas et al., 2001).

Der erste Schritt, um die Fülle an Daten überblicken und bearbeiten zu können, besteht in der Eliminierung von nichtinformativen Datensätzen. Ein Ansatz, um nichtinformativ Datensätze herauszufiltern, besteht im Vergleich der Parameter „Signaldetektion“, „Detektion der Genexpressionsveränderung“ und „Stärke der Genexpressionsveränderung“. Da alle 3 Parameter mit unterschiedlichen Algorithmen berechnet wurden, war eine Übereinstimmung ihrer Aussagen ein starker Hinweis auf die Zuverlässigkeit. Wurden von den 3 Parametern widersprüchliche Aussagen geliefert, so war der Datensatz nichtinformativ. Für die Parameter Signaldetektion und Detektion der Genexpressionsveränderung läge beispielsweise ein Widerspruch vor, wenn das Transkript in Normal- und Tumor-Array als A (Absent), aber gleichzeitig eine Genexpressionsveränderung (Increase oder Decrease) detektiert worden wäre. Da gezeigt wurde, dass die Affymetrix-Microarrays in 98% der Fälle eine Genexpressionsveränderung um den Faktor ≥ 2 identifizieren können (Wodicka et al., 1997), wäre eine detektierte Genexpressionsveränderung mit einer „Signal Log Ratio“ kleiner als 1 bzw. -1 wiederum ein Widerspruch und damit nichtinformativ. Aufgrund der relativ zahlreichen Replikate in den durchgeführten Versuchen ist es entsprechend den Empfehlungen von Affymetrix ausreichend, wenn für zuverlässige und informative Daten in einem Teil der Replikate die Aussagen von nur 2 der 3 Parameter

übereinstimmen. In der vorliegenden Dissertation wurde von dieser Empfehlung Gebrauch gemacht.

Von den nominierten Kandidatengen beinhaltenen die Affymetrix-Chips 11 Gene. Die Microarraysanalyse wurde in 9 Genen in zwei verschiedenen Ansätzen (siehe 3.1.2) im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Freundlicherweise stellte Frau Dr. Ramser für zwei weitere Gene das IGFBP4 und das MRP-14 Gen in Mamma, und Ovarialkarzinom die erweiterten Affymetrix-Daten die im Rahmen eines andren Projektes bearbeitet werden zu Verfügung, somit könnten insgesamt 11 Gene mittels Affymetrix-Analysen auf differenzielle Expression analysiert werden. Die Ergebnisse der Microarray-Analyse waren folgende:

Herunterregulierung der Expression im Mammakarzinom und/oder in den Metastasen des Primär-Tumors und/oder im Ovarialkarzinom zeigten die Gene: DPT, EFEMP1, EPLIN, SLPI, CRYAB, CAV-1. Interessanterweise zeigten zwei Gene davon, SLPI und CRYAB, keine reduzierte Expression in einem „Pool“ von Hirnmetastasen (siehe Tabelle 4.1). Damit war klar, dass es sich bei den Genen DPT, EFEMP1 und CAV1 um Tumorsuppressorgene handelt, die auch mit Metastasierung assoziiert sein können.

Die detaillierte Betrachtung, die zu diesen Ergebnissen führte, war folgende (siehe auch Tabelle 4.1):

Die Gene DPT und EFEMP1 zeigten eine eindeutige Herunterregulation der Expression in den makrodissezierten Mammakarzinomen, Hirnmetastasen und im Ovarialkarzinom.

Auf den ersten Blick scheint bei den mikrodissezierten Mammakarzinomen die Herunterregulation der Expression nicht eindeutig zu sein. Bei einer genaueren Betrachtung und bei Einbeziehung der Log-Ratio der Daten kann man jedoch auch hier eine Herunterregulation der Expression erkennen, da für DPT und EFEMP1 die Log-Ratio, die einbezogen werden können, bei den NC-Signalen Minuswerte zeigen (siehe Tabelle 3.3, DPT: 77,3 % NC, mit einer Log-Ratio von -3,2; EFEMP1: 50 % NC mit einer Log-Ratio von -1). Um diese Expressiondaten in Bezug auf die mikrodissezierten Daten zu überprüfen, sollte nochmals eine größere Anzahl an mikrodissezierten Mammakarzinomen untersucht werden.

Hingegen zeigt die Betrachtung der Expressionsdaten dieser zwei Gene in den Kleinhirn- und Knochenmetastasen, keine differenzielle Expression, was mit der kleinen Anzahl der Proben erklärt werden kann.

Insgesamt sollte bei all diesen Genen nicht außer Acht gelassen werden, dass die Aussage, die bei der Expressions-Analyse über die Metastasen und die mikrodisezierten Mammakarzinomem zu treffen ist, nur als Hinweis dient, da die Anzahl dieser Proben letztendlich nicht ausreichend ist.

Das Gen EPLIN zeigt eine eindeutige Herunterregulation der Expression in den Hirnmetastasen und im Ovarialkarzinom. In den mikro- und makrodisezierten Mammakarzinomen, Kleinhirn- und Knochenmetastasen ist hier keine differenzielle Expression bis hin zu einer leicht erhöhten Expression zu erkennen. Die Erklärung der Expressionsdaten zu den Kleinhirn- und Knochenmetastasen kann auch hier in der kleinen Anzahl dieser Metastasen liegen. Da dieses Gen bei den primären Brusttumoren aber keine differenzielle bis hin zu einer leicht erhöhten Expression zeigt, wäre es möglich, dass dieses Gen hauptsächlich bei der Metastasierung eine Rolle spielt.

Das Gen SPLI zeigt eine eindeutige Herunterregulation seiner Expression in den makro- und mikrodisezierten Mammakarzinomen und in den Kleinhirn- und Knochenmetastasen. In den Hirnmetastasen zeigt es keine differenzielle Expression. Dies könnte damit erklärt werden, dass möglicherweise das Gen in unterschiedlichen Stadien der Tumorgenese eine Rolle spielt. Um diese zu überprüfen, sollte eine größere Anzahl an Metastasen und primären Brusttumoren in unterschiedlichen Stadien der Tumorentstehung analysiert werden. Dieses Gen zeigt hingegen bei den Ovarialkarzinomen eine eindeutige Hochregulierung seiner Expression.

Das Gen CRYAB zeigt eine eindeutige Herunterregulation seiner Expression in den makro- und mikrodisezierten Mammakarzinomen, in den Kleinhirn- und Knochenmetastasen und im Ovarialkarzinom. In den Hirnmetastasen zeigt es keine differenzielle Expression. Auch hier könnte dies möglicherweise mit der Rolle des Gens in unterschiedlichen Stadien der Tumorgenese erklärt werden.

Das Gen CAV-1 zeigt in den mikro- und makrodissezierten Mammakarzinomen, Hirnmetastasen, Kleinhirn- und Knochenmetastasen und im Ovarialkarzinom eine eindeutige Herunterregulation seiner Expression.

Hochregulation der Expression im Mammakarzinom und/oder in den Metastasen des Primär-Tumors und/oder im Ovarialkarzinom zeigten die Gene: CSE1, WFDC2, CAPG.

Das Gen CSE1L/ CAS zeigt eine eindeutige Hochregulation seiner Expression in den makro- und mikrodissezierten Mammakarzinomen, in den Hirnmetastasen und im Ovarialkarzinom. Keine differenzielle Expression zeigt es in den Kleinhirn- und Knochenmetastasen. Wie bei den oben genannten Genen schon erklärt worden ist, kann die nicht differenzielle Expression in den Kleinhirn- und Knochenmetastasen möglicherweise auf die kleine Anzahl der Proben zurückzuführen sein.

Das Gen WFDC2 zeigt eine eindeutige Hochregulation seiner Expression in den Hirnmetastasen und im Ovarialkarzinom. Dieses Gen zeigt in den mikro- und makrodissezierten Brusttumoren und in den Kleinhirn- und Knochenmetastasen eine leichte Herunterregulation seiner Expression. Es ist aber auch in ca. 40 % der Mammakarzinome leicht erhöht. Die unterschiedlichen Expressionsdaten zu den unterschiedlichen Metastasen ergeben sich auch hier möglicherweise aus der Rolle des Gens in unterschiedlichen Stadien der Tumorgense.

Das Gen CAPG zeigt eine eindeutige Hochregulation seiner Expression in den makrodissezierten Mammakarzinomen und Kleinhirn- und Knochenmetastasen. Keine differenzielle Expression zeigt es in den mikrodissezierten Mamatumoren, Hirnmetastasen. Die nicht differenzierte Expression in den Hirnmetastasen kann auch hier auf die Rolle des Gens in unterschiedlichen Stadien der Tumorgense zurückzuführen sein. Für die Expressions-Analyse, die an Hand der mikrodissezierten Mammakarzinome durchgeführt wurde, ist es schwierig, eine Aussage zu treffen, da hier keine differenzielle Expression zu erkennen ist. Um dieses Problem zu lösen, sollte eine größere Anzahl von mikrodissezierten Mammakarzinomen analysiert werden. Die nicht differenzielle Expression im Ovarialkarzinom ist auf die Anzahl der Proben und den Tumor-Status zurückzuführen. Freundlicherweise wurde von Frau Dr. Ramser, TU

München. Expressionsdaten zu Analyse des CAPG Gens im Ovarialkarzinom zur Verfügung gestellt. Diese Daten erlaubten die Expressionsanalyse des CAPG- an 10 Ovarialkarzinomen. Hierbei könnte eine eindeutige erhöhte Expression des CAPG - Gens in Ovarialtumoren (70 %) festgestellt werden (Daten nicht in Tabelle 4.1 gezeigt). Für das MRP14 Gen, wurde auch von der Faru Dr. Ramser Expressions-Daten in 27 Mammakarzinomen und 10 Ovarialkarzinomen zu Verfügung gestellt. Im Gegensatz zu den CPA-Analysen konnte nun für das MRP-14 –Gen im Mammakarzinom eine deutlich erhöhte Expression (83 %) gezeigt werden. Hingegen könnte im Ovarialkarzinom (100 %) eine reduzierte Expression festgestellt werden (Daten nicht in Tabelle 4.1 gezeigt).

Das IGFBP4-Gen zeigte in diesen 27 Mammakarzinomen und 10 Ovarialkarzinomen eine eindeutige Reduktion seiner Expression bis zu 48% im Mammakarzinom und 70 % im Ovarialkarzinom (Daten nicht in Tabelle 4.1 gezeigt).

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse, verglichen mit den CPA-Daten, waren folgende:

Bei den Genen DPT und EFEMP1 wurde eine Herunterregulierung der Expression im Mammakarzinom, in den Metastasen des Primär-Tumors und in Ovarialkarzinomen beobachtet. Diese Daten stimmten sehr gut mit den Daten, die aus den CPA-Filtern erhoben wurden, überein und bestätigten die „in silico“-Daten. Diese beiden Gene wurden mittels „in silico“-Analyse als putative Tumorsuppressorgene nominiert.

Das Gen EPLIN zeigte eine Reduktion der Expression hauptsächlich in den Metastasen, die vom primären Mammakarzinom ausgingen, und im Ovarialkarzinom. Eine so explizierte Unterscheidung war mit dem CPA-Filter nicht möglich. Die Herunterregulation der Expression im Ovarialkarzinom kann mittels CPA- und Microarray- Analysen gezeigt werden. Diese Daten bestätigten die „in silico“-Daten, da auch dieses Gen als putatives Tumorsuppressorgen nominiert war.

Das Gen SLPI zeigte eine eindeutige Herunterregulierung der Signalintensität in primären Mammakarzinomgeweben und in den Metastasen. Hingegen zeigte es im Ovarialkarzinom eine Erhöhung der Expression. Dieses Ergebnis war auch im CPA-Filter zu sehen. Im Vergleich zu den „in silico“-Daten war hier sehr schön zu erkennen,

dass dieses Gen als putatives Onkogen in Ovarialkarzinomen nominiert war und die Daten mittels zweier verschiedener Analysetechniken bestätigt worden sind.

Das Gen CRYAB zeigte im Mammakarzinom und im Ovarialkarzinom eine eindeutige Herunterregulierung der Expression. Das Gen CAV-1 zeigte in den Primärtumoren des Mammakarzinoms, den Metastasen und im Ovarialkarzinom eine eindeutige Herunterregulierung der Expression. Beide Gene zeigten eine Übereinstimmung mit den CPA- und „in silico“-Daten und waren als putative Tumorsuppressorgene nominiert.

Das Gen CSE1L zeigte eine eindeutige Erhöhung der Signalintensität im Primärtumor, in den Metastasen und im Ovarialkarzinom. Auch hier wurden die Daten, welche mittels CPA-Analyse erzielt wurden, bestätigt. Die „in silico“-Daten, die dieses Gen als putatives Onkogen nominierten, sind auch hier bestätigt worden.

Das Gen WFDC2 zeigte eine Erhöhung der Expression im Ovarialkarzinom. Im Mammakarzinom war insgesamt nur in ca 40 % der Fälle eine erhöhte Expression zu beobachten, diese konnte mittels CPA nicht bestätigt werden. Im Hirnmetastasen-Pool war hingegen eine Erhöhung der Expression zu sehen. Während die Daten für das Ovarialkarzinom sehr gut mit den Daten bei den CPA-Filtern übereinstimmten, ist es schwierig, beim Mammakarzinom eine konkrete Aussage zu treffen.

Das Gen CAP G zeigte eine Erhöhung der Expression im Mamma- und ovarialkarzinom. Diese Daten stimmten sehr gut mit den Daten, die aus den CPA-Filtern erhoben wurden, überein und bestätigten die „in silico“-Daten.

Das MRP14- Gen zeigt eine Erhöhung seiner Expression im Mammakarzinom. Hingegen könnte im Ovarialkarzinom eine reduzierte Expression festgestellt werden. Die Daten aus den CPA-Filtern zeigten keine differenzielle Expression für dieses Gen im Mammakarzinom und Ovarialkarzinom. Dies steht in Diskrepanz zu den CPA-Daten.

Das IGFBP4 Gen zeigte im Mamma- und Ovarialkarzinom eine eindeutige Reduzierung seiner Expression und bestätigte somit die CPA-Daten und „in silico“-Daten.

Zusammenfassend stimmten die Ergebnisse der Affymetrix-Analyse mit den CPA-Daten weitgehend überein. 9 von 11 Genen zeigten eine Übereinstimmung. Abweichende Ergebnisse wurden nur für die zwei Gene MRP14 (beim Mama- und Ovarialkarzinom) und WFDC2 (beim Mammakarzinom) erhalten.

Auch im Vergleich zu den „in silico“-Daten, welche als Ausgangspunkt für diese Arbeit dienten, wurden bis zu 77 % übereinstimmende Ergebnisse erzielt.

Real-Time-PCR:

Um die durch CPA- und Microarray-Analyse gewonnenen Ergebnisse weiter zu validieren, wurden quantitative Real-Time-PCR Experimente durchgeführt. Dies ist eine etablierte Möglichkeit zur Validierung und Verifizierung von Genexpressionsanalysen. Die quantitative PCR wurde schon mehrfach erfolgreich zur Detektion und Quantifizierung einer veränderten Genexpression bei sporadischen Mammakarzinomen eingesetzt (Glöckner et al., 2002; Bieche et al., 2001; Bieche et al., 1999).

Es wurden vom gesamten Konsortium der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schmutzler native Brust-Tumor-/Normalgewebe-Paare für die Real-Time-PCR-Analysen zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 19 Brust-Tumor-/Normalgewebe-Paare untersucht.

Von den Genen des GCC-Konsortiums, die vorab der Münchener Gruppe zugeteilt worden sind, standen für die Gene DPT, EFEMP1, EPLIN, SLPI, PTP1c und Hypothetical Protein DKFZP761F214 quantitative PCR-Ergebnisse zur Verfügung. Bei der Auswahl dieser Gene wurden deren chromosomale Lokalisation in bekannten LOH-Intervallen, Expressions-Daten („in silico“-Daten, CPA-Daten) und deren bekannte Rolle in der Tumorgenese aus der Literatur berücksichtigt.

Mittels Real-Time-PCR konnte gezeigt werden, dass die Gene DPT (89 %), EFEMP1 (80 %), EPLIN (70 %) und SLPI (70 %) eine eindeutige Reduktion der Expression in den Mammakarzinomen aufwiesen. Das Gen Hypothetical Protein DKFZP761F214 zeigte eine Reduktion der Expression im Mammakarzinom um 26 %. Das Gen PTP1 zeigte keine Veränderung der Expression im Mamakarzinom.

Verglichen mit den „in silico“- , CPA-, und Affymetrix-Chip-Daten stimmten die Expressions-Daten, die mittels Real-Time-PCR erzielt wurden, bei den vier Genen DPT, EFEMP1, EPLIN und SLPI sehr gut überein. Alle vier Gene wurden reduziert exprimiert im Mammakarzinom, das heißt, dass Veränderungen in diesen Genen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des sporadischen Mammakarzinoms spielen können. Für das Hypothetical Protein DKFZP761F214 stimmten die CPA- und „in silico“-Daten für das Ovarialkarzinom sehr gut überein. Beim Mammakarzinom war eine sehr schwache Expression im CPA-Filter zu sehen, daher war die Auswertung mittels CPA-Filter nicht möglich. Affymetrix-Chip-Daten zum Mammakarzinom waren für dieses Gen nicht vorhanden. In der Real-Time-PCR zeigte das Gen eine Reduktion der Expression im Mammakarzinom um 26 %. Hier ist es schwierig, eine Aussage über die Expression des Gens in Mammakarzinomen zu treffen.

Als Gegenkontrolle für all diese Expressionsanalysen wurde das Gen PTP1c gewählt. Dieses Gen war ein putatives Tumorsuppressorgen, welches im Ovarialkarzinom eine reduzierte Expression zeigen sollte. Die CPA-, Affymetrix- und Real-Time-PCR-Daten zeigten, dass dieses Gen nicht in Mamma- oder Ovarialtumoren reduziert exprimiert wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die gewählte Strategie zur Bestätigung der „in silico“-Daten eine zuverlässige Methode ist, um tumorassoziierte Gene im sporadischen Mamakarzinom auf ihre Expression hin zu untersuchen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Ansatz der Überprüfung der CPA-Daten mittels Affymetrix-Chips und Real-Time-PCR eine zuverlässige Methode ist, um Gen-Expressions-Analysen durchzuführen.

Wegen dieser gewonnenen Ergebnisse, aber auch der sich anschließenden Mutations- und Methylierungsanalysen wurde später entschieden, funktionell nur noch mit einem Gen, dem EFEMP1-Gen, weiter zu arbeiten (siehe unten in einem gesonderten Abschnitt). Deshalb soll zuerst für die anderen evaluierten Gene, die aufgrund unserer Expressionsdaten sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Karzinogenese der Mamma und des Ovars spielen, eine Zusammenfassung und synthetische Interpretation erfolgen.

4.3 Funktionelle Bedeutung der durch Expressionsanalysen charakterisierten Gene

Im Rahmen der Dissertation wurde eine Zuweisung von Funktionen zu den Gentranskripten vorgenommen und diskutiert, welches Gen eine Rolle bei der Entstehung des Mammakarzinoms spielen kann.

Nachdem die Expressionsanalysen der Gene gezeigt hatten, dass diese etablierten Gene möglicherweise eine Rolle bei der Initiation oder Progression von sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen spielen, wurde im Rahmen der Diplomarbeit und der Dissertation mit Hilfe der LOH- und Mutationsanalyse das „two-hit“-Modell von Knudson (1971), welches zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt, an 4 Genen untersucht.

Das „Knudson’s two-hit model“ wurde im Rahmen der Diplomarbeit und der Dissertation an den 4 Genen EFEMP1, DPT, EPLIN und PLCG1 untersucht. Alle 4 Gene galten als putative Tumorsuppressorgene. Für das PLCG1 wurde in den Expressionsanalysen keine differenzielle Expression gefunden. Es wurde für die LOH- und Mutationsanalyse im Vergleich zu den anderen Genen als Referenz mitgeführt.

4.3.1 Dermatopontin

Das Dermatopontin-Gen auf Chromosom 1q12-q23 ist ein ECM-Molekül.

Mittels CPA- (94 % in Ovarialkarzinomen und 57 % in Mammakarzinomen), Affymetrix-Analysen (ca. 60 % im Mammakarzinom, in den Mammakarzinom-Metastasen und im Ovarialkarzinom) und Real-Time-PCR (89 % im Mammakarzinom) konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Dermatopontin eindeutig eine reduzierte Expression im nativen Mamma- und Ovarialkarzinom zeigt. Die reduzierte Expression von Dermatopontin in Brust- und Ovarialtumoren ist ein deutlicher erster Hinweis auf eine potenzielle Funktion von Dermatopontin als Tumorsuppressorgen.

Nach der Knudson-Hypothese sind unabhängige Veränderungen auf beiden Kopien eines Tumorsuppressorgens erforderlich, damit es zur malignen Entartung von Zellen kommt. Diese Veränderungen können in der Keimbahn oder spontan entstanden sein. Gestützt auf diese Hypothese und mit den vorliegenden Expressionsanalysen der CPA-Filter und mit dem Wissen, dass die Datenanalyse zur Genexpression, die von der Firma meta Gen durchgeführt wurde, auf chromosomaler Lokalisation der Gene beruht (die Gene liegen in chromosomalen Regionen, die ein beträchtliches Maß an DNA-Verlust in gynäkologischen Karzinomen aufweisen), wurde eine LOH-Analyse durchgeführt. Neben Translokationen wird hauptsächlich ein Verlust oder ein Zugewinn von DNA in bestimmten Chromosomen-Regionen beobachtet. Es wird vermutet, dass sich in den Regionen, in denen Verluste beobachtet werden, Tumorsuppressor-, und in Regionen, die einen Zugewinn an DNA-Material zeigen, amplifizierte Onkogene befinden (Devilee und Cornelisse 1994).

Im Rahmen der Diplomarbeit konnte pro Gen aus Zeitgründen nur ein Marker untersucht werden. Für das DPT-Gen betrug die Informativität des Markers 41%. Dieser Marker war nicht ausreichend informativ. Daher wurde im Rahmen der Dissertation ein zweiter Marker für die LOH- Analyse verwendet. Für das DPT-Gen wurde ein Marker benutzt, der nur zu 45 % informativ war. Der Grund hierfür war, dass es bei dem Kenntnisstand, der zur Zeit der Bearbeitung zur Verfügung stand, und beim Suchen in den öffentlichen Datenbanken keine Möglichkeit gab, einen informativeren Marker auszusuchen.

Damit eine geringere Anzahl von Tumoren in Zukunft untersucht werden kann und um schneller LOH-positive Tumoren zu finden, sollte für dieses Gen weiterhin nach einem weiteren Marker mit einer höheren Informativität gesucht werden.

Zusammenfassend zeigte das DPT-Gen ein LOH zwischen 29 % und 33 %, was für den Verlust der entsprechenden chromosomalen Region spricht. Der Allelverlust des genannten Gens im Tumor bekräftigt seine Bedeutung als Tumorsuppressorgen im Sinne eines „two-hit model“. Abhängig vom Status des Materials werden die genetischen Veränderungen in der Regel immer komplexer.

Bei der Berechnung der LOH ist zu beachten, dass das Allelverhältnis Q Werte zwischen 0,0 und 1,0 erhält. Hier bedeutet ein Wert von 0,0 einen hundertprozentigen

Allelverlust. Da es sich bei dem hier eingesetzten Tumormaterial zur LOH- und Sequenzierungsanalyse um nicht mikrodissiziertes Material handelt, enthält es zusätzlich verschieden hohe Anteile an Normalgewebe. Es ist daher notwendig, für die Definition eines LOHs einen Schwellenwert zu ermitteln. Zu diesem Zweck wird die Häufigkeitsverteilung der ermittelten Allelverhältnisse in einem untersuchten Probenkollektiv ermittelt. Aus dieser graphischen Darstellung lässt sich der „Cut-Off-Wert“ für jeden Marker definieren.

In anderen Studien (Niederacher et al., 1997) wurde für Tumoren ein LOH angenommen, wenn ein Allelverhältnis (Q-Wert = Ratio Tumor / Ratio Normal) von 0,6 zu beobachten war. Mit Rückgriff auf diese Daten und damit kein LOH übersehen wird, wurde der Q-Wert im Rahmen dieser Arbeit bei 0,7 festgelegt.

Im Weiteren wurde eine Mutationsanalyse mittels DHPLC und Sequenzierung durchgeführt. Die verschiedenen Anwendungen der DHPLC-Methode in diversen Genen oder Exons wie Exon H vom Faktor IX-Gen (O'Donovan et al., 1998), Exon 16 vom NF1 (O'Donovan et al., 1998) und 42 Exons des CFTR-Gens (Jones et al., 1999) haben gezeigt, dass diese Methode eine Detektionssensitivität von 96 % - 100 % aufweist.

Alle DHPLC-Ergebnisse konnten durch die direkte Sequenzierung bestätigt werden. Ein Problem bei der Sequenzierung makrodisszierter Tumorproben ist, dass diese Proben mit Normalgewebe kontaminiert sind (teils bis zu 50 %). Somit kann es sein, dass der Anteil an Wildtypallel höher ist als der Anteil an mutiertem Allel. Es wurde jedoch im Rahmen der Diplomarbeit gezeigt, dass die DHPLC-Analyse so sensitiv ist, dass sie Mutationen in Tumorproben, die mit bis zu 80 % Normalgewebe kontaminiert sind, erkennt. Andererseits konnten alle DHPLC-Varianten durch die Sequenzierung bestätigt werden.

Für bekannte Tumorsuppressorgene wie p53 sind häufig Mutationen in Tumoren nachgewiesen worden, die zur Veränderung der Proteinsequenz mit Folgen für die Funktionalität des Proteins oder zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führten. Mit einer DHPLC-Analyse von 22 LOH-positiven Brusttumoren im kodierenden Bereich des DPT-Gens und mit der Verifizierung dieser Ergebnisse mittels direkter Sequenzierung wurde nach Veränderungen in diesen Tumoren gesucht.

Im DPT-Gen wurden in 22 LOH-positiven Tumoren 1 „missens“-Mutation (432 C->T, P140 L), gefunden. Diese konnte nicht in 50 weiblichen Kontrollen identifiziert werden. Die „missens“-Mutation, die in dem DPT-Gen vorliegt, könnte ein Hinweis auf eine Bedeutung von DPT für die Tumorgense sein.

Zusammenfassend konnten rezessive Veränderungen somit nur bei 4 % (1 aus 22) der Tumoren gefunden werden. Die Expressionsdaten zu diesem Gen korrelierten somit nicht mit den Mutations-Daten. Insgesamt konnte gezeigt werden dass Punktmutationen in diesem Gen sehr selten sind, und das klassische Modell der Knudson-Hypothese hier evtl. nicht zutrifft. Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Expression könnte die Methylierung des zweiten Allels sein.

Dermatopontin ist ein niedermolekularer Komplex der extrazellulären Matrix. Dermatopontin bindet an ein Proteoglycan namens Decorin. Der Dermatopontin-Decorin-Komplex bindet synergistisch an TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor- β). TGF- β ist in bestimmten Tumorzelllinien für die Induzierung der Apoptose zuständig (Schuster et al., 2002). TGF- β wird von Chondrocyten, Monocyten und T-Zellen des Immunsystems produziert, hemmt das Zellwachstum und wirkt im Immunsystem entzündungshemmend. TGF- β , erstmals entdeckt im Überstand einer Tumorzelle, unterdrückt die Reaktion der inflammatorischen T-Zelle und die zellvermittelte Immunität, die zur Kontrolle des Tumorstwachstums notwendig ist.

Der Dermatopontin-Decorin-Komplex bindet dreimal besser an TGF- β als jede Komponente für sich (Okamoto et al., 1999). Decorin hat im Ovarialkarzinom und in Glioma-Tumorzelllinien tumorsuppressive Eigenschaften gezeigt. Durch die reduzierte Expression des Dermatopontins in Brust- und Ovarialtumoren könnte es sein, dass die TGF- β -induzierte Apoptose vermindert wird und die Tumorentstehung somit begünstigt wird. Dies könnte eine mögliche Rolle von Dermatopontin bei der Tumorentstehung erklären.

4.3.2 Eplin

Eplin (Epithelial protein lost in neoplasm) ist auf Chromosom 12q13.12 lokalisiert (Maul & Chang, 1999; Chen et al., 2000).

Bei den Expressionsanalysen, die mittels CPA-Filter (36 % im Mammakarzinom und 50 % im Ovarialkarzinom) und Real-Time-PCR (70 % im Mammakarzinom) durchgeführt worden sind, war eine eindeutige Reduktion der Expression in Mamma- und Ovarialtumoren für das Eplin-Gen zu erkennen.

Bei Betrachtung der Affymetrix-Daten zeigte EPLIN eine Reduktion der Expression hauptsächlich in den Metastasen, die vom primären Mammakarzinom ausgingen, und im Ovarialkarzinom. In den Brusttumoren zeigt dieses Gen eine leicht erhöhte Expression.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für das Eplin ein Marker verwendet, der zu 84 % informativ war.

Das Eplin-Gen zeigte ein LOH von ca 30 %, was für den Verlust der entsprechenden chromosomalen Region spricht. Auch hier bekräftigt der Allelverlust des Eplin-Gens im Tumor dessen Bedeutung als Tumorsuppressorgen im Sinne eines „two-hit model“.

Im Weiteren wurde das Eplin-Gen in 15 LOH-positiven Tumoren und 10 Tumoren ohne bekannten LOH-Status auf Mutationen untersucht. Für dieses Gen konnte nur ein Polymorphismus (+18 IVS 11 G->A) nachgewiesen werden.

Das Eplin scheint hauptsächlich in den Metastasen des primären Brusttumors niedrig exprimiert zu sein; dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum bei der Mutationsanalyse am primären Tumor der Brust keine Mutation gefunden wurde. Eine andere Erklärung könnte sein, dass ein epigenetischer Effekt oder ein anderes Protein welches ein Bindungspartner für Eplin ist („trans“ Effekte), den Grund für die reduzierte Expression darstellt.

Eplin ist lokalisiert im filamentösen Actin und unterdrückt in proliferierenden Zellen die Zellteilung (Chen et al., 2000). Die Expression von Eplin α ist in einer Vielzahl oraler Krebsarten, Prostatakarzinom, xenografen Tumoren und Brustkrebs herunterreguliert (Maul & Chang et al., 1999; Chen et al., 2000). Außerdem ist ein Allelverlust (LOH) an einer Vielzahl von Tumorzelllinien und im Brust- und Prostatakarzinom gefunden

worden (Maul et al., 2003). Die Expressionsdaten aus dieser Dissertation bestätigen somit die Daten aus der Literatur.

Es könnte sein, dass bei den Primärtumoren im Mamma-, und Ovarialkarzinom durch den Wegfall der Mitose-Inhibierung durch reduzierte Expression von Eplin in diesen Tumoren eine verstärkte Proliferation bewirkt wird und diese zur Tumorenstehung beiträgt. Andererseits stabilisiert Eplin Actin Filamente (Maul et al., 2003). Es kann sein, dass der Verlust von EPLIN zur Wanderungsmöglichkeit der invasiven Tumorzellen über Destabilisierung von Actin Filamente beiträgt und somit auch eine Rolle bei der Metastasierung im Mamma- und Ovarialkarzinom spielt. Damit könnte dieses Gen ein Metastasierungsmarker sein. Andererseits zeigen aber die aktuellen Affymetrix-Ergebnisse eher eine leicht erhöhte Expression dieses Gens in Mammakarzinomen, so dass hier weitere Analysen erforderlich sind. Um die Tumorrelevanz und Funktion des Gens im Detail zu verstehen, müssen noch Proteinexpressions-Studien und funktionelle Analysen durchgeführt werden.

4.3.3 SLPI

SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor/antileukoproteinase) ist auf Chromosom 20q12 lokalisiert.

Mittels CPA- (62 % in Mammakarzinomen) und Affymetrix-Analysen (ca. 59 % im Mammakarzinom) und Real-Time-PCR (70 % im Mammakarzinom) konnte gezeigt werden, dass SLPI eine eindeutige Herunterregulation seiner Expression im Mammakarzinom zeigte. Hingegen zeigte dieses Gen in CPA- (64 %) und Affymetrix-Chip- Analysen beim Ovarialkarzinom eine eindeutige Erhöhung seiner Expression. Gegenwärtig werden weitere Tumoren untersucht, um diesen Befund zu untermauern.

SLPI ist ein Protein, welches Serin-Proteasen inhibiert. Somit schützt SLPI epitheliales Gewebe vom Verdau mittels Proteasen. Zusätzlich blockiert SLPI die Neutrophilen-Aktivität gegen das Cytoskelett der Zellen und hat dadurch ein antiarthritisches Rheumapotenzial. SLPI reguliert auch auf verschiedenen Wegen die inflammatorische Immunantwort (Sehnert et al., 2004). Es ist bekannt, dass die Expression der Serin-Protease-Inhibitoren in verschiedenen Tumoren mit einer schlechten Prognose einhergehen. Die SLPI-Expression ist in Epithelzellen mit einer abnormalen Proliferation (beispielsweise in den unterschiedlichen Karzinomen) hochreguliert. Ein

hoher Expressionslevel ist auch beim Lungenkarzinom gefunden worden (Devoogdt et al., 2003; Zhang et al., 2002).

SLPI besitzt zweierlei Funktionen: zum einen inhibiert es die Neutrophilenreaktion und verhindert die Modulation des Cytoskelets und zum anderen inhibiert es die Serin-Proteasen in den Epithelzellen. In Anbetracht der Daten kann vermutet werden, dass SLPI durch Reduktion der Expression im Brustgewebe seine Funktion, die inflammatorische Immunantwort zu unterdrücken, verliert, und somit kommt es zum Tumorwachstum. Hingegen scheint es im Ovarialgewebe die Serin-Proteasen durch erhöhte Expression zu inhibieren, was zur Zellproliferation führt. Da die Karzinogenese ein Mehrschritt-Modell ist, ist es durchaus möglich, dass ein Gen die Rolle eines Tumorsuppressors und zu einem anderen Zeitpunkt oder in einem anderen Gewebe die Rolle eines Onkogens übernimmt.

4.3.4 CSE1L/CAS

CSE1L/CAS ist auf Chromosom 20q13 lokalisiert.

Mittels CPA- (22 % im Mamm- und Ovarialkarzinom) und Affymetrix-Analyse (ca 67 % im Mamm- und Ovarialkarzinom) konnte zum ersten Mal die erhöhte Expression des CAS in nativen Mamma-, und Ovarialtumoren festgestellt werden.

Das Protein besitzt ein „NLS-Signal“ („nuclear localisation signal“) und wird dadurch in den Zellkern transportiert. Das Protein spielt eine Rolle bei der Apoptose und der Zell-Proliferation. Im Genom gilt CAS während der Zellteilung im Zellkern als eine Art Kontrollpunkt für die Genom-Stabilisierung. Es ist bekannt, dass CAS-Protein in Brust-, Colon- und Lebertumoren in einer veränderten Form vorliegt. Darüber hinaus ist CAS in Brust-, Colon-Karzinomzelllinien und Leukämie-Zelllinien erhöht exprimiert. Mittels immunhistochemischer Färbung konnte gezeigt werden, dass CAS in Brusttumoren im Vergleich zu benignen Läsionen und zu in-situ-Karzinomen anders lokalisiert ist. In invasiven ductalen- und lobulären Karzinomen der Brust ist CAS überwiegend im Zellkern exprimiert. Hingegen ist es bei den benignen Tumoren und beim in-situ-Karzinom im Cytoplasma vorhanden (Behrens et al., 2001). Es kann sein, dass die differenzielle Expression des CAS im Brust- und Ovarialgewebe die Kontrollfunktion des CAS-Proteins definiert (ein Beispiel für ein solches Protein sind das p53 und BRCA1). Durch die Störung der kompletten Funktion bei einer erhöhten Expression des CAS-Proteins könnte über eine verstärkte Proliferation, verringerte Apoptose oder

Genom-Instabilität die Entstehung von Mamma- und Ovarialtumoren begünstigt werden.

4.3.5 CRYAB

CRYAB ist auf Chromosom 11q22.3-q23.1 lokalisiert.

Zur Expression von CRYAB: Mittels CPA- und Affymetrix-Analysen konnte gezeigt werden, dass CRYAB bis zu 89 % in Mammatumoren und 56 % in Ovarialtumoren herunterreguliert ist. Man kann zusammenfassen, dass die Transkription dieses Gens im Mamma- und Ovarialkarzinom im Vergleich zu Normalgewebe stark herunterreguliert ist.

CRYAB gehört zur Gruppe der Crystallin-Familie. Die Crystalline werden in die drei Gruppen α , β und δ unterteilt. CRYAB ist ein Mitglied der α -Crystalline. α -Crystallin besteht aus zwei Proteinen α -A-Crystallin und α -B-Crystallin. CRYAB ist das α -B-Crystallin. Zwischen α -A-Crystallin und α -B-Crystallin besteht eine Aminosäurehomologie von 55 %. Die Bedeutung der α -Crystalline besteht in ihrer chaperonähnlichen Aktivität. α -B-Crystallin besitzt als Chaperon eine bedeutende Funktion im Schutz der zellulären Integrität vor stressbedingten Schädigungen. Eine differenzielle Expression des CRYAB wurde bei Patienten mit Parkinson, myofibrilla Myopathy und Alzheimer berichtet (Rekas et al., 2004; Selcen et al., 2003; Link et al., 2003). Außerdem ist bekannt, dass CRYAB in Lungenkarzinom-Zelllinien herunterreguliert ist (Cicek et al., 2004). Die Ergebnisse würden an sich für ein potenzielles Tumorsuppressorgen sprechen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass CRYAB in stark proliferierenden Tumorzellen in vivo und in vitro eine hohe Expression zeigt (Klemenz et al., 1991; Aoyama et al., 1993). Die hohe Expression kann zur Stabilisierung des Zytoskeletts durch CRYAB in schnell wachsenden Tumorzellen führen, da bekannt ist, dass der Schutz des Zytoskeletts bei Entwicklungsprozessen eine Rolle spielt (Scotting et al., 1991). Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist aber eher eine reduzierte Expression von CRYAB in den Mamma- und Ovarialkarzinomen zu erwarten.

4.3.6 CAP G

CAP G ist auf Chromosom 2cen-q24 lokalisiert.

Mittels Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass CAP G eine eindeutige Hochregulation der Expression in Mamma- und Ovarialtumoren zeigt.

Im CPA-Filter war dieses Gen in den Ovarialtumoren um 56 % erhöht exprimiert, diese Daten konnten mittels Affymetrix-Analysen bestätigt werden.

CAP G gehört zur Gelsolin-Proteinfamilie, die bis jetzt aus 5 Mitgliedern besteht (Mishra et al., 1994). Gelsolin und CAP G sind Komponenten eines Signalweges, der externe Stimuli an das Zytoskelett weiterleitet. Es ist bekannt, dass mit CAP G transfizierte Zellen keine starke Überexpression über einen längeren Zeitraum akzeptieren. Es kann nur eine zweifache Überexpression erreicht werden. Diese hat einen Einfluss auf die Signalkaskade, es kommt zu einer verstärkten Migration der Zellen (Sun et al., 1995 und 1997). Außerdem ist bekannt, dass CAP G die Aktivität der PLC γ inhibiert (Sun et al., 1997). PLC γ spielt eine Rolle bei der Zelladhäsion. Die Dauerinhibierung durch die Überexpression von CAP G in Mammatumoren kann die Zelladhäsion unterbinden und so zur Tumorentstehung beitragen. Dieses Gen scheint bei der Entstehung des Mammakarzinoms und Ovarialkarzinoms eine Rolle als Onkogen zu spielen.

4.3.7 CAV-1

CAV-1 ist auf Chromosom 7q31.1 lokalisiert.

Mittels der Expressionsdaten in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CAV-1 in Mammatumoren (94 % mittels CPA, ca. 83 % mittels Affymetrix gezeigt) und Metastasen aus den Mammatumoren reduziert exprimiert wird. Somit konnte zum ersten Mal die reduzierte Expression am nativen Mammagewebe gezeigt werden. Die Expressionsdaten zum Ovarialkarzinom (bis zu 88 % mittels CPA, und Affymetrix gezeigt) zeigen eine eindeutig reduzierte Expression in diesen Tumoren.

CAV-1 bindet an die Tyrosin-Kinase FYN, aktiviert den RAS-ERK-Signaltransduktionsweg und führt somit zur Zellzyklus-Progression. Das Gen ist als

Tumorsuppressoren in der Literatur bekannt und ist ein negativer Regulator der Ras-P42/44 MAP-Kinase (Apoptose). Es ist bekannt, dass CAV-1 Metastasierung im Brustkarzinom „in vivo“ suprimiert. Darüber hinaus ist bekannt, dass das Wachstum des primären Tumors und die Bildung der Metastasen aus dem Primärtumor in der Lunge und im Knochenmark durch CAV-1 in Schach gehalten werden (Sloan et al., 2004).

Es ist weiterhin bekannt, dass die niedrige Expression von CAV-1 in Prostata-, Ösophagus- und Lungenkarzinom mit erhöhtem Metastasierungsrisiko und einer schlechteren Prognose einhergeht. (Yang et al., 1999 und 2005; Ho et al., 2002; Kato et al., 2002). Es konnte auch gezeigt werden, dass CAV-1 in normalem Ovarial-Epithel und in normalem Colon-Epithel exprimiert wird, hingegen ist eine Herunterregulation der Expression in serösen Ovarialkarzinomen und im Colonkarzinom erkennbar (Wiechen et al., 2001; Bender et al., 2000). In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schmutzler wurde das CAV-1 auf Mutationen im Mammakarzinom untersucht. Trotz des Expressionsbefundes wurde keine klare Mutation gefunden. Eine Erklärung dafür könnte eine epigenetische Modifikation, z. B. die Methylierung des Promotors sein. In der Literatur sind Daten zur Methylierung des Promotors des CAV-1-Gens in Prostata- und Mamakarzinomzelllinien bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals natives Mammanormal- und Karzinomgewebe auf Methylierung im CAV-1-Gen untersucht. Es wurde in 33 % der Tumoren eine Methylierung im 5'-Ende des Gens gefunden. Um die tatsächliche Rolle des CAV-1 in Brusttumoren herauszufinden, sollte ein größeres Tumorkollektiv von gut klassifizierten Tumoren untersucht werden. Außerdem sollte ein größerer Bereich des putativen Promotors in einem größeren Tumorkollektiv untersucht werden. Die weiterführenden Analysen zu diesem Bereich werden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schmutzler durchgeführt. Die Expressions-Daten zum Ovarialkarzinom aus dieser Arbeit bestätigten eindeutig die Daten aus der Literatur.

4.3.8 WFDC2

WFDC2 (HE4) ist auf Chromosom 20q12-q13.2 lokalisiert.

Mittels der Daten, die in dieser Arbeit vorliegen, ist anhand des nativen Gewebes sowohl in der CPA (50 %) als auch in der Affymetrix-Analyse eine eindeutige Erhöhung der Expression in Ovarialkarzinomen zu erkennen. Bemerkenswert ist dabei die mehr als 10fache Erhöhung der Expression in den Ovarialkarzinomen, während die Expression in 40% der Mammakarzinome ungefähr verdoppelt ist

HE4 ist ein Proteinase-Inhibitor. Mittels RNA-in-situ-Hybridisierung (ISH) konnte gezeigt werden, dass HE4 eine Hochregulation der Expression in „grading 2“ serösen/papillären Ovarialkarzinomen aufweist. Eine weitere Hochregulation der Expression konnte auch in „grading 3“ serösen/papillären und klarzelligem Tumoren gezeigt werden (Dahl et al., 2005). Die Analyse mittels eines RNA-Expressions-Arrays zeigte, dass HE4 im Ovarialkarzinom erhöht exprimiert wird (Schummer et al., 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass HE4-Überproduktion im Serum von Patientinnen ein Hinweis auf Ovarialkarzinom sein kann, und somit HE4 ähnlich wie der CA125-Marker prognostische Relevanz besitzt (Bingle et al., 2002; Hellström et al., 2003). Die Expressions-Daten aus dieser Arbeit bestätigen die Daten aus der Literatur. Möglicherweise spielt das WFDC2 als ein Onkogen im Ovarialkarzinom eine Rolle. Um aber die Tumorrelevanz dieses Gens besser zu verstehen, sollten Funktionsanalysen durchgeführt werden.

4.3.9 Hypothetical Protein DKFZP761F214

Die initiale Expressionsanalyse mittels CPA-Filter ergab eine Reduktion der Expression in Ovarialtumoren (64 %). Hingegen ist es schwierig, beim Mammakarzinom eine Aussage zu treffen, da dieses Gen generell im Mammagewebe niedrig exprimiert war. Mittels Affymetrix-Analyse könnte die erhöhte Expression in 60 % der Ovarialtumore bestätigt werden (Freundlicherweise von Frau Dr. Ramser, TU München zu Verfügung gestellt, in Tabelle 4.1 nicht gezeigt). Die „Real-Time“-PCR-Daten zeigten in Mammatumoren allerdings eine 26%ige Reduktion der Expression. Bei Hypothetical Protein DKFZP761F214 ergab sich nach einem Datenabgleich für die cDNA-Sequenz, die von der Firma Metagen zu Verfügung gestellt wurde, ein cDNA-Klon, der zu 99,8 % identisch (NM_031455) war. Eine hohe Homologie (99 %) über den bekannten Bereich des cDNA-Klons war bei mehreren Einträgen für eine „coiled-coil-domain containing 3 (CCDC3)“ zu finden. Coiled-coil-Domänen vermitteln oft Homo- und Heterooligomerisierung von Proteinen. Diese Domäne spielt eine Hauptrolle bei der Protein-Protein-Interaktion. Möglicherweise hat diese Domäne bei der Entstehung von Karzinomen eine potenzielle Bedeutung.

Da der Datenbankeintrag für dieses Gen sehr neu ist (Ota et al., 2004), ist bis jetzt noch nichts über seine Funktion bekannt. Zur Untersuchung der Funktion dieser Domäne,

wären viele Protein-Expressionen und Funktionsassay notwendig, um ein Bild über die Funktion des Gens zu bekommen. Um die Funktion dieses Gens in Mamma- und Ovarialtumoren zu analysieren, muss ein Basiswissen über die Funktion dieses Gens vorhanden sein.

4.3.10 PTP1c/HCP und PLCG1

PTP1c/HCP ist auf Chromosom 12p13.31 und PLCG1 auf Chromosom 20q12-q13.1 lokalisiert.

Mittels CPA-Analyse- und/ oder Real-Time-PCR konnte in Mamma- und Ovarialtumoren keine differenzielle Expression für diese beiden Gene festgestellt werden.

PTP1c/HCP besteht aus 3 Exons und ist 574 bp groß (Ansari-Lari et al., 1998). Im Nierenkarzinom wurde eine Herunterregulation (6/20) der Expression festgestellt. In Anbetracht der Daten scheint das HCP-Gen bei der Entstehung des Mamma- und Ovarialkarzinoms keine bedeutende Rolle zu spielen, obwohl dieses Gen in einer chromosomalen Region liegt, die in der Literatur mit einer DNA-Amplifikation von 30 % - 70 % in Ovarialtumoren bekannt ist (Riopel et al., 1998; Sonda et al., 1997). Über die Funktion dieses Gens ist momentan nichts bekannt.

Die Expressionsdaten in der vorliegenden Arbeit zeigten keine differenzielle Expression des PLCG1 in Ovarial- und Brusttumoren. Es wurde für die LOH- und Mutationsanalyse im Vergleich zu den anderen Genen als Referenz mitgeführt.

Auch hier wurde im Rahmen der Diplomarbeit ein Marker untersucht mit einer Informativität von 61 %. Für das PLCG wurde ein zweiter Marker mit einer Informativität von 67 % im Rahmen der Dissertation gewählt. In 22 LOH-positiven Tumoren wurde eine Mutationsanalyse mittels DHPLC und Sequenzierung durchgeführt.

Im PLCG-Gen wurden in 22 LOH-positiven Tumoren nur 6 Polymorphismen (903 A→G, S 280 G; -23 IVS 11 C→T, 1984 A → G, Y 572 C; 2354 G → A, E 762 E, 2506 C→T, I 846 Y, +20 IVS 30 G → A) nachgewiesen.

Die Expressionsdaten des PLCG-Gens befinden sich in Übereinstimmung mit den Mutationsanalysen. In dem Gen konnten keine Auffälligkeiten identifiziert und in der Expression keine einheitliche Reduktion beobachtet werden. Damit konnte die Zuverlässigkeit der gewählten Strategie nochmals überprüft werden.

PLCG1 auf Chromosom 20q12-q13.1 liegt in einer Region, die in der Literatur mit einem 20 -50%igen Gewinn der DNA in Brusttumoren und zu 50 % in Ovarialtumoren bekannt ist, und besteht aus 32 Exons (Bristol et al., 1988; Anzick et al., 1997; Courjal et al., 1997; Sondo et al., 1997). Es zeigte sich, dass die Überexpression von Phospholipase-C- γ -1 zur Verstärkung von Zellproliferation sowie zu einem erhöhten Risiko für Zellentartung führt (Kassis et al., 1999). Außerdem dient Phospholipase-C- γ -1 als Substrat für HER-2/neu. Dies ist ein Proto-Onkogen, welches für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor codiert. Untersuchungen in nativen Tumoren haben gezeigt, dass bei 30 % aller Mammakarzinome HER-2/neu überexprimiert ist (Mark et al., 1999). Außerdem ist bekannt, dass PLCG1 eine Rolle bei der Zelladhäsion und Differenzierung spielt (Bourguignon et al., 2004). Es ist auch eine Kopplung zwischen der PLCG1 und „maturity-onset diabetes of the young (MODY)“ auf Chromosom 20 bekannt (Rothschild et al., 1992). All diese Daten aus der Literatur nominierten das Gen für ein putatives Tumorsuppressorgen. In der vorliegenden Arbeit konnte dies nicht nachgewiesen werden. Es scheint somit keine wesentliche Bedeutung bei der Mamma- und Ovarialkarzinogenese zu haben.

4.3.11 EFEMP1

Im Verlauf der Dissertation wurde dieses Gen als Hauptziel für weiterführende Analysen gewählt, um die Rolle eines ECM-Proteins bei der Entstehung von malignem Mammakarzinom im Detail zu untersuchen. Daher wird im Abschnitt 4.5 nochmals detailliert auf dieses Gen eingegangen.

4.4 Die Rolle von SASH1 im sporadischen Mammakarzinom

Das SASH1 ist ein Gen, das alle Kriterien zur Methylierungsanalyse erfüllt, und als so genanntes „Nebenprojekt“ in dieser Arbeit aufgefasst wurde.

Das SASH1-Gen ist auf Chromosom 6q23-25 lokalisiert. Dieses Gen besitzt zwei Protein-Domänen, zum einen SAM („sterile α module“) und zum anderen die SH3 („Src homology domain 3“-)Domäne. Die zwei Protein-Domänen verleihen dem Gen den Namen SASH1. Das SASH1 besteht aus 20 Exons und aus 247 Aminosäuren. Es besitzt zwei Splice-Varianten, die sich im 3' UTR von einander unterscheiden. Die kurze Variante mit 4.4 kb wird in der Lunge, Brust, Thymus, Schilddrüse, Plazenta und der Milz exprimiert. Hingegen wird die lange Variante mit 7,5 kb in dem genannten Gewebe nicht so stark exprimiert, dafür aber im Hirn. Das SASH1 codiert für ein Protein mit einer Größe von 140 kDa. Dieses Protein besitzt am aminoterminalen Ende eine prolinreiche Sequenz (25 Prolin-Reste), die dafür spricht, dass SASH1 ein putatives Tumorsuppressorgen ist. Das SASH1-Gen zeigt beim Vergleich zwischen Mensch und Maus eine hohe Konservierung seiner Gen- und Proteinsequenz. Mit dem Präsent einer SH3- und SAM-Domäne in der Proteinstruktur spielt das Gen wahrscheinlich eine Rolle bei der Signaltransduktion.

Die Polyprolinstruktur der SH3-Domäne spielt in der Protein-Proteininteraktion eine wichtige Rolle bei der Organisation vieler Prozesse, beispielsweise bei Tyrosinkinase, Signaltransduktion und der Stabilisierung des Cytoskellets (Pawson, 1995; Buday, 1999).

Der SAM-Domäne wird eine ähnliche Funktion zugeteilt mit dem Unterschied, dass die SAM-Domäne nicht nur mit sich selbst interagieren kann (Carroll et al., 1996), sondern auch verschiedene andere Bindungs-Partner (Serra-pages et al., 1995) hat. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Polymerisierung der SAM-Domäne eine Rolle bei der Organisation der Chromatinstruktur (Kim et al., 2002) und somit eine Rolle bei der Kontrolle der Transkription spielt. Auch diese Informationen geben einen Hinweis darauf, dass SASH1 ein putatives Tumorsuppressorgen ist.

Die genomweite Analyse mittels LOH und CGH hat gezeigt, dass größere chromosomale Intervalle in primären Brustkarzinomen fehlen. Zu diesen Intervallen gehört auch 6q23-25. Aus der Literatur ist bekannt, dass die 6q23-25-Region mit einem Allelverlust im Mammakarzinom (Fujii et al., 1996; Rodriguez et al., 2000),

Cervixkarzinom (Acevedo et al., 2002), Ovarialkarzinom (Shridhar et al., 1999; Wan et al., 1999), Pankreaskarzinom (Barghorn et al., 2001) und Prostatakarzinom (Srikantan et al., 1999) assoziiert ist. Somit ist die Region 6q23-25 ein „hot spot“ für viele solide Tumoren.

Mittels CPA-Analyse konnte gezeigt werden, dass SASH1 in 74 % der Mammatumoren eine Herunterregulation der Expression im Vergleich zum Normalgewebe zeigt. Weitere Expressionsanalysen mittels RT-PCR an nativen Tumor-/Normalgewebepaaren zeigten eine Herunterregulation des SASH1-Gens um 70 % in sporadischem Mammakarzinom (Zeller et al., 2003).

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass 30 % der primären Mammakarzinome einen Allelverlust (LOH) in diesem Gen aufweisen (Zeller et al., 2003). Aus der gleichen Literaturquelle ist bekannt, dass der LOH mit einem schnelleren Wachstum der Tumoren und mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben korreliert.

Trotz der eindeutigen Herunterregulierung der Expression des SASH1 in sporadischem Mammakarzinom konnte in den LOH-positiven Mammatumoren für dieses Gen keine funktionelle Mutation gefunden werden. Dies ist ein Hinweis, dass epigenetische Mechanismen oder Transregulatoren zur Inaktivierung des SASH1 im sporadischen Mammakarzinom führen. Damit war das SASH1 ein Gen, das alle Kriterien zur Methylierungsanalyse erfüllt, und als so genanntes Nebenprojekt in dieser Arbeit aufgefasst wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Promotoranalysen im SASH1-Gen in Brusttumoren durchgeführt. Die epigenetischen Analysen im Promotorbereich dieses Gens zeigten eine 60%ige Hypermethylierung des Promotors in den analysierten Brusttumoren. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten epigenetischen Analysen sind eine erste Beschreibung von Methylierungsmustern von SASH1 in Brusttumoren. Es ist aber notwendig, ein größeres Tumorsset zu untersuchen, um diese Daten zu verifizieren. Weiterhin zeigten die Expressionsanalysen aus der Literatur einen deutlichen Hinweis auf eine potenzielle Funktion von SASH1 als Tumorsuppressorgen. Weitere Experimente wie Proteinexpressionsstudien und funktionelle Analysen sind jedoch notwendig, um die RNA-Daten und die Methylierungs-Daten aus dieser Arbeit zu bestätigen und die Tumorrelevanz von SASH1 zu zeigen.

4.5 Die Rolle des EFEMP1 im sporadischen Mammakarzinom

EFEMP1 reguliert, neben anderen Mitgliedern aus der Fibulinfamilie, Zell-Proliferation und Wachstum. Darüber hinaus spielt es als extrazelluläres Matrix-Protein eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung der Basalmembran und der Protein-Protein-Bindung und fungiert so als molekulare Brücke bei der Interaktion mit anderen ECM-Proteinen. Es hat somit eine mögliche Auswirkung bei der Tumorentwicklung. Das EFEMP1-Gen ist auf Chromosom 2p16 lokalisiert. Diese Region ist in gynäkologischen Tumoren durch häufigen Verlust gekennzeichnet (Mao et al., 2005; Regitnig et al., 2002; Deng et al., 1994). Die chromosomale Lokalisation und die biologische Funktion von EFEMP1 sprechen für eine mögliche Rolle als Tumorsuppressorgen in der Karzinogenese von gynäkologischen Tumoren.

Expressionsanalyse:

Die Analyse der Expression durch den eNorthern deutete auf eine reduzierte Expression von EFEMP1 in gynäkologischen Tumoren hin. Aus der Literatur war eine differenzielle Expression des EFEMP1 in humanen diploiden Fibroblasten von Patienten mit Werner-Syndrom und in wachstumsarretierten Zellen bekannt (Ikegawa et al., 1996). Die Expression des EFEMP1 ist in jungen normalen Fibroblasten, Fibroblasten in Zellteilungsarrest oder im Seneszenzstadium erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass EFEMP1 die DNA-Synthese in normalen humanen diploiden Fibroblasten (HDFs) erhöht. (Lecka-Czernik et al., 1995). Bekannt war außerdem, dass das homologe EFEMP1 der Ratten an die DA 41 Proteine bindet, die wiederum mit einem DNA-bindenden Tumorsuppressor-Protein interagieren (Ozaki et al., 1997; Gallagher et al., 2005). Es war bislang bekannt, dass Mutationen im EFEMP1 (Arg345Trp) zu zwei Augenerkrankungen, nämlich zu „Malattia leventinese“ und zu „Doyme honeycomb retinal dystrophy“ führen (Gaillard et al., 2005; Haimovici et al., 2002; Guymer et al., 2002).

CPA-Analysen:

Die in dieser Arbeit durchgeführten CPA-Analysen bestätigten zum ersten Mal eine differenzielle Expression des EFEMP1-Gens in verschiedenen Humangeweben. Bis zu

diesem Zeitpunkt war die differenzielle Expression nur aus der Zellkultur bekannt. Die Höhe der Probenzahl des CPA (50 Mammakarzinome, 14 Ovarialkarzinome und 42 Uteruskarzinome) erlaubt neben den eNorthern-Daten eine bessere Charakterisierung der differenziellen Expression. Neben der differenziellen Expression in Mammakarzinomen wurde auch eine differenzielle Expression dieses Gens im Endometrium- und Ovarialkarzinom beobachtet. Die Daten zeigen eine eindeutige Herunterregulation um 36 % beim Mammakarzinom, eine 50%ige Reduktion der Expression beim Ovarialkarzinom und eine 26%ige Reduktion der Expression beim Endometriumkarzinom. Es scheint, als würde die erniedrigte Expression in den Brusttumoren am meisten bei invasiv-lobulären (ILC) Mammakarzinomen vorhanden sein. Insgesamt zeigen die CPA-Daten deutlich, dass EFEMP1 in allen gynäkologischen Tumor-Entitäten (Brust, Ovar, Endometrium) reduziert exprimiert war. Möglicherweise liegt eine gemeinsame, beispielsweise hormonabhängige Regulation in den gynäkologischen Tumoren zugrunde.

Affymetrix-Chips:

Weitere Expressionsanalysen mittels des Expressionsarrays von Affymetrix zeigten, dass EFEMP1 im Mammakarzinom bis zu 67 % und in den Metastasen des primären Mammakarzinoms eindeutig herunterreguliert ist. Die Herunterregulation bei den mikrodissezierten Tumoren bestärkt diese Aussage. Es ist auch eine eindeutige reduzierte Expression im Ovarialkarzinom zu sehen. Hier ist aber hinzuzufügen, dass die Anzahl an Proben nicht ausreichend war, um eine gesicherte Aussage über die Quantität zu treffen. In der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich die weiteren Analysen auf die Bedeutung des EFEMP1-Gens in Brusttumoren, da für diese Entität durch Kooperation mit der Frauenklinik Düsseldorf (Dr. Niederacher), dem Institut für Pathologie der TU und der LMU München (Dr. Nährig, Dr. Lebeau) Patientenmaterial mit den dazugehörigen klinischen Daten zur Verfügung stand.

Quantitative PCR:

Es wurden insgesamt 19 makrodissezierte Brust-Tumor-/Normalgewebe-Paare in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. R. Schmutzler untersucht. Es wurden weitere 4

mikrodissezierte Paare mit einem Tumor-/Epithelanteil von > 90% zweimal komplett analysiert.

Bei der Analyse der EFEMP1-Expression in Mammatumoren durch quantitative PCR war eine erniedrigte Expression in 14 von 19 makrodissezierten Tumor-/Normalgewebepaaren nachweisbar. Insgesamt kann man von einer Herunterregulierung des Gens um 80 % sprechen. Von den 4 mikrodissezierten Tumor-/Normalgewebepaaren zeigten 3 Tumoren eine Reduktion der Expression von 82 % bis 98 %. Ein Tumor zeigte eine Hochregulation seiner Expression.

Insgesamt konnten die Daten, die mittels CPA und Affymerix erzielt wurden, mit der quantitativen PCR bestätigt werden. Die Daten (Affymerix und quantitativen PCR) weisen aber darauf hin, dass in der deutschen Population mehr als 50% der Mammakarzinome eine reduzierte Expression des EFEMP1-Gens zeigen.

Zusammenfassend kann auf RNA-Ebene von einer erniedrigten Expression des EFEMP1 im Mammakarzinom gesprochen werden.

LOH- und Mutations-Analyse:

Nachdem die differenzielle Expression des EFEMP1-Gens in sporadischen Mamakarzinomen auf RNA-Ebene gezeigt wurde, stand die Frage im Vordergrund, was die Ursache für diese differenzielle Expression sein kann.

Mögliche Mechanismen, welche zur differenziellen Expression des EFEMP1-Gens im Mamakarzinom führen könnten, sind unter anderen im berühmte „two-hit“-Model von Knudson (1971) zu finden.

Somit wurde das EFEMP1-Gen auf LOH und Mutationen untersucht, um mögliche Mechanismen für einen Funktionsverlust in Tumoren, der zu Expressionsreduktion führt, zu analysieren. LOH-Untersuchungen mit zwei verschiedenen Markern an 158 Primärtumoren der Mamma bestätigten einen Verlust dieser Region in 21 % bzw. 32 % der Fälle (Marker F3 bzw. Marker F2).

Auf der Grundlage der Ergebnisse der vorangegangenen Diplomarbeit (Sadr-Nabavi, Mai 2001) wurde vom Konsortium beschlossen, dass insgesamt mindestens 20 LOH-positive Tumoren auf Mutationen untersucht werden sollen.

Eine Analyse der 21 Brusttumoren im Hinblick auf Mutationen im kodierenden Bereich des EFEMP1-Gens führte zur Identifikation von zwei Mutationen, einer „frameshift“-Mutation (1623 delT, F597X) und einer „missens“-Mutation (228 A->C, D26A). Letztere konnte nicht in 50 weiblichen Kontrollen identifiziert werden.

Mit speziellem Aspekt auf das EFEMP1-Gen und mit dem Wissen, dass EFEMP1 in sporadischen Brusttumoren reduziert exprimiert wird, war es auffällig, dass somit nur in 10 % (2/21) der Tumoren eine Mutation zu sehen war. Damit war klar, dass für das charakterisierende Gen, die gefundene stark reduzierte Expression im Wesentlichen nicht auf das synchrone Wirken von LOH- und pathogener Punktmutation zurückzuführen ist. Deshalb wurden für das **EFEMP1**-Gen epigenetische Untersuchungen durchgeführt.

Methylierungsanalyse:

Eine Erklärung für das oben gesagte könnte die Methylierung („imprinting“) des zweiten Allels sein, die auch schon für andere Tumoren beobachtet wurde (Engemann et al., 2000; Paulsen et al., 2000).

Epigenetische Veränderungen haben einen entscheidenden Anteil an der Entstehung von Tumoren. Bei der epigenetischen Regulation spielen vor allem der Grad der DNA-Hypermethylierung des Gens, besonders im Bereich der Promotorregion, und die damit verbundene Veränderung der Packungsdichte der chromosomalen DNA (Chromatinstruktur) eine wichtige Rolle. Die DNA-Hypermethylierung im Promotorbereich verschiedener Gene bewirkt eine Gen-Inaktivierung („gene silencing“). Die Tumorzelle scheint durch die Methylierung spezifischer Gene einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen zu erwerben. Veränderte Methylierungsmuster treten sowohl im Frühstadium der Karzinogenese als auch in fortgeschrittenen Tumoren auf.

In der Literatur erschienen Arbeiten, die darauf hinweisen, dass epigenetische Vorgänge zu einer transkriptionalen Abschaltung von Tumorsuppressorgenen in Mammakarzinomen führen können. Die Hypermethylierung von CPG-Inseln stellen einen zentralen Mechanismus zur Inaktivierung von Genen dar, z.B. die Hypermethylierung von p16 in humanen Brustepithelzellen (Huschtscha et al., 1998). Auch die Methylierung des BRCA1-Gens wurde als epigenetischer Mechanismus der Inaktivierung von BRCA in sporadischen Brusttumoren beschrieben (Dobrovic et al., 1997; Esteller et al., 2000; Jones PA & Laird PW., 1999).

Methylierungsanalyse der putativen Promotorregion:

Es wurde somit eine Methylierungsanalyse in der Promotorregion des EFEMP1-Gens durchgeführt.

Da es sich bei den Genen aus der Fibulinfamilie um erst seit kurzem bekannte Gene handelt, stand dem EFEMP1-Gen lediglich eine putative Promotorregion zur Verfügung, welche mit Hilfe der Datenbankanalysen gefunden wurde. Im Bereich von –nt1671 am 5'-Ende des EFEMP1-Gens nach dem Initiationscodon liegt eine CPG-Insel, die 76 CPG-Dinukleotide enthält. Die potentielle Promotorregion und das Intron1 des EFEMP1-Gens sind in dieser CPG-Insel eingebettet. Dieser Bereich wurde im Rahmen der Dissertation ausgewählt und an nativen Brusttumoren analysiert.

Um eine differenzielle Methylierung zu untersuchen, wurde eine Bisulfitsequenzierung durchgeführt. Es wurde DNA aus Mammagewebe bisulfitsequenziert. Dabei handelt es sich um 15 makrodissezierte Mammakarzinome, die für EFEMP1 ein LOH auf einem Allel zeigten, 4 mikrodissezierte Mammakarzinome, bei denen kein LOH vorhanden war, und deren Normalgewebe als Referenz und 4 mikrodissezierte Normalgewebe von Frauen verschiedenen Alters. Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter die Fähigkeit zur DNA-Methylierung nachlässt oder verändert wird. Die Folge ist, dass Gene angeschaltet werden, die eigentlich inaktiv bleiben sollten oder aber, dass aktive Gene abgeschaltet werden. Dadurch kommt es zu einer Zellfunktionsstörung, die schließlich zum Absterben der Zelle führen kann. Um diesen Aspekt zu berücksichtigen, wurde das Alter der Frauen, deren Normalgewebe als Referenzgewebe diente, so gewählt, dass Frauen aller Altersklassen vertreten waren.

Zusammenfassend konnte bei der Analyse von jeweils 16 Klonen pro untersuchter Materialprobe bei den 14 makrodissezierten Mammakarzinomen, die ein LOH auf einem Allel zeigten und bei denen keine Mutation im EFEMP1-Gen gefunden wurde, in über 70 % eine Methylierung oder eine partielle Methylierung im putativen Promotorbereich gefunden werden (bei 7 Fällen eine vollständige Methylierung, bei 3 Fällen eine partielle Methylierung). Nur 30 % der Fälle zeigten keine Methylierung. Bei einem Tumor, der ein LOH und die Mutation im Exon 8 des EFEMP1 zeigte, konnte in allen 16 bisulfitesequenzierten Klonen, durchgehend in der Pos. -361 vor dem Translationsstart in dem CPG-Dinukleotid Pos. 8, ein umgewandeltes Cytosin gefunden werden, d.h. dieses Cytosin lag hier nicht in der methylierten Form vor, während es bei den Tumoren, die partiell oder komplett methyliert vorlagen, immer in der methylierten Form, d.h. in Form von 5-Methyl-Cytosin vorhanden war. Insgesamt war im Fragment A2 (amplifiziertes Produkt von -285 bis -580 upstream des EFEMP1 Startcodons), welches näher am Initiationscodon liegt, eine höhere Methylierung der CPG zu beobachten. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass der Tumor mit der Mutation an einem bestimmten CPG (-361) keine Methylierung zeigt, lassen die Vermutung zu, dass zum einen mehrere Prozesse zum Funktionsverlust eines Gens im Tumor führen können zum anderen, dass bestimmte CPG-Inseln, die evtl. zu einem Selektionsvorteil der Tumorzelle dienen, ausreichen, um das Gen zu inaktivieren. Solche Phänomene, dass bestimmte Bereiche im Promotor zur Inaktivierung eines Gens im Tumor ausreichen, sind für das E-Cadherin (CDH1)-Gen in colorektalen Karzinomen (Azarschab et al., 2002) bekannt.

Die Methylierungsanalyse wurde an 4 mikrodissezierten Mammakarzinomen und deren korrespondierenden Geweben durchgeführt. Diese mikrodissezierten Proben bestehen im Gegensatz zu den makrodissezierten Proben aus einem jeweils hohen Anteil an (über 90 %) Tumor- bzw. normalem Brustgewebe. Eine differenzielle Expression des EFEMP1-Gens, die mittels Real-Time PCR festgestellt wurde, konnte bei den Mammakarzinomtumoren gezeigt werden. Bei diesen Tumoren wurde kein LOH gefunden. Zwei der 3 Tumoren, die eine eindeutige Reduktion der Expression des EFEMP1 im Vergleich zum Normalgewebe aufwiesen, zeigten klare Methylierung des putativen Promotors. Ein Tumor zeigte eine Reduktion der Expression des EFEMP1, aber keine Methylierung, was mit dem höheren Alter der Patientin zusammenhängen könnte. Bei dem Tumor, der eine Erhöhung der Expression des EFEMP1-Gens im

Vergleich zum Referenzgewebe zeigte, konnte keine Methylierung des putativen Promotors nachgewiesen werden, was den Zusammenhang zwischen der erniedrigten Expression und Methylierung des putativen Promotors nochmals bestätigt.

Reversion der Hypermethylierung mittels 5-Azacytidin-Behandlung:

Bei der DNA-Hypermethylierung besteht im Gegensatz zu Genmutationen die Möglichkeit, die inaktivierten Gene zu reaktivieren. Das 5-Azacytidin (aza-C), ein kovalenter Inhibitor der DNA-Methyltransferase, ist in der Lage, ein funktionales Imprint aufzuheben (Riggs & Jones, 1983).

Somit wurden 18 verschiedene Zelllinien (Brust-Epithel, Brustadenokarzinom, Ovarialkarzinom, Cervixkarzinom und Endometriumkarzinom) vor und nach der Behandlung mit 5-Azacytidin auf Expression des EFEMP1-Gens mittels quantitativer PCR und semiquantitativer RT-PCR (Dr. Niederacher, Frauenklinik Düsseldorf) untersucht.

Die Mammakarzinom-Zelllinie CAL-51 zeigt keine Expression des EFEMP1-Gens. Die Expression des EFEMP1-Gens wurde mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Es konnte auf RNA-Ebene eine deutliche Reaktivierung des EFEMP1-Gens in CAL-51-Zelllinien nach Behandlung mit 5-Azacytidin beobachtet werden (Dr. S. Seitz, MDC Berlin).

Außer der CAL-51-Zelllinie wurden 17 andere Zelllinien mit 5-Azacytidin behandelt, und die Expression des EFEMP1-Gens wurde mittels quantitativer PCR auf RNA-Ebene untersucht. Die Ergebnisse der Analyse waren, dass 53 % (9/17) der Zelllinien insgesamt einen Anstieg der Expression des EFEMP1-Gens nach der 5-Azacytidin-Behandlung zeigten.

Die Expression des EFEMP1-Gens wurde in den Zelllinien SiHa sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bestätigt, nach der 5-Azacytidin-Behandlung wurde ein Anstieg der Expression um 14 % in diesen Zellen auf RNA-Ebene nachgewiesen.

Zusammenfassend gab der Expressionsvergleich des EFEMP1-Gens auf RNA-Ebene zwischen den nicht behandelten Mamma-Zelllinien und den Zelllinien, die mit 5-Azacytidin behandelt wurden, einen deutlichen Hinweis auf eine Promotormethylierung des EFEMP1-Gens in den Tumor-Zelllinien.

Zusammenfassend kann auf RNA-Ebene von einer reduzierten Expression des EFEMP1-Gens im sporadischen Mammakarzinom gesprochen werden. Die Ursache für diese reduzierte Expression ist möglicherweise die Methylierung des Promotors von EFEMP-1 in sporadischen Mamakarzinomen. Allerdings können trans-Effekte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Als Nächstes stellte sich die Frage ob, die differenzielle Expression auf Proteinebene auch nachgewiesen werden kann und ob EFEMP-1 als prognostischer Marker eine Relevanz besitzt.

Proteinanalyse:

EFEMP1-Lokalisation im Mammanormalgewebe:

Um zu untersuchen, ob sich die differenzielle EFEMP1-Expression auf Proteinebene widerspiegelt, wurden zuerst 2 polyklonale Peptid-Antikörper, abgeleitet aus der humanen EFEMP1-Aminosäuresequenz, hergestellt. Bei der Untersuchung der Spezifität des Antikörpers gegen humanes EFEMP1 musste ein serumfreies Medium benutzt werden, da das EFEMP1 als ein ECM-Protein ins Medium sezerniert wird (Giltay et al, 1999).

Die kommerziellen Antikörper waren nicht spezifisch. Daraufhin wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen ein rekombinantes Maus-Efemp1-Protein an serumfreien Zellüberständen von MCF7 (Brustadenokarzinom), SiHa (Endometriumkarzinom), transfektierten EBNA 239- Zellen mit humanem EFEMP1 und transfektierten EBNA 239- Zellen mit Maus-Efemp1 getestet.

Die Bindung des murinen Efemp1 an humane Zelllinien wurde in der Literatur schon beschrieben, und aus neueren Publikationen ist bekannt, dass Antikörper gegen das Maus-Efemp1 humanes Gewebe spezifisch binden (Klenotic et al., 2004; Marmorstein et al., 2002).

Darüber hinaus zeigen die Datenbankanalysen eine 94%-Homologie zwischen dem humanen EFEMP1-Protein und dem Maus-Efemp1-Protein.

Aus quantitativen PCR-Daten war bekannt, dass MCF7 auf RNA-Ebene keine Expression von EFEMP1, hingegen SiHa auf RNA-Ebene eine starke Expression des

Gens zeigt. Die im Western-Blot nachgewiesenen Protein-Banden bestätigten nicht nur die Spezifität des Efemp1-Antikörpers in humanen Zelllinien, sondern die Bande entsprach auch dem errechneten Molekulargewicht für EFEMP1 (ca. 58 KDa) und bestätigte die auf RNA-Ebene nachgewiesenen Expressions-Daten für MCF7 und SiHa. Die transfektierten EBNA 239-Zellen mit dem humanen EFEMP1 zeigten auch eine spezifische Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht. Die Zusatz-Bande, die in der Nähe von 66 KDa erschienen ist, ist ein Produkt der posttranslationalen Modifikation, die bei den transfektierten EBNA 239-Zellen mit dem Maus-Efemp1 ebenfalls beobachtet worden ist (Dr. G. Kostka persönliche Mitteilung).

Mittels ELISA-Daten konnte auch bestätigt werden, dass der Efemp1-Antikörper das Maus-Efemp1 spezifisch bindet und keine Kreuzreaktivität mit den anderen Mitgliedern der Fibulinfamilie zeigt (Sasaki et al., Manuskript in Vorbereitung).

Über die Lokalisation des Efemp1-Proteins in Maus-Gewebe mittels Immunhistochemie war bekannt, dass es in der Basalmembran und in der extrazellulären Matrix von Zellen lokalisiert ist (Giltay et al., 1999; Timpl et al., 2003).

Mit IHC- und Immunofluoreszenzfärbungen an Paraffingewebe-Schnitten von Brustnormalgewebe konnte das Protein in der extrazellulären Matrix und im kernständigen Bereich der Epithelzelle nachgewiesen werden. Das EFEMP1-Protein ist hauptsächlich in der extrazellulären Matrix und der Basalmembran der Ducti und Lobuli lokalisiert. Hingegen färben Antikörper gegen die anderen Mitglieder der Fibuline wie das Fibulin-1 und Fibulin-5 elastische Fasern und das Bindegewebe, jedoch nicht die Milchgänge oder Milchdrüsen der Brust.

Das Vorhandensein eines Signalpeptids am aminoterminalen-Ende des EFEMP1-Proteins und seine molekulare Struktur sprechen auch für ein Protein, welches in der extrazellulären Matrix lokalisiert ist (Timpl et al., 2003; Gallagher et al., 2005).

Da bei der IHC-Färbung eine kernständige epitheliale Expression im Brustnormalgewebe zu sehen ist, kann vermutet werden, dass EFEMP1 im Kern gebildet und durch das ER und den Golgie-Apparat in die ECM transportiert wird.

Weitere IHC-Färbungen an Zellextrakten von Karzinomzelllinien bestätigten diese Vermutung. Die IHC-Färbung der SiHa- Zelllinienextrakte zeigte eine vergleichsweise schwache Färbung, während im Zellüberstand der gleichen Zelllinien im Western-Blot

und auf RNA-Ebene mittels RT-PCR eine EFEMP1-Expression nachgewiesen werden konnte.

EFEMP1-Proteinexpression im Mammakarzinom:

Neben der Beschreibung des Expressionmusters im Mammagewebe, sollte mit IHC die EFEMP1-Expression im Tumorgewebe untersucht werden. Die zuvor auf RNA-Ebene nachgewiesene differenzielle Expression von EFEMP1 konnte in dieser Arbeit in gleichem Maße auf Proteinebene nachgewiesen werden (62,5 % (5/8) der Fälle, LMU Tumorkollektiv).

Ergebnisse auf Proteinebene in einem relativ kleinen Tumorkollektiv ergaben eine mögliche Assoziation zwischen EFEMP1-Verlust und dem Tumorgrad. Die Tumorzellen zeigten eine schwache oder gar keine Färbung, während je nach Differenzierungsgrad der Tumorzellen das desmoplastische Strom teils schwach gefärbt und in den meisten Fällen negativ war.

Durch die Analyse eines TMAs mit 215 gut charakterisierten Tumoren (in Kooperation mit Dr. Nährig, TU München) konnte die Beziehung zwischen EFEMP1-Expression und anderen prognostischen Faktoren eingehender untersucht werden.

Bei der Auswertung des prognostischen TMAs wurde für über 90 % der Tumoren eine moderate bis schwache Expression und nur in 8,8 % der invasiven Brustkarzinome eine starke EFEMP1-Expression beobachtet.

Bei dieser vergleichenden Analyse konnte eine Beziehung zwischen der EFEMP1-Proteinexpression und dem Tumorgrad sowie dem HER-2-neu-Status gezeigt werden. So zeigten Tumoren mit einem niedrigen „grading“ (G1/G2) eine Tendenz zur relativ höheren EFEMP1-Expression, umgekehrt zeigten Tumoren mit einem hohen „grading“ (G3/G4) eine Tendenz zur niedrigeren EFEMP1-Expression. Diese Daten gaben einen Hinweis darauf, dass EFEMP1 progressionsassoziiert ist bzw. erst zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorentwicklung eine Rolle spielt.

Es konnte dagegen keine Korrelation zwischen Tumorklassifikation und EFEMP1-Expression beobachtet werden. Bei der CPA-Analyse scheint es, als würde die EFEMP1-Expression im Mammakarzinom am häufigsten bei invasiv-lobulären (ILC) Mammakarzinomen erniedrigt sein.

Auf Proteinebene konnte dies allerdings nicht gezeigt werden. Die Immunofluoreszenzfärbung zeigte auch hier eine stärkere Färbung im Duktus als im Lobulus, d. h. dass EFEMP1 vermutlich mehr im Duktus exprimiert wird, was eine mögliche Erklärung für die insgesamt niedrigere Expression im ILC sein könnte.

Für den HER-2-neu-Status ergab sich, dass Tumoren mit hoher HER-2-neu-Amplifikation eine Tendenz zu niedriger EFEMP1-Expression zeigen.

Das HER-2-neu-Onkoprotein ist ein transmembraner Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ. Über 25 % der invasiven Mammakarzinome zeigten eine Überexpression des HER-2-neu Onkoproteins. Wenig differenziert und undifferenzierte Tumoren und Tumoren, die eine stark positive HER-2-neu-Reaktion in der IHC zeigten, haben ein kürzeres rezidivfreies Überleben auch in unserem untersuchten Kollektiv gezeigt.

Die Überexpression des Onkogens ist in den meisten Fällen auf eine Amplifikation des HER-2-neu-Gens zurückzuführen. Eine HER-2-neu-Proteinüberexpression ohne nachweisbare Genamplifikation wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen in 3-10 % der Fälle beobachtet. Das EFEMP1-Gen besitzt eine calciumbindende EGF-ähnliche Domäne, von der vermutet wird, dass es Protein-Protein-Bindung eingehen kann (Timpl et al., 2003; Gallagher et al., 2005). Dies und die TMA-Daten aus dieser Arbeit lassen die Spekulation zu, dass das EFEMP1 in der HER-2- Signaltransduktionskaskade eine Rolle spielt. Der Verlust von EFEMP1 könnte in den Brusttumoren zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs und somit zu verstärkter Expression von Zielgenen wie dem Onkogen HER-2-neu führen.

Prognostische Bedeutung:

Um die prognostische Bedeutung von EFEMP1 in invasiven Brustkarzinomen näher zu untersuchen, wurde die Beziehung zwischen EFEMP1-Expression und tumorspezifischem Überleben an den Proben des TMAs mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet.

Alle diese Daten waren statistisch signifikant, bestätigten die Epidemiologie-Daten des Tumorzentrums München und sprachen für die Zuverlässigkeit des ausgewählten Kollektivs.

Die multivariate Regressionsanalyse ergab eine Korrelation zwischen der Überlebensrate und dem rezidivfreien Überleben und der Tumorgroße, Lymphknotenstatus und Therapie.

Patientinnen, bei denen in größerer Ausdehnung ein Tumor von einer Größe von 2 cm oder weniger diagnostiziert wurde, zeigten eine höhere Überlebensrate als Patientinnen, bei denen ein Tumor, der größer als 2 cm war, diagnostiziert wurde ($p = 0,0034$). Patientinnen, bei denen keine befallenen Lymphknoten diagnostiziert wurden und die eine Chemotherapie erhielten ($p = 0,0345$), hatten eine längere Überlebensrate als ihre Referenz-Gruppe. Auch bei der rezidivfreien multivariaten Regressionsanalyse war eine eindeutige Assoziation zwischen Tumorgroße und Lymphknoten-Status zu sehen. Patientinnen mit einem kleinen Tumor ($p = 0,0050$) und negativem Lymphknotenstatus ($p = 0,0003$) zeigten ein längeres rezidivfreies Überleben.

Für die Studie bezüglich EFEMP1 bedeutsam, war eine deutliche Tendenz zwischen der EFEMP1-Expression und der Gesamt-Überlebensrate zu erkennen. Der Verlust der EFEMP1-Expression zeigte hierbei die Tendenz zu einer kürzeren Überlebensrate, was wiederum bestätigt, dass die EFEMP1-Expression eine Rolle bei der Tumorerkrankung spielt.

Ein eindeutig statistisch signifikantes Ergebnis gab es zwischen EFEMP1-Expression und dem rezidivfreien Überleben. Patientinnen, die eine moderate bis starke Expression des EFEMP1-Proteins im Brusttumor aufwiesen, zeigten ein längeres rezidivfreies

Überleben, hingegen zeigten Patientinnen mit einer schwachen Expression des EFEMP1-Proteins ein kürzeres rezidivfreies Überleben (siehe Abb. 3.18 B).

Die Prognose-Relevanz von EFEMP1 war mit einem Wert von $p = 0,0377$ statistisch signifikant und damit eindeutig.

Die Daten aus der Literatur zeigen, dass EFEMP1 ein Bindungspartner von „tissue inhibitor of Metalloproteinase-3 (TIMP-3)“ ist. Es konnte gezeigt werden, dass TIMP3 in Mammakarzinom-Zelllinien als Tumorsuppressorgen fungiert und die Metastasierung unterbindet. TIMP3 zeigt in bestimmten Mammakarzinom-Zelllinien eine Methylierung im Promotor und ist somit inaktiv (Klenotic et al., 2004; Gagnon et al., 2003). Da TIMP3 mit dem C-terminalen Ende an EFEMP1 bindet und mit dem N-terminalen Ende an MMP3, welches eine Rolle bei der Invasion des Tumors in Mamakarzinom-Zelllinien spielt (Farina, 2002), könnte ein Zusammenhang zwischen EFEMP1 und Metastasierung im Mamamkarzinom bestehen.

Verglichen mit Daten aus anderen Literaturquellen, die Modellorganismen zum Verständnis von Tumorerkrankungen benützen, ist bekannt, dass ein anderes Mitglied der Fibulin-Familie, das *him-4* in *C.elegans*, welches das Homolog zum humanen Fibulin-6 ist, ein Target für *fos-1* ist, das zur Invasion der Zellen beiträgt (Sherwood et al., 2005). Die Vertebraten besitzen 4 *fos*-Gene. Mitglieder dieser *fos*-Gen-Familie spielen eine Rolle bei der Metastasierung von Mammakarzinom (Zajchowski et al., 2001), Prostatakarzinom (Aoyagi et al. 1998), Osteosarcom (Gamberi et al., 1998), Schilddrüsenkarzinom (Kataki et al., 2003) und kleinzelligem Lungenkarzinom (Volm et al., 1993). Auch diese Daten sprechen dafür, dass EFEMP1 als Mitglied einer Fibulinfamilie eine mögliche Rolle bei der Metastasierung spielen kann.

EFEMP1 ist ein Bindungspartner von TIMP-3, von dem bekannt ist, dass es überexprimiert in Tumorzellen zu Apoptose führt (Ahonen et al., 1998; Airola et al., 1998) und Tumorwachstum sowie Angiogenese unterbindet (Anand-Apte, 1997; Anand-Apte, 1996). Dass der Verlust von TIMP-3 bei der Invasion und der Metastasierung von Kolonkarzinom eine Rolle spielt, ist bestätigt (Powe et al., 1997).

Aus dieser Arbeit geht eindeutig hervor, dass die EFEMP1-Expression bei Brusttumoren, die schlechter differenziert sind, also in einer späteren Phase der

Tumorentwicklung sind, erniedrigt ist und dass Patientinnen mit einer erniedrigten Expression von EFEMP1 ein kürzeres rezidivfreies Überleben haben. Es kann also auch hier vermutet werden, dass EFEMP1 in einer späten Phase der Tumorentwicklung und bei der Metastasierung eine Rolle spielt.

Wenn man die Daten aus der Literatur und die Daten, die aus dieser Dissertation stammen, hinsichtlich der Prognoserelevanz von EFEMP1 (schwache Expression des EFEMP1-Proteins korreliert mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben) zusammenfasst, dann spielt das EFEMP1 als Tumorsuppressorgen in der späten Phase des Mammakarzinoms eine Rolle.

Bilanz:

Auf Grund der in dieser Arbeit generierten Daten kann die Hypothese aufgestellt werden, dass neben dem Allelverlust und der Mutation des EFEMP1-Gens in sporadischem Mammakarzinom die Methylierung des Promotors bei der Inaktivierung des EFEMP1-Gens die Hauptrolle spielt und zur reduzierten Expression des EFEMP1 in diesen Tumoren beiträgt. Unter Berücksichtigung der Methylierungsmuster der mikrodisszezierten Tumoren kann spekuliert werden, dass eine Inaktivierung des Promotors sogar beide Allele des EFEMP1-Gens betrifft und dies den Haupteffekt der Inaktivierung ausmacht. Allerdings können „trans“-Effekte nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Analyse der prognostischen Wertigkeit gibt einen Hinweis darauf, dass die Inaktivierung des EFEMP1-Gens mit dem Risiko eines Rezidivs der Krankheit korreliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion der EFEMP1-Expression in Brusttumoren auf RNA- und Protein-Ebene einen wichtigen Hinweis auf die mögliche Relevanz von EFEMP1 in der Brusttumor- Entwicklung gibt. Bisher wurde der Zusammenhang zwischen EFEMP1 und Brusttumorgenese nicht untersucht.

Für den Einsatz von EFEMP1 in diagnostischen Fragestellungen müssen allerdings noch weitere Daten in anderen Tumorkollektiven erhoben werden. Möglicherweise ist

EFEMP1 entsprechend den Ergebnissen der TMAs vor allem im späten Stadium der Tumorgenese von Bedeutung, d.h. frühere Prozesse wie Adhäsion oder Proliferation sind im Gegensatz zur Metastasierung durch das EFEMP1-Gen nicht beeinflussbar.

Zwei weitere Aspekte, die für die Bedeutung des EFEMP1 im Mamakarzinom wichtig sind, sind die Interaktion mit dem HER-2-neu-Signalweg und dem TIMP3 und MMP3.

Möglicherweise ist der Verlust von EFEMP1 mit der Deregulation von weiteren Faktoren aus dem komplexen HER-2-neu-Signalweg in der Lage, zelluläre Prozesse entscheidend zu modulieren.

EFEMP1 kann als Bindungspartner von TIMP-3 und MMP3 über einen autokrinen und/oder parakrinen Regulationsmechanismus eine indirekte Rolle bei den zellulären Prozessen wie Zellwachstum und Zellwanderung spielen. Diese ist vereinbar mit den beschriebenen Daten des EFEMP1-Gens aus der Literatur.

5. Zusammenfassung

Gynäkologische Karzinome d.h. Brust-, Ovarial- und Endometriums-Karzinome sind eine maßgebliche Todesursache bei Frauen in den westlichen Industrieländern. Deshalb hat das GCC-Konsortium eine Vielzahl von Genen, die an der Entstehung solcher Karzinome beteiligt sein könnten, identifiziert und validiert.

Mit Hilfe eines „in silico“- Ansatzes (e-Northern) konnten 600 Kandidatengene, die möglicherweise an der Initiation und/oder Progression von gynäkologischen Tumoren beteiligt sind, identifiziert werden. Davon wurden durch das Konsortium **40** für weitere Analysen ausgewählt. In Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden 18 dieser 40 Kandidatengene auf differenzielle Expression hin untersucht. Von diesen **18** Genen wurden wiederum 12 Gene (7 Tumorsuppressor-, 5 Onkogene) der Arbeitsgruppe in München (Abteilung Medizinische Genetik) für zusätzliche Untersuchungen zugeteilt (fett gedruckt). Bei sechs Genen die so genannten „Gastgene“, die andere Gruppen des Konsortiums näher charakterisierten, sollten nur Expressionsanalysen durchgeführt werden (kursiv dargestellt).

Das Expressionsverhalten der Gene in den entsprechenden Tumoren wurde mittels „Cancer Profiling Arrays“ (CPA), Microarrays (Affymetrix) und teilweise durch „Real-Time“-PCR untersucht. Von den 12 Genen, die der Münchner Gruppe zur Untersuchung zugeteilt wurden, konnte die differenzielle Expression für **sechs** Gene eindeutig bestätigt werden. Nur eines davon, **EFEMP1**, wurde letztendlich mithilfe zusätzlicher Methoden untersucht und funktionell charakterisiert. Die Expressionsanalysen wiesen darauf hin, dass es ein Tumorsuppressor für Mamma- und Ovarialkarzinome ist. Ein anderes Tumorsuppressorgen für Mamma- und Ovarialkarzinome ist **Dermatopontin**, das dort deutlich reduziert exprimiert wird. Auffällig ist vor allem die mehr als 10fache Erniedrigung der Expression in Ovarialkarzinomen. Dieses Gen bzw. Protein sollte schnellstmöglich in funktionellen „Assays“ untersucht werden. Für ein neues Gen, **Hypothetical Protein DKFZP761F214 (CCDC3)**, konnte bestätigt werden, dass es zumindest in Ovarialkarzinomen reduziert exprimiert wird. Hier sollten aber vor einer detaillierten Charakterisierung des Proteins weitere Karzinome hinsichtlich der Expression dieses Gens untersucht werden.

Das putative Onkogen **CSE1L/CAS** liegt in Chr. 20q und wird erhöht exprimiert in Mamma- und Ovarialkarzinomen. Interessanter scheint aber ein anderes putatives Onkogen zu sein, das **WFDC2**-Gen. Dieses wird aufgrund von Affymetrix-Daten in ca.

40% der Mammakarzinome (leicht) erhöht, in 70% der Ovarialkarzinome aber deutlich erhöht (>15fach) erhöht exsprimiert. Hier bietet sich eine funktionelle Untersuchung dieses Proteins in Ovarialkarzinomen an.

Bestätigt wurde der onkogene Charakter für das Gen **SLPI** in Ovarialkarzinomen. Interessanterweise zeigt dieses Gen aber eine deutlich reduzierte Expression in Mammakarzinomen.

Für das Gen **MRP14** wurde eine umgekehrte Beobachtung gemacht. Nach den Affymetrix-Expressionsdaten wird dieses Gen in ca. 80% der Tumoren deutlich erhöht, und in allen untersuchten Ovarialkarzinomen deutlich reduziert exprimiert. Damit konnte es zwar nicht als putatives Onkogen für Ovarialkarzinome aber als klar tumor-assoziiertes Gen bestätigt werden.

Das **Eplin**-Gen dagegen konnte nicht als Tumorsuppressor für Mammakarzinome bestätigt werden. Nach den Affymetrix-Daten scheint es dort eher leicht erhöht exprimiert zu werden. Allerdings könnte es ein Metastasierungsmarker sein, da es in einem „Pool“ von Metastasen deutlich reduziert erscheint. Hier ist aber die Untersuchung weiterer einzelner Metastasen erforderlich.

Bei den untersuchten „Gastgenen“ konnte die deutlich reduzierte Expression in den beiden putativen Tumorsuppressorgen *CRYAB* und *CAV-1* sowohl in den CPA- wie auch Affymetrix-Analysen gezeigt werden. Hier werden gegenwärtig von den ehemals kooperierenden Gruppen weitergehende funktionelle Analysen sowohl in Mamma- wie auch Ovarialkarzinomen durchgeführt. Bestätigt werden konnte auch die erhöhte Expression des Gens *CAPG* sowohl in Mamma- wie auch Ovarialkarzinomen. Welche Rolle dieses Protein, das zu Gelsolin-Familie gehört und PLC-gamma inhibiert, in den Mamma- und Ovarialkarzinomen spielt und ob die erhöhte Expression eine prognostische Bedeutung besitzt, sollte dringendst geklärt werden.

Umfangreiche Mutationsanalysen konnten nur an vier Genen durchgeführt werden. Dafür wurden jeweils mehr als 20 LOH-positive Tumoren benutzt. Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass Punktmutationen in putativen Tumorsuppressorgen sehr selten sind und damit die klassische Knudson-Hypothese relativiert werden muss. Nur in zwei Genen konnten überhaupt Aberrationen gefunden werden: Eine „missense“-Mutation im **Dermatopontin**-Gen (<5%), eine „frameshift“ und „missense“-Mutation im **EFEMP1**-Gen (ca. 10%). Dieses war das einzige putative Tumorsuppressorgen, in dem überhaupt in dieser Größenordnung somatische Mutationen gezeigt werden konnten.

Da damit die Mutationsfrequenz bei solchen Genen nicht sehr hoch war, wurde mit epigenetischen Analysen fortgefahren. Dafür wurde nach Interpretation der bis dahin vorliegenden Daten das **EFEMP1**-Gen ausgewählt. Tatsächlich zeigte dieses Gen in den gynäkologischen Karzinomen eine starke Expressionsreduktion im Vergleich zum entsprechenden normalen Epithelgewebe, was sowohl in den CPA- wie auch in den Affymterix-Analysen gezeigt werden konnte. Ausserdem war es das einzige Gen, auch innerhalb der 40 Gene des gesamten Konsortiums, in dem zumindest zwei somatische Mutationen identifiziert wurden. Die epigenetischen Analysen im Promoterbereich dieses Gens wiesen dann auch darauf hin, dass die Methylierung des Promotors sehr wahrscheinlich der Hauptgrund der Inaktivierung dieses Gens im sporadischen Mammakarzinom ist. Es konnte in ca. 70% der mikrodisezierten und in ca. 65% der makrodisezierten Tumoren im 5'-Ende eine Methylierung in den CpG-Inseln des putativen Promotors nachgewiesen werden. Schließlich konnte auch noch gezeigt werden, dass dieser Effekt durch Gabe von 5-Azacytidin revertierbar war. Damit war **EFEMP1** das einzige Gen, das molekular als Tumorsuppressorgen klassifiziert werden konnte.

Danach wurde ein gereinigter, polyklonaler Efemp1-Antikörper charakterisiert, um die **EFEMP1**-Expression auf Proteinebene zu analysieren. Mit Hilfe der IHC- und Immunofluoreszenz-Methode zeigte sich eine starke Expression vor allem in der extrazellulären Matrix der Ducti und Lobuli des Mammaepithels. Hingegen konnte gezeigt werden, dass die Expression in über 65% der Mammakarzinome reduziert war oder vollständig verloren gegangen ist. Mittels Analyse von „Tissue microarrays“ (TMA) konnte auch gezeigt werden, dass Patientinnen mit einer höheren Expression des Proteins im Tumor ein längeres rezidivfreies Überleben haben ($p = 0,0377$). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass EFEMP1 auch eine Rolle bei der Metastasierung spielt.

Es ist möglich, dass EFEMP1 als prognostischer Marker hilfreich für Ärzte und Pathologen sein kann und seine Bestimmung erlaubt, Brustkrebs besser zu klassifizieren und gezielter zu therapieren.

6. Literaturverzeichnis

Acevedo CM, Henriquez M, Emmert-Buck MR und Chuaqui RF (2002). "Loss of heterozygosity on chromosome arms 3p and 6q in microdissected adenocarcinomas of the uterine cervix and adenocarcinoma in situ." *Cancer*; **94** (3): 793-802.

Ahonen M, Baker AH und Kahari VM (1998). "Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells." *Cancer Res*; **58** (11): 2310-5.

Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, Baylin SB und Issa JP (1997). "Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer." *Cancer Res*; **57** (16): 3370-4.

Airola K, Ahonen M, Johansson N, Heikkila P, Kere J, Kahari VM und Saarialho-Kere UK (1998). "Human TIMP-3 is expressed during fetal development, hair growth cycle, and cancer progression." *J Histochem Cytochem*; **46** (4): 437-47.

Alberts B und Sternglanz R (1990). "Gene expression. Chromatin contract to silence." *Nature*; **344** (6263): 193-4.

Albertson DG, Collins C, McCormick F und Gray JW (2003). "Chromosome aberrations in solid tumors." *Nat Genet*; **34** (4): 369-76.

Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B und Apte SS (1996). "A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth." *Biochem Cell Biol*; **74** (6): 853-62.

Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E, Montesano R, Olsen B, Murphy G, Apte SS und Zetter B (1997). "Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3." *Invest Ophthalmol Vis Sci*; **38** (5): 817-23.

Ansari-Lari MA, Oeltjen JC, Schwartz S, Zhang Z, Muzny DM, Lu J, Gorrell JH, Chinault AC, Belmont JW, Miller W et al. (1998). "Comparative sequence analysis of a gene-rich cluster at human chromosome 12p13 and its syntenic region in mouse chromosome 6." *Genome Res*; **8** (1): 29-40.

Antequera F und Bird A (1993). "Number of CpG islands and genes in human and mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90** (24): 11995-9.

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM und Meltzer PS (1997). "AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer." *Science*; **277** (5328): 965-8.

Aoyagi K, Shima I, Wang M, Hu Y, Garcia FU und Stearns ME (1998). "Specific transcription factors prognostic for prostate cancer progression." *Clin Cancer Res*; **4** (9): 2153-60.

Aoyama A, Steiger RH, Frohli E, Schafer R, von Deimling A, Wiestler OD und Klemenz R

- (1993). "Expression of alpha B-crystallin in human brain tumors." *Int J Cancer*; **55** (5): 760-4.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (ABKD), (2004). Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, Saarbrücken.
- Attwood JT, Yung RL und Richardson BC (2002). "DNA methylation and the regulation of gene transcription." *Cell Mol Life Sci*; **59** (2): 241-57.
- Aumailley M und Gayraud B (1998). "Structure and biological activity of the extracellular matrix." *J Mol Med*; **76** (3-4): 253-65.
- Aumailley M und Krieg T (1996). "Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes." *J Invest Dermatol*; **106** (2): 209-214.
- Azarschab P, Porschen R, Gregor M, Blin N und Holzmann K (2002). "Epigenetic control of the E-cadherin gene (CDH1) by CpG methylation in colectomy samples of patients with ulcerative colitis." *Genes Chromosomes Cancer*; **35** (2): 121-6.
- Barghorn A, Speel EJ, Farspour B, Saremaslani P, Schmid S, Perren A, Roth J, Heitz PU und Komminoth P (2001). "Putative tumor suppressor loci at 6q22 and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors." *Am J Pathol*; **158** (6): 1903-11.
- Behrens P, Brinkmann U, Fogt F, Wernert N und Wellmann A (2001). "Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development." *Anticancer Res*; **21** (4A): 2413-7.
- Bender FC, Reymond MA, Bron C und Quest AF (2000). "Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity." *Cancer Res*; **60** (20): 5870-8.
- Ben-Dor A und Yakhini Z (2001). "Statistical Methods: Identification of Differentially Expressed Genes and Class Prediction Using Mutual Information and Total Number of Misclassification Analyses." *N Engl J Med*; **344** 539-48.
- Ben-Dor A, Bruhn L, Friedman N, Nachman I, Schummer M und Yakhini Z (2000). "Tissue classification with gene expression profiles." *J Comput Biol*; **7** (3-4): 559-83.
- Bieche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R und Vidaud M (1999). "Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications." *Clin Chem*; **45** (8 Pt 1): 1148-56.
- Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M und Lidereau R (2001). "Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer." *Oncogene*; **20** (56): 8109-15.
- Bingle L, Singleton V und Bingle CD (2002). "The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms." *Oncogene*; **21** (17): 2768-73.
- Bos JL (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Res*; **49** (17): 4682-9.

- Bourguignon LYW, Singleton PA und Diedrich F (2004). "Hyaluronan-CD44 interaction with Rac1-dependent protein kinase N-gamma promotes phospholipase Cgamma1 activation, Ca(2+) signaling, and cortactin-cytoskeleton function leading to keratinocyte adhesion and differentiation." *J Biol Chem*; **279** (28): 29654-69.
- Brazma A und Vilo J (2001). "Gene expression data analysis." *Microbes Infect*; **3** (10): 823-9.
- Bristol A, Hall SM, Kriz RW, Stahl ML, Fan YS, Byers MG, Eddy RL, Shows TB und Knopf JL (1988). "Phospholipase C-148: chromosomal location and deletion mapping of functional domains." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; **53 Pt 2** 915-20.
- Buday L (1999). "Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins." *Biochim Biophys Acta*; **1422** (2): 187-204.
- Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, Golub TR und Gilliland DG (1996). "The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93** (25): 14845-50.
- Chandler LA und Jones PA (1988). "Hypomethylation of DNA in the regulation of gene expression." *Dev Biol (N Y 1985)*; **5** 335-49.
- Chapman MS und Verma IM (1996). "Transcriptional activation by BRCA1." *Nature*; **382** (6593): 678-9.
- Chen P, Murphy-Ullrich JE und Wells A (1996). "A role for gelsolin in actuating epidermal growth factor receptor-mediated cell motility." *J Cell Biol*; **134** (3): 689-98.
- Chen S, Maul RS, Kim HR und Chang DD (2000). "Characterization of the human EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm) gene reveals distinct promoters for the two EPLIN isoforms." *Gene*; **248** (1-2): 69-76.
- Cho H, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DWJ und Leahy DJ (2003). "Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab." *Nature*; **421** (6924): 756-60.
- Cicek M, Samant RS, Kinter M, Welch DR und Casey G (2004). "Identification of metastasis-associated proteins through protein analysis of metastatic MDA-MB-435 and metastasis-suppressed BRMS1 transfected-MDA-MB-435 cells." *Clin Exp Metastasis*; **21** (2): 149-57.
- Colognato H und Yurchenco PD (2000). "Form and function: the laminin family of heterotrimers." *Dev Dyn*; **218** (2): 213-34.
- Courjal F und Theillet C (1997). "Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification." *Cancer Res*; **57** (19): 4368-77.
- Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, Zeillinger R, Rodriguez C und Theillet C (1997). "Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups." *Cancer Res*; **57** (19): 4360-7.
- Cui J, Rohr LR, Swanson G, Speights VO, Maxwell T und Brothman AR (2001).

"Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer." *Prostate*; **46** (3): 249-56.

Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E, Betz B, Grube S, Kreutzfeld R, Himmelfarb M, An H, Gelling S, Klamann I et al. (2005). "Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer." *J Pathol*; **205** (1): 21-8.

Dahl E, Schmitt A, Pilarsky c, Kuner R, Schäfer S und Rosenthal A (1999). „ Identificarion and characterization of 600 candidate genes associated with sporadic forms of gynecological cancers. *Clin can Research* **5**: Supplem Abstract # 0737

Deng G, Chen LC, Schott DR, Thor A, Bhargava V, Ljung BM, Chew K und Smith HS (1994). "Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer." *Cancer Res*; **54** (2): 499-505.

Devilee P und Cornelisse CJ (1994). "Somatic genetic changes in human breast cancer." *Biochim Biophys Acta*; **1198** (2-3): 113-30.

DeVitaV, Hellman S und Rosenberg S (2001). *Cancer-Principals & Practice of oncology*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers.

Devoogdt N, Hassanzadeh Ghassabeh G, Zhang J, Brys L, De Baetselier P und Revets H (2003). "Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100** (10): 5778-82.

Dobrovic A und Simpfendorfer D (1997). "Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer." *Cancer Res*; **57** (16): 3347-50.

Engelman JA, Zhang XL und Lisanti MP (1999). "Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines." *FEBS Lett*; **448** (2-3): 221-30.

Engemann S, Stroedicke M, Paulsen M, Franck O, Reinhardt R, Lane N, Reik W und Walter J (2000). "Sequence and functional comparison in the Beckwith-Wiedemann region: implications for a novel imprinting centre and extended imprinting." *Hum Mol Genet*; **9** (18): 2691-706.

Esteller M und Herman JG (2002). "Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours." *J Pathol*; **196** (1): 1-7.

Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaurs-Barriere C, Bignon YJ, Ramus S et al. (2001). "DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis." *Hum Mol Genet*; **10** (26): 3001-7.

Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA et al. (2000). "Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors." *J Natl Cancer Inst*; **92** (7): 564-9.

Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A und Mackay AR (2002). "Inhibition of human MDA-MB-231 breast cancer cell invasion by matrix metalloproteinase 3 involves degradation of plasminogen." *Eur J Biochem*; **269** (18): 4476-83.

- Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J und Reik W (1994). "Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing." *Nucleic Acids Res*; **22** (4): 695-6.
- Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP und Adams CL (1993). "Multiplexed biochemical assays with biological chips." *Nature*; **364** (6437): 555-6.
- Franks LM, Teich NM (1997). "Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer". Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Freeman WM, Robertson DJ und Vrana KE (2000). "Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis." *Biotechniques*; **29** (5): 1042-6, 1048-55.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL und Paul CL (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **89** (5): 1827-31.
- Fujii H, Zhou W und Gabrielson E (1996). "Detection of frequent allelic loss of 6q23-q25.2 in microdissected human breast cancer tissues." *Genes Chromosomes Cancer*; **16** (1): 35-9.
- Gagnon J, Shaker S, Primeau M, Hurtubise A und Momparler RL (2003). "Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and desipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells." *Anticancer Drugs*; **14** (3): 193-202.
- Gaillard M, Wolfensberger TJ, Uffer S, Mantel I, Pournaras J, Schorderet DF und Munier FL (2005). "Tomographie a coherence optique dans la Malattia leventinese." *Klin Monatsbl Augenheilkd*; **222** (3): 180-5.
- Gallagher WM, Currid CA und Whelan LC (2005). "Fibulins and cancer: friend or foe?" *Trends Mol Med*; **11** (7): 336-40.
- Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, Ragazzini P, Molendini L, Sollazzo MR, Pompetti F, Merli M, Magagnoli G, Balladelli A et al. (1998). "C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression." *Oncology*; **55** (6): 556-63.
- Gardiner-Garden M und Frommer M (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." *J Mol Biol*; **196** (2): 261-82.
- Giltay R, Timpl R und Kostka G (1999). "Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4." *Matrix Biol*; **18** (5): 469-80.
- Glaus A, Jungi W F. u. Senn HJ (1997). *Onkologie für Pflegeberufe*, Thieme Verlag.
- Glockner S, Buurman H, Kleeberger W, Lehmann U und Kreipe H (2002). "Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer." *Lab Invest*; **82** (10): 1419-26.
- Grunau C, Clark SJ und Rosenthal A (2001). "Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters." *Nucleic Acids Res*; **29** (13): E65-5.

- Guymer RH, McNeil R, Cain M, Tomlin B, Allen PJ, Dip CL und Baird PN (2002). "Analysis of the Arg345Trp disease-associated allele of the EFEMP1 gene in individuals with early onset drusen or familial age-related macular degeneration." *Clin Experiment Ophthalmol*; **30** (6): 419-23.
- Haimovici R, Wroblewski J, Piguet B, Fitzke FW, Holder GE, Arden GB und Bird AC (2002). "Symptomatic abnormalities of dark adaptation in patients with EFEMP1 retinal dystrophy (Malattia Leventinese/Doyne honeycomb retinal dystrophy)." *Eye*; **16** (1): 7-15.
- Hayden MR, Sowers JR und Tyagi SC (2005). "The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded." *Cardiovasc Diabetol*; **4** (1): 9.
- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP et al. (2001). "Gene-expression profiles in hereditary breast cancer." *N Engl J Med*; **344** (8): 539-48.
- Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Drescher C, Urban N und Hellstrom KE (2003). "The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma." *Cancer Res*; **63** (13): 3695-700.
- Hermesen MA, Joenje H, Arwert F, Braakhuis BJ, Baak JP, Westerveld A und Slater R (1997). "Assessment of chromosomal gains and losses in oral squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridisation." *Oral Oncol*; **33** (6): 414-8.
- Hillier LD, Lennon G, Becker M, Bonaldo MF, Chiapelli B, Chissoe S, Dietrich N, DuBuque T, Favello A, Gish W et al. (1996). "Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags." *Genome Res*; **6** (9): 807-28.
- Ho C, Huang P, Huang H, Chen Y, Yang P und Hsu S (2002). "Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation." *Am J Pathol*; **161** (5): 1647-56.
- Horak P, Pils D, Haller G, Pribill I, Roessler M, Tomek S, Horvat R, Zeillinger R, Zielinski C und Krainer M (2005). "Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer." *Mol Cancer Res*; **3** (6): 335-43.
- Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V und Polyak K (2005). "Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers." *Nat Genet*; **37** (8): 899-905.
- Hung M und Shen CJ (2003). "Eukaryotic methyl-CpG-binding domain proteins and chromatin modification." *Eukaryot Cell*; **2** (5): 841-6.
- Huschtscha LI, Noble JR, Neumann AA, Moy EL, Barry P, Melki JR, Clark SJ und Reddel RR (1998). "Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells." *Cancer Res*; **58** (16): 3508-12.
- Ikegawa S, Toda T, Okui K und Nakamura Y (1996). "Structure and chromosomal assignment of the human S1-5 gene (FBNL) that is highly homologous to fibrillin." *Genomics*; **3**: **5** (3): 590-2.

- Issa J und Kantarjian H (2005). "Azacitidine." *Nat Rev Drug Discov*; **Suppl S6-7**.
- Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP und O'Donovan MC (1999). "Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis." *Clin Chem*; **45** (8 Pt 1): 1133-40.
- Jones PA (2002). "DNA methylation and cancer." *Oncogene*; **21** (35): 5358-60.
- Jones PA und Baylin SB (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nat Rev Genet*; **3** (6): 415-28.
- Jones PA und Laird PW (1999). "Cancer epigenetics comes of age." *Nat Genet*; **21** (2): 163-7.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D und Gray JW (1992). "ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **89** (12): 5321-5.
- Kassis J, Moellinger J, Lo H, Greenberg NM, Kim HG und Wells A (1999). "A role for phospholipase C-gamma-mediated signaling in tumor cell invasion." *Clin Cancer Res*; **5** (8): 2251-60.
- Kataki A, Sotirianakos S, Memos N, Karayiannis M, Messaris E, Leandros E, Manouras A und Androulakis G (2003). "P53 and C-FOS overexpression in patients with thyroid cancer: an immunohistochemical study." *Neoplasma*; **50** (1): 26-30.
- Kato K, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S und Katoh H (2002). "Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage." *Cancer*; **94** (4): 929-33.
- Kim CA, Gingery M, Pilpa RM und Bowie JU (2002). "The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer." *Nat Struct Biol*; **9** (6): 453-7.
- Kleinman HK und Martin GR (2005). "Matrigel: basement membrane matrix with biological activity." *Semin Cancer Biol*; **15** (5): 378-86.
- Klemenz R, Frohli E, Aoyama A, Hoffmann S, Simpson RJ, Moritz RL und Schafer R (1991). "Alpha B crystallin accumulation is a specific response to Ha-ras and v-mos oncogene expression in mouse NIH 3T3 fibroblasts." *Mol Cell Biol*; **11** (2): 803-12.
- Klenotic PA, Munier FL, Marmorstein LY und Anand-Apte B (2004). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is a binding partner of epithelial growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1). Implications for macular degenerations." *J Biol Chem*; **279** (29): 30469-73.
- Knudson AG (1993). "Antioncogenes and human cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90** (23): 10914-21.
- Kohfeldt E, Maurer P, Vannahme C und Timpl R (1997). "Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican." *FEBS Lett*; **414** (3): 557-61.

- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G und Kallioniemi OP (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." *Nat Med*; **4** (7): 844-7.
- Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*; **227** (5259): 680-5.
- Largiader F, Sturm A, Wicki O, Von Senn HJ, Drings P, Glaus A (2001) *Checkliste Onkologie*, Thieme Verlag.
- Lecka-Czernik B, Lumpkin CKJ und Goldstein S (1995). "An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis." *Mol Cell Biol*; **15** (1): 120-8.
- Lemoine NR (1997). "Molecular advances in pancreatic cancer." *Digestion*; **58** (6): 550-6.
- Lichy JH, Zavar M, Tsai MM, O'Leary TJ und Taubenberger JK (1998). "Loss of heterozygosity on chromosome 11p15 during histological progression in microdissected ductal carcinoma of the breast." *Am J Pathol*; **153** (1): 271-8.
- Lin X, Asgari K, Putzi MJ, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS, Kumar A, Piantadosi S, DeWeese TL, De Marzo AM et al. (2001). "Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide." *Cancer Res*; **61** (24): 8611-6.
- Link CD, Taft A, Kapulkin V, Duke K, Kim S, Fei Q, Wood DE und Sahagan BG (2003). "Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model." *Neurobiol Aging*; **24** (3): 397-413.
- Liu Z, Wang L, Wang L, Lu KH, Mills GB, Bondy ML und Wei Q (2005). "Methylation and messenger RNA expression of p15INK4b but not p16INK4a are independent risk factors for ovarian cancer." *Clin Cancer Res*; **11** (13): 4968-76.
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H et al. (1996). "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays." *Nat Biotechnol*; **14** (13): 1675-80.
- Mao X, Hamoudi RA, Zhao P und Baudis M (2005). "Genetic losses in breast cancer: toward an integrated molecular cytogenetic map." *Cancer Genet Cytogenet*; **160** (2): 141-51.
- Mark HF, Aswad B, Bassily N, Taylor W, Brown S, Sun CL, Samy M, Zolnierz K, Wong E, Bland KI et al. (1999). "HER-2/neu gene amplification in stages I-IV breast cancer detected by fluorescent in situ hybridization." *Genet Med*; **1** (3): 98-103.
- Marmorstein LY, Munier FL, Arsenijevic Y, Schorderet DF, McLaughlin PJ, Chung D, Traboulsi E und Marmorstein AD (2002). "Aberrant accumulation of EFEMP1 underlies drusen formation in Malattia Leventinese and age-related macular degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99** (20): 13067-72.
- Marra MA, Hillier L und Waterston RH (1998). "Expressed sequence tags--ESTablishing

bridges between genomes." *Trends Genet*; **14** (1): 4-7.

Marra MA, Kucaba TA, Dietrich NL, Green ED, Brownstein B, Wilson RK, McDonald KM, Hillier LW, McPherson JD und Waterston RH (1997). "High throughput fingerprint analysis of large-insert clones." *Genome Res*; **7** (11): 1072-84.

Maul RS und Chang DD (1999). "EPLIN, epithelial protein lost in neoplasm." *Oncogene*; **18** (54): 7838-41.

Maul RS, Song Y, Amann KJ, Gerbin SC, Pollard TD und Chang DD (2003). "EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments." *J Cell Biol*; **160** (3): 399-407.

McGall G, Labadie J, Brock P, Wallraff G, Nguyen T und Hinsberg W (1996). "Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93** (24): 13555-60.

Mielnicki LM, Asch HL und Asch BB (2001). "Genes, chromatin, and breast cancer: an epigenetic tale." *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; **6** (2): 169-82.

Milanesi L, D'Angelo D und Rogozin IB (1999). "GeneBuilder: interactive in silico prediction of gene structure." *Bioinformatics*; **15** (7-8): 612-21.

Milner AE, Grand RJ, Vaughan AT, Armitage RJ und Gregory CD (1997). "Differential effects of BCL-2 on survival and proliferation of human B-lymphoma cells following gamma-irradiation." *Oncogene*; **15** (15): 1815-22.

Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltmann M und Kouzarides T (1997). "Transcriptional activation functions in BRCA2." *Nature*; **386** (6627): 772-3.

Mishra VS, Henske EP, Kwiatkowski DJ und Southwick FS (1994). "The human actin-regulatory protein cap G: gene structure and chromosome location." *Genomics*; **23** (3): 560-5.

Monteiro AN, August A und Hanafusa H (1996). "Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93** (24): 13595-9.

Myohanen SK, Baylin SB und Herman JG (1998). "Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia." *Cancer Res*; **58** (4): 591-3.

Niederacher D, Picard F, van Roeyen C, An HX, Bender HG und Beckmann MW (1997). "Patterns of allelic loss on chromosome 17 in sporadic breast carcinomas detected by fluorescent-labeled microsatellite analysis." *Genes Chromosomes Cancer*; **18** (3): 181-92.

O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS und McGuffin P (1998). "Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection." *Genomics*; **52** (1): 44-9.

Okamoto O, Fujiwara S, Abe M und Sato Y (1999). "Dermatopontin interacts with transforming growth factor beta and enhances its biological activity." *Biochem J*; **337** (Pt 3) 537-41.

Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K et al. (2004). "Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length

human cDNAs." *Nat Genet*; **36** (1): 40-5.

Ozaki T, Kondo K, Nakamura Y, Ichimiya S, Nakagawara A und Sakiyama S (1997). "Interaction of DA41, a DAN-binding protein, with the epidermal growth factor-like protein, S(1-5)." *Biochem Biophys Res Commun*; **237** (2): 245-50.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J und Pisani P (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." *Int J Cancer*; **94** (2): 153-6.

Paulsen M, El-Maarri O, Engemann S, Stroedicke M, Franck O, Davies K, Reinhardt R, Reik W und Walter J (2000). "Sequence conservation and variability of imprinting in the Beckwith-Wiedemann syndrome gene cluster in human and mouse." *Hum Mol Genet*; **9** (12): 1829-41.

Pawson T (1995). "Protein modules and signalling networks." *Nature*; **373** (6515): 573-80.

Powe DG, Brough JL, Carter GI, Bailey EM, Stetler-Stevenson WG, Turner DR und Hewitt RE (1997). "TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma." *Br J Cancer*; **75** (11): 1678-83.

Raizis AM, Schmitt F und Jost JP (1995). "A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation." *Anal Biochem*; **226** (1): 161-6.

Reeben M und Prydz H (1994). "An improved method for detection of 5-methylcytosine by PCR-based genomic sequencing." *Biotechniques*; **16** (3): 416-7.

Regitnig P, Moser R, Thalhammer M, Luschin-Ebengreuth G, Ploner F, Papadi H, Tsybrovskyy O und Lax SF (2002). "Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding local recurrences." *J Pathol*; **198** (2): 190-7.

Rekas A, Adda CG, Andrew Aquilina J, Barnham KJ, Sunde M, Galatis D, Williamson NA, Masters CL, Anders RF, Robinson CV et al. (2004). "Interaction of the molecular chaperone alphaB-crystallin with alpha-synuclein: effects on amyloid fibril formation and chaperone activity." *J Mol Biol*; **340** (5): 1167-83.

Remmele W und Stegner H (1987). Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweises (ER-ICA) im Mamakarzinomgewebe. *Pathologie* **8**: 138-40

Riggs AD und Jones PA (1983). "5-methylcytosine, gene regulation, and cancer." *Adv Cancer Res*; **40** 1-30.

Riopel MA, Spellerberg A, Griffin CA und Perlman EJ (1998). "Genetic analysis of ovarian germ cell tumors by comparative genomic hybridization." *Cancer Res*; **58** (14): 3105-10.

Robertson KD (2002). "DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web." *Oncogene*; **21** (35): 5361-79.

Rodriguez C, Causse A, Ursule E und Theillet C (2000). "At least five regions of imbalance on 6q in breast tumors, combining losses and gains." *Genes Chromosomes Cancer*; **27** (1): 76-84.

Rothschild CB, Akots G, Fajans SS und Bowden DW (1992). "A microsatellite polymorphism

associated with the PLC1 (phospholipase C) locus: identification, mapping, and linkage to the MODY locus on chromosome 20." *Genomics*; **13** (3): 560-4.

Russo J, Yang X, Hu YF, Bove BA, Huang Y, Silva ID, Tahin Q, Wu Y, Higgy N, Zekri A et al. (1998). "Biological and molecular basis of human breast cancer." *Front Biosci*; **3** D944-60.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science*; **239** (4839): 487-91.

Sambrook J., Fritsch E.F., et al. (1998). "Molecular Cloning: a Laboratory manual." Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbour laboratory Press.

Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1992). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." *Biotechnology*; **24** 104-8.

Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y und Rotman G (1995). "The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species." *Hum Mol Genet*; **4** (11): 2025-32.

Schere E (1984). "Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis." *Biochim. Biophys. Acta* **738**; 219-239

Schmitt AO, Specht T, Beckmann G, Dahl E, Pilarsky CP, Hinzmann B und Rosenthal A (1999). "Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues." *Nucleic Acids Res*; **27** (21): 4251-60.

Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tome P, Aggarwal A, Bajorek E et al. (1996). "A gene map of the human genome." *Science*; **274** (5287): 540-6.

Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY und Hood L (1999). "Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas." *Gene*; **238** (2): 375-85.

Schuster N und Kriegelstein K (2002). "Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis." *Cell Tissue Res*; **307** (1): 1-14.

Scotting P, McDermott H und Mayer RJ (1991). "Ubiquitin-protein conjugates and alpha B crystallin are selectively present in cells undergoing major cytomorphological reorganisation in early chicken embryos." *FEBS Lett*; **285** (1): 75-9.

Scully R, Anderson SF, Chao DM, Wei W, Ye L, Young RA, Livingston DM und Parvin JD (1997). "BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94** (11): 5605-10.

Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J und Livingston DM (1997). "Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage." *Cell*; **90** (3): 425-35.

- Sehnert B, Cavcic A, Bohm B, Kalden JR, Nandakumar KS, Holmdahl R und Burkhardt H (2004). "Antileukoproteinase: modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis." *Arthritis Rheum*; **50** (7): 2347-59.
- Selcen D und Engel AG (2003). "Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations." *Ann Neurol*; **54** (6): 804-10.
- Serra-Pages C, Kedersha NL, Fazikas L, Medley Q, Debant A und Streuli M (1995). "The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions." *EMBO J*; **14** (12): 2827-38.
- Shao N, Chai YL, Shyam E, Reddy P und Rao VN (1996). "Induction of apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1." *Oncogene*; **13** (1): 1-7.
- Sharan SK und Bradley A (1997). "Murine Brca2: sequence, map position, and expression pattern." *Genomics*; **40** (2): 234-41.
- Shawver LK, Slamon D und Ullrich A (2002). "Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy." *Cancer Cell*; **1** (2): 117-23.
- Sherwood DR, Butler JA, Kramer JM und Sternberg PW (2005). "FOS-1 promotes basement-membrane removal during anchor-cell invasion in *C. elegans*." *Cell*; **121** (6): 951-62.
- Shridhar V, Staub J, Huntley B, Cliby W, Jenkins R, Pass HI, Hartmann L und Smith DI (1999). "A novel region of deletion on chromosome 6q23.3 spanning less than 500 Kb in high grade invasive epithelial ovarian cancer." *Oncogene*; **18** (26): 3913-8.
- Sloan KE, Eustace BK, Stewart JK, Zehetmeier C, Torella C, Simeone M, Roy JE, Unger C, Louis DN, Ilag LL et al. (2004). "CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration." *BMC Cancer*; **4** (1): 73.
- Sonoda G, Palazzo J, du Manoir S, Godwin AK, Feder M, Yakushiji M und Testa JR (1997). "Comparative genomic hybridization detects frequent overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24, and 20q13 in human ovarian carcinomas." *Genes Chromosomes Cancer*; **20** (4): 320-8.
- Srikantan V, Sesterhenn IA, Davis L, Hankins GR, Avallone FA, Livezey JR, Connelly R, Mostofi FK, McLeod DG, Moul JW et al. (1999). "Allelic loss on chromosome 6Q in primary prostate cancer." *Int J Cancer*; **84** (3): 331-5.
- Stampfer MR und Yaswen P (2000). "Culture models of human mammary epithelial cell transformation." *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; **5** (4): 365-78.
- Stegner HE, Jonat W und Maass H (1986). "Immunohistochemischer Nachweis nuklearer Oestrogenrezeptoren mit monoclonalen Antikörpern in verschiedenen Typen des Mammakarzinoms." *Pathologe*; **7** (3): 156-63.
- Sternlicht MD und Werb Z (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol*; **17** 463-516.
- Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ

- und Werb Z (1999). "The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis." *Cell*; **98** (2): 137-46.
- Sun HQ, Kwiatkowska K, Wooten DC und Yin HL (1995). "Effects of CapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation." *J Cell Biol*; **129** (1): 147-56.
- Sun Hq, Lin Km und Yin HL (1997). "Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding." *J Cell Biol*; **138** (4): 811-20.
- Tasheva ES und Roufa DJ (1993). "Deoxycytidine methylation and the origin of spontaneous transition mutations in mammalian cells." *Somat Cell Mol Genet*; **19** (3): 275-83.
- Tavassoli F.A., Devilee P. (Eds.): World Health Organisation Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003.
- Thomas JG, Olson JM, Tapscott SJ und Zhao LP (2001). "An efficient and robust statistical modeling approach to discover differentially expressed genes using genomic expression profiles." *Genome Res*; **11** (7): 1227-36.
- Timpl R (1996). "Macromolecular organization of basement membranes." *Curr Opin Cell Biol*; **8** (5): 618-24.
- Timpl R und Brown JC (1996). "Supramolecular assembly of basement membranes." *Bioessays*; **18** (2): 123-32.
- Timpl R, Sasaki T, Kostka G und Chu M (2003). "Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol*; **4** (6): 479-89.
- Tomlinson I, Bodmer W (1999). "Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog". *Nat Med*. **5**(1):11-2.
- Tumova S, Woods A und Couchman JR (2000). "Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences." *J Biol Chem*; **275** (13): 9410-7.
- Tumova S, Woods A und Couchman JR (2000). "Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions." *Int J Biochem Cell Biol*; **32** (3): 269-88.
- Vogel C, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M et al. (2001). "First-line, single-agent Herceptin(R) (trastuzumab) in metastatic breast cancer. a preliminary report." *Eur J Cancer*; **37 Suppl 1** 25-29.
- Vogelstein B und Kinzler KW (2004). "Cancer genes and the pathways they control." *Nat Med*; **10** (8): 789-99.
- Volm M, Drings P und Wodrich W (1993). "Prognostic significance of the expression of c-fos, c-jun and c-erbB-1 oncogene products in human squamous cell lung carcinomas." *J Cancer Res Clin Oncol*; **119** (9): 507-10.
- Wagener C (1999). Molekulare Onkologie, Thieme Verlag.

- Wan M, Sun T, Vyas R, Zheng J, Granada E und Dubeau L (1999). "Suppression of tumorigenicity in human ovarian cancer cell lines is controlled by a 2 cM fragment in chromosomal region 6q24-q25." *Oncogene*; **18** (8): 1545-51.
- Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schafer R et al. (2001). "Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene." *Am J Pathol*; **159** (5): 1635-43.
- William M, Vien J, Hamilton E, Garcia A, Bundgaard H, Clarke RJ und Rasmussen HH (2005). "The nitric oxide donor sodium nitroprusside stimulates the Na⁺-K⁺ pump in isolated rabbit cardiac myocytes." *J Physiol*; **565** (Pt 3): 815-25.
- Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH und Lockhart DJ (1997). "Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nat Biotechnol*; **15** (13): 1359-67.
- Yang G, Timme TL, Frolov A, Wheeler TM und Thompson TC (2005). "Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression." *Cancer*; **103** (6): 1186-94.
- Yang G, Truong LD, Wheeler TM und Thompson TC (1999). "Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker." *Cancer Res*; **59** (22): 5719-23.
- Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, Beauheim C, Harvey S, Ethier SP und Johnson PH (2001). "Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells." *Cancer Res*; **61** (13): 5168-78.
- Zeller C, Hinzmann B, Seitz S, Prokoph H, Burkhard-Goettges E, Fischer J, Jandrig B, Schwarz L, Rosenthal A und Scherneck S (2003). "SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer." *Oncogene*; **22** (19): 2972-83.
- Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W und Horsthemke B (1997). "A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus." *Eur J Hum Genet*; **5** (2): 94-8.
- Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B und Doerfler W (1997). "Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method." *Hum Mol Genet*; **6** (3): 387-95.
- Zhang D, Simmen RCM, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D und Simmen FA (2002). "Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth-associated genes." *J Biol Chem*; **277** (33): 29999-30009.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celcius
5mC	5-Methy-Cytosin
AA	<u>A</u> crylamid
Acc.	<u>A</u> cesion, Nummer für Datenbankeintrag
Amp	Ampicillin
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
AS	<u>A</u> minosäuren
AT	<u>A</u> taxia <u>t</u> eleangiectasia
BAC	künstliches Bakterienchromosom (<u>b</u> acterial <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosome)
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
bp	<u>B</u> asenpaar€
BRCA1	<u>B</u> reast <u>C</u> ancer Gene <u>1</u>
BRCA2	<u>B</u> reast <u>C</u> ancer Gene <u>2</u>
BSA	(<u>b</u> ovine) Rinderserumalbumin
BST	Bisulfitbehandlung: Bisulfitbehandelt
Ca.	cirka
ca.	<u>c</u> irca
cDNA	komplementäre (<u>c</u> omplementary) <u>D</u> N <u>A</u>
Chr	Chromosom
CPG	CPG-Dinukleotd
d	Tage (<u>d</u> ays)
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	<u>D</u> iethylpyrocarbonat
dH2O	destilliertes Wasser
DHGP	<u>D</u> eutsches <u>H</u> umangenomprojekt
DHPLC	„ <u>d</u> enaturing <u>h</u> igh performance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography“
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure (<u>d</u> esoxyribonucleic <u>a</u> cid)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	2'- <u>D</u> esoxiribonukleosid-5'-triphosphat (dATP (Adenosin), dCTP (Cytidin), dGTP(Guanosin), dTTP(Thymidin))
EDTA	<u>E</u> thylendiaminotetraessigsäure (<u>a</u> cid)
EK	Endkonzentration
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	exprimierte sequenzmarkierte Stelle (<u>e</u> xpressed <u>s</u> equen <u>t</u> ag)
Ex	<u>E</u> xon
F	vorwärts (<u>f</u> orward) Primer
FDA	“Food and Drug Administration”
FKS	fetales Keble Serum
GTP	<u>G</u> uanosin- <u>T</u> riphosphat
h	Stunde (<u>h</u> our)
H ₂ O _{bd}	deionisiertes und destilliertes Wasser („bided“)
H ₂ O _d	deionisiertes Wasser („dest“)
HER-2/neu	<u>H</u> erceptin Rezeptor <u>2</u> / <u>n</u> eu
HGP	humanes Genom Projekt (<u>H</u> uman <u>G</u> enom <u>P</u> rojekt)
HUGO	The <u>H</u> uman <u>G</u> enom <u>O</u> rganisation
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galactopyranosid
kb	<u>K</u> ilobasenpaare
konz.	<u>k</u> onzentriert
l	<u>L</u> iter
LOH	<u>L</u> oss <u>O</u> f <u>H</u> eterozygosity
LS V	<u>L</u> ängenstandart <u>V</u>
m RNA	Boten-Ribonukleinsäure (<u>m</u> essenger <u>R</u> N <u>A</u>)
M	<u>M</u> olar

mA	<u>Milli</u> ampere
Mb	<u>Mega</u> basenpaare
Mb	Megabasenpaare
MCS	<u>Multiple Cloning Site</u>
min	<u>Minuten</u>
ml	<u>Milli</u> liter
mmol	<u>Milli</u> mol
NCBI	<u>Natinal Center for Biotechnology Information</u>
NF-1	<u>Neurofibromatose Typ 1</u>
ng	Nanogramm
Nr.	<u>N</u> ummer
nt	<u>N</u> ukleotid
OD	<u>Optische Dichte</u>
OMIM	<u>Online Mendelian Inheritance in Man</u>
p	kurzer Chromosomenarm (<u>p</u> etit)
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (<u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
q	Langer Chromosomenarm (<u>q</u> ueue)
R	Rückwärts (<u>r</u> evers) Primer
RNA	Ribonukleinsäure (<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
RT	<u>R</u> aumtemperatur
RT-PCR	<u>R</u> everse- <u>T</u> ranskriptase- <u>P</u> CR
RZPD	<u>R</u> essourcenzentrum/ <u>P</u> rimärdatenbank des DHGP
S.	<u>S</u> eite
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> adecyl <u>s</u> ulfate)
sec	Sekunden (<u>s</u> econds)
Sog	sogennannt
SSC	<i>Standard saline Citrate</i>
SS-DNA	Lachsspermien (<u>s</u> almon <u>s</u> perm) <u>D</u> NA
SSPE	<u>S</u> odium, <u>S</u> odium <u>P</u> hosphate <u>E</u> DTA
Tab.	<u>T</u> abelle
TAE	Tris-Eisessig-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Borat-Säure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'- <u>T</u> etramethylethylen <u>d</u> iamin
Temp.	<u>T</u> emperatur
TES	Tris-EDTA-Säure
TGF-β	transformated growth factor β
TNM	<u>T</u> umor <u>N</u> ote <u>M</u> etastasis
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (<u>u</u> nit)
U/min	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
UICC	<u>U</u> nion <u>I</u> nternational <u>c</u> ontre le <u>c</u> ancer
üN	<u>ü</u> ber <u>N</u> acht
US	“ <u>u</u> nited state,,
UTR	untranslatierte Region
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	<u>V</u> olt
Vol.	<u>V</u> olumen
W	<u>W</u> att
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid

8. Abbildungsverzeichnis

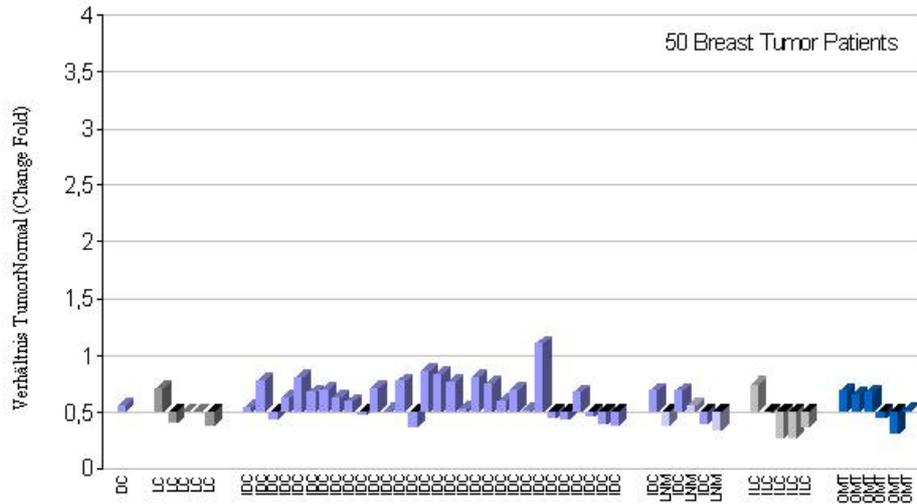
Abb. 1.1	4
Abb. 1.2	6
Abb. 1.3	14
Abb. 1.4	21
Abb. 2.1	61
Abb. 3.1	66
Abb. 3.2	66
Abb. 3.3	81
Abb. 3.4	84
Abb. 3.5	88
Abb. 3.6	92
Abb. 3.7	96
Abb. 3.8	97
Abb. 3.9	104
Abb. 3.10	105
Abb. 3.11	106
Abb. 3.12	107
Abb. 3.13	108
Abb. 3.14	109
Abb. 3.15	110
Abb. 3.16	111
Abb. 3.17	112
Abb. 3.18	113

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Chemikalien.	28
Tabelle 2.2:	Verwendete Enzyme.	29
Tabelle 2.3:	Verwendete Nährmedien für Bakterienkultur.	29
Tabelle 2.4:	Verwendete Nährmedien für Zellkultur.	30
Tabelle 2.5:	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen.	30
Tabelle 2.6:	Verwendete Puffer und Lösungen für die Hybridisierung.	31
Tabelle 2.7:	Verwendete Puffer und Lösungen für den Western-Blot.	32
Tabelle 2.8:	Verwendete Kits.	32
Tabelle 2.9:	Verwendete Komponenten in der Standard PCR.	37
Tabelle 2.10:	Berechnung der Verhältnisse der „Peak“-Flächen der beiden Allele bei der LOH.	38
Tabelle 2.11:	Die Gelbedingungen bei der LOH.	40
Tabelle 2.12:	Verwendete Puffer in der DHPLC.	41
Tabelle 2.13:	Allgemeine DHPLC-Methoden zur Reinigung der Säulenmatrix (Column Clean Up und Instrument Clean Up) sowie für den Ruhezustand (Sleep).	41
Tabelle 2.14:	Reaktionsansatz der Cycle-Sequenzierung.	42
Tabelle 2.15:	Verwendete Sequenzier-PCR-Programme.	42
Tabelle 2.16:	Verwendete Sequenzierungspuffer und Sequenziergel.	43
Tabelle 2.17:	Verwendete Komponenten in der RT-PCR-Reaktion.	44
Tabelle 2.18:	Verwendeter Ligationansatz bei der Herstellung der „full-length“-Klone.	46
Tabelle 2.19:	Verwendete Komponenten bei der Bisulfit-PCR.	49
Tabelle 2.20:	Verwendetes PCR-Programm bei Bisulfit-PCR.	50
Tabelle 2.21:	Verwendete Medien und Lösungen für die Zellkultur.	51
Tabelle 2.22:	Verwendete Gele bei der SDS-Polyacrylamid-Elktrophorese.	54
Tabelle 2.23:	Verwendete Entparaffinierungsreihe.	57
Tabelle 2.24:	Verwendete Entparaffinierungsreihe bei der ICH.	58
Tabelle 2.25:	Verwendete Computerprogramme bei der Genvorhersage.	64
Tabelle 2.26:	Allgemein verwendete Computerprogramme.	64
Tabelle 2.27:	Verwendete Computerprogramme bei der putativen Genvorhersage.	64
Tabelle 2.28:	Verwendete Computerprogramme bei der Suche nach putativen Promotorregionen.	64
Tabelle 3.1:	Ergebnisse der Untersuchung zur differentiellen Expression der Gene im Mammakarzinom und Ovarialkarzinom mittels CPA. Schwarz sind die Gene der Münchner Gruppe zugeteilt worden. Rot die Gastgene aus Düsseldorf, und Blau das Gastgen aus Bonn.	69
Tabelle 3.2:	Ergebnisse der Auswertung des ersten Datensatzes der Affymetrix-Chips.	73
Tabelle 3.3:	Ergebnisse der Auswertung des zweiten Datensatzes der Affymetrix-Chips.	78
Tabelle 3.4:	Ergebnisse der LOH-Analyse. n.b.: Nicht bearbeitet. max. Heterozygotie: Anzahl informativer Fälle/Gesamtzahl der Tumorpaae. LOH %: LOH-positive Tumore/Anzahl informativer Fälle	83
Tabelle 3.5:	Ergebnisse der Mutationsanalyse.	86
Tabelle 3.6:	Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des CAV-1-Gens in 3 mikrodisezierten Mammakarzinomen.	90
Tabelle 3.7:	Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des CAV-1-Gens in 3 mikrodisezierten Mammanormalgeweben.	91
Tabelle 3.8:	Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des SASH1-Gens in 5 mikrodisezierten Mammakarzinomen.	94
Tabelle 3.9:	Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des SASH1-Gens in 5 mikrodisezierten Mammanormalgeweben.	95
Tabelle 3.10:	Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des EFEMP1-Gens in 15 makrodisezierten Mammakarzinomgeweben.	100
Tabelle 3.11:	Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des EFEMP1-Gens in 4 mikrodisezierten Mammanormalgeweben.	101
Tabelle 3.12:	Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des EFEMP1-Gens in 4 mikrodisezierten Mammakarzinomgeweben.	102
Tabelle 3.13:	Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung des EFEMP1-Gens in 4 mikrodisezierten Mammanormalgeweben.	102
Tabelle 4.1:	Zusammenfassung der Expressionsdaten.	118

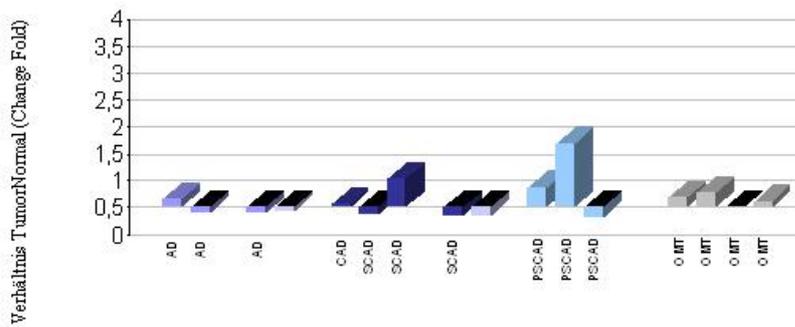
EFEMP1

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne Mammarkarzinom
 (BSP muzinöse,tubuläre, medulläre)



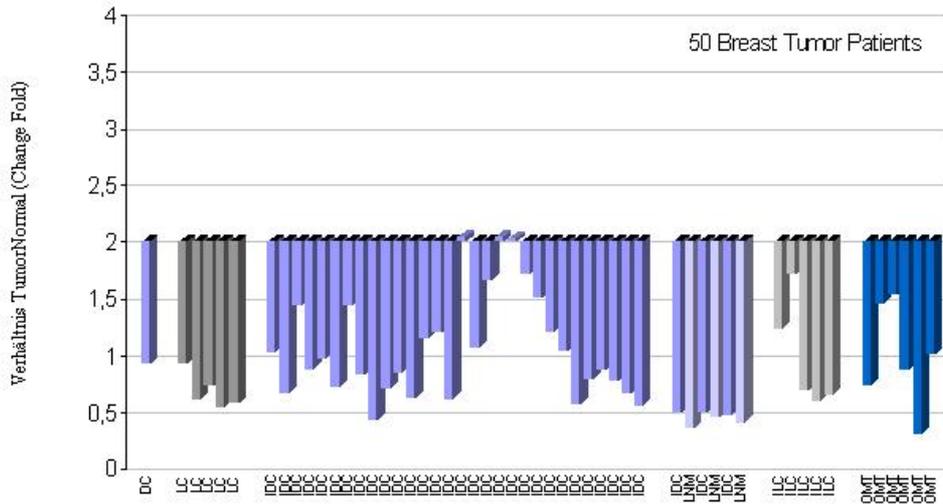
AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovarialkarzinome

14 Ovary Tumor Patients



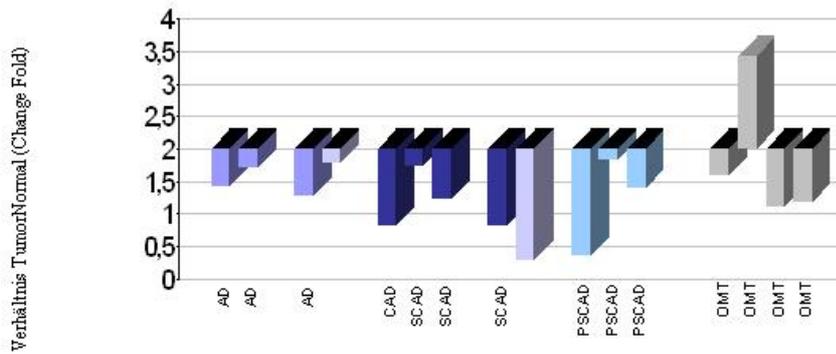
CSE1L/CAS

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne
 Mammakarzinom (BSP
 muzinöse, tubuläre, medulläre)



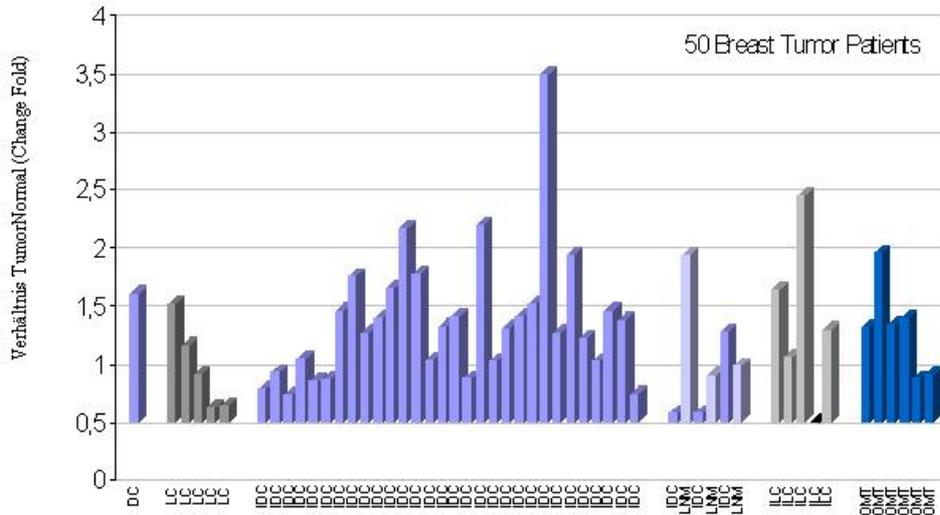
14 Ovary Tumor Patients

AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovarialkarzinome



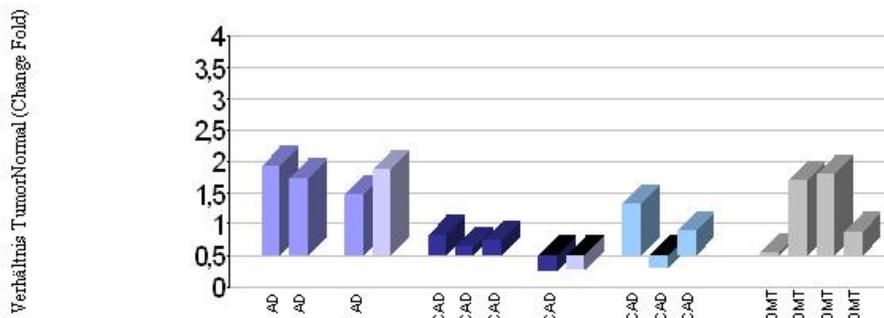
PTP1c/HCP

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne
 Mammakarzinom (BSP
 muzinöse, tubuläre, medulläre)



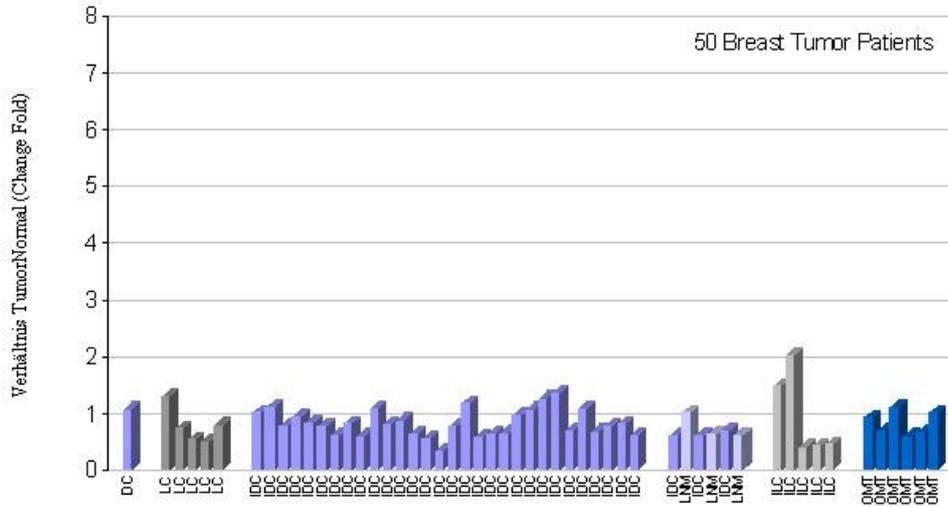
AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovariakarzinome

14 Ovar Tumor Patients



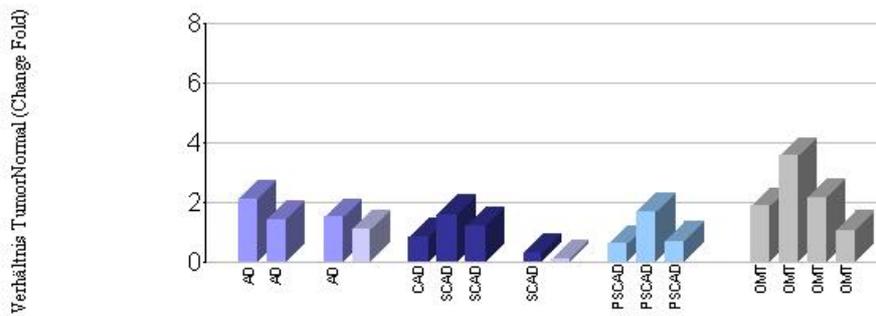
Human orthologue of mouse fsp-27

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne Mammakarzinom (BSP muzinöse, tubuläre, medulläre)



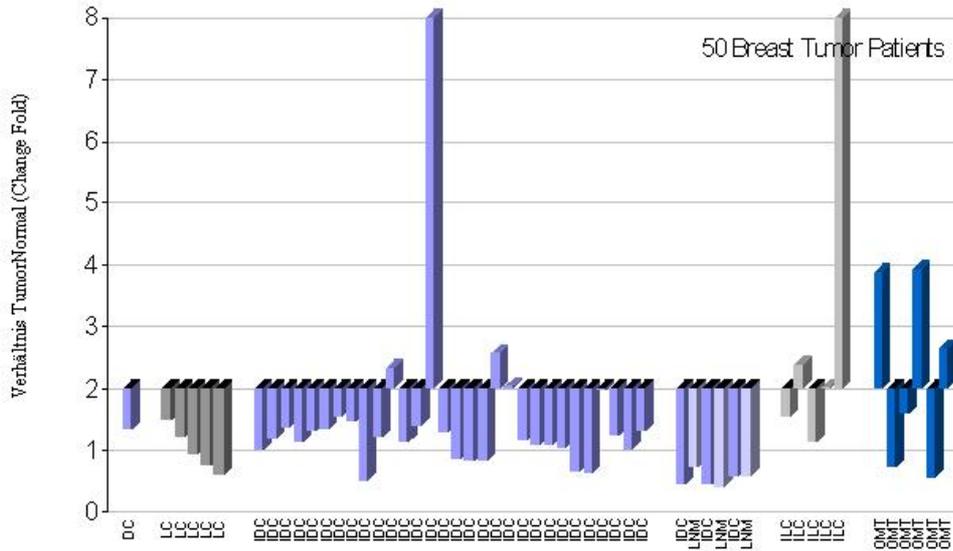
AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovarialkarzinome

14 Ovary Tumor Patients



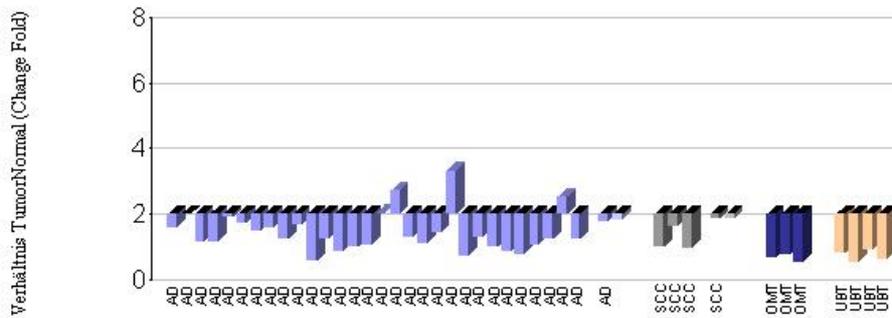
MRP-14

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne
 Mammakarzinom (BSP
 muzinöse, tubuläre, medulläre)



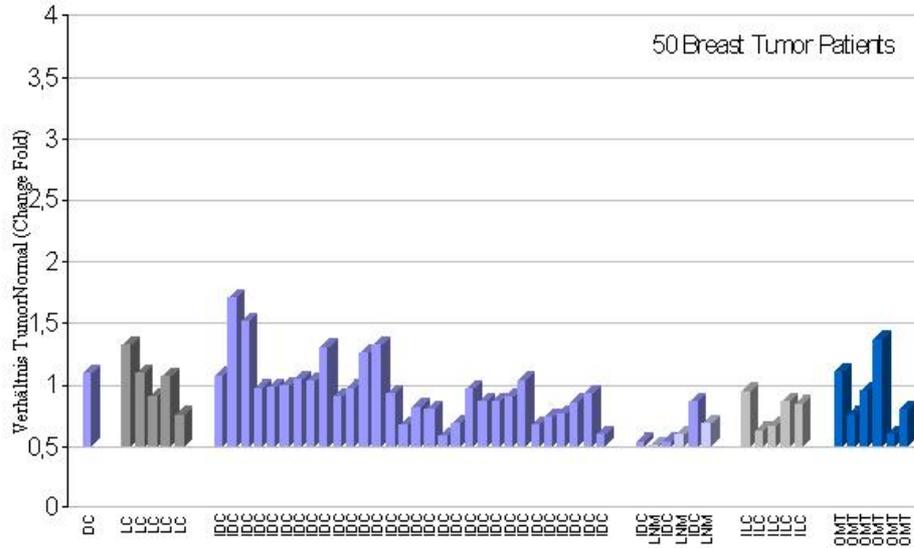
AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovarialkarzinome

42 Uterus Tumor Patients



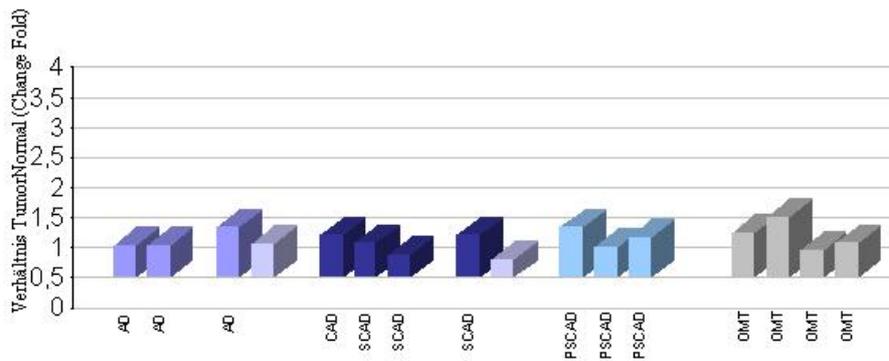
RAB5c

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne Mammarkarzinom
 (BSP muzinöse, tubuläre, medulläre)



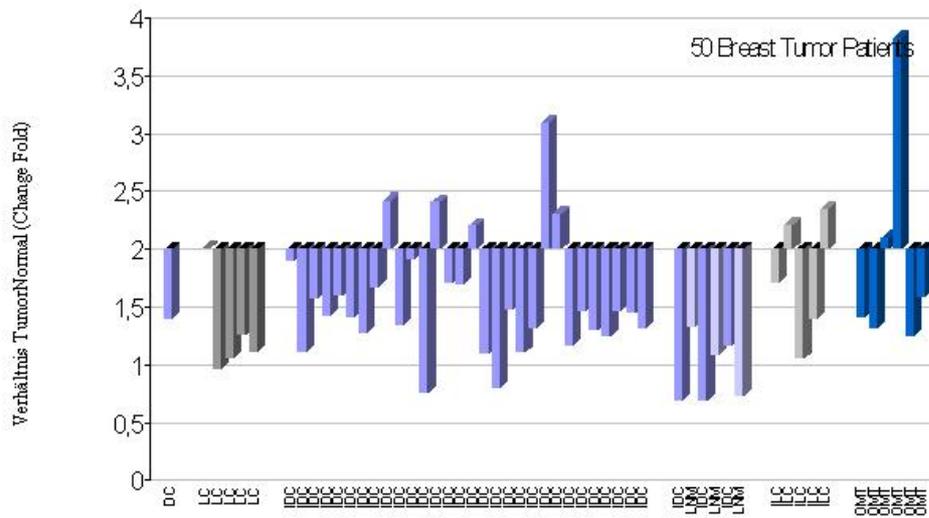
AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovarialkarzinome

14 Ovary Tumor Patients



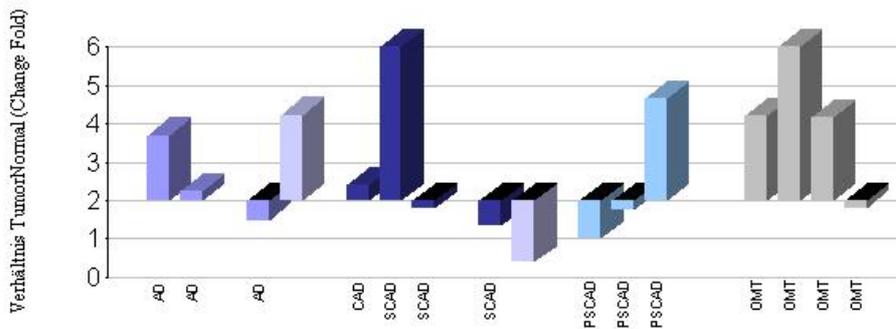
CAP G

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne Marumakarzinom
 (BSP muzinöse,tubuläre, medulläre)



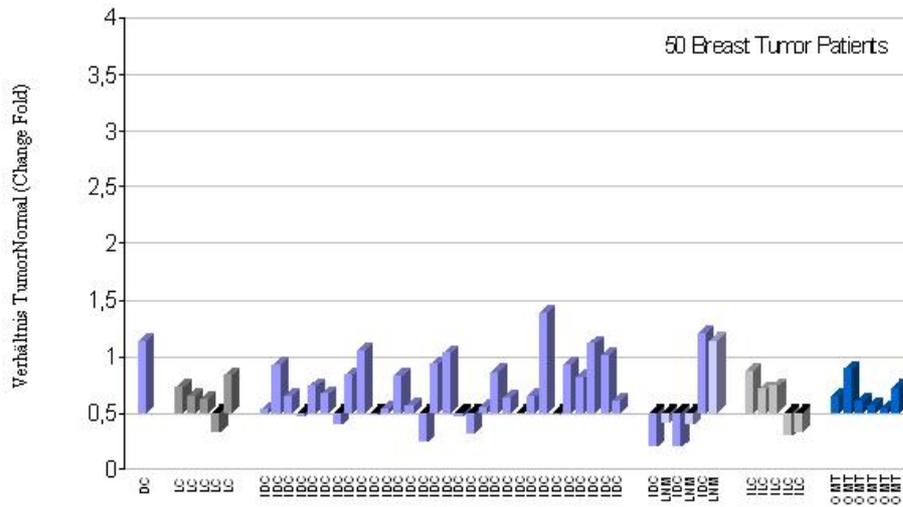
AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovarialkarzinome

14 Ovary Tumor Patients



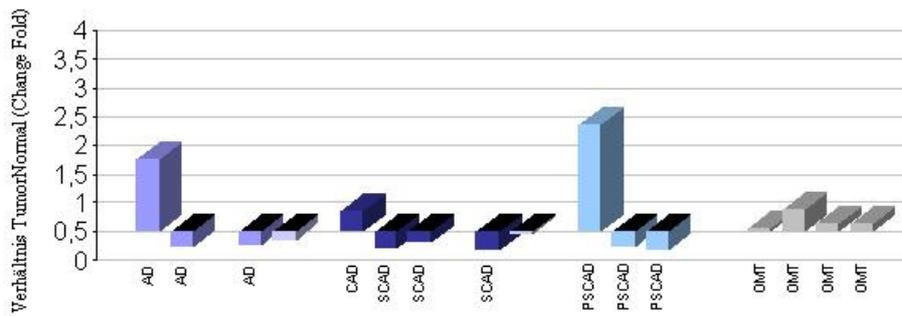
IGFBP4

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne Mammarkarzinom
 (BSP muzinöse,tubuläre, medulläre)



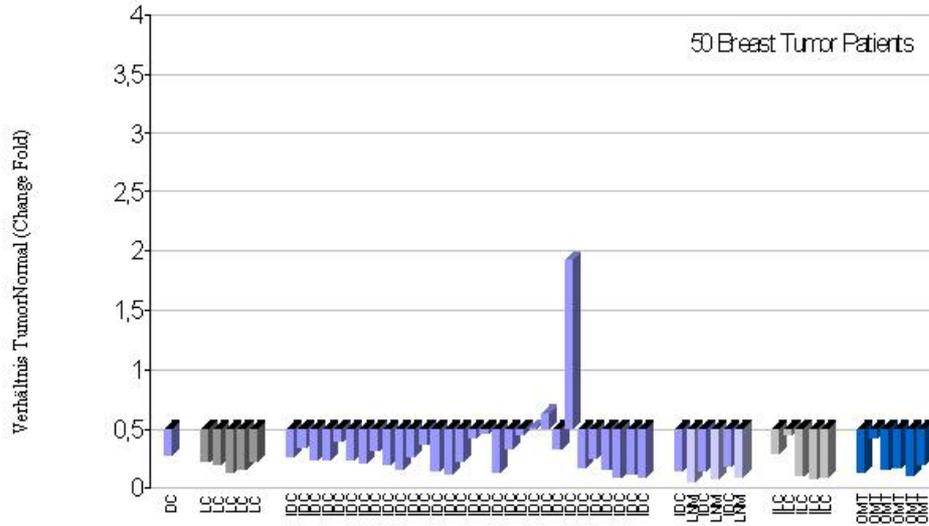
AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovarialkarzinome

14 Ovary Tumor Patients



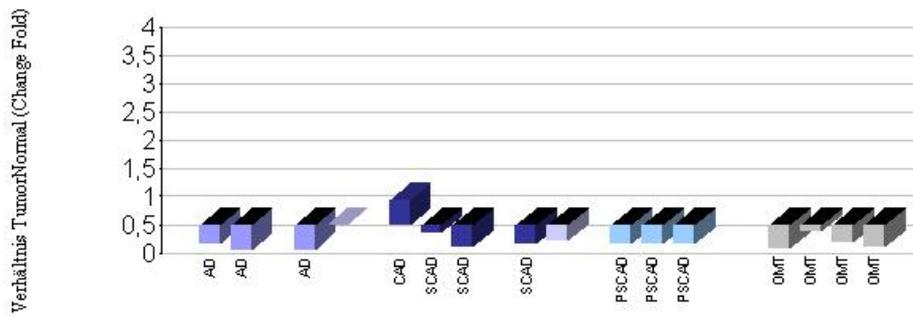
CAV-1

DC: duktale Karzinome
 IDC: invasive duktale Karzinome
 LNM: Lymphknotenmetastasen
 ILC: invasive Lobuläre Karzinome
 OMT: andere maligne Marumkarzinome
 (BSP muzinöse,tubuläre, medulläre)



AD: Adenokarzinom
 CAD: Klarzelliges Adenokarzinom
 SCAD: Squamous Adenokarzinom
 PSCAD: Papilär Seröse Karzinome
 OMT: andere maligne ovarialkarzinome

14 Ovary Tumor Patients



Tabellen a.)- c) zeigen die Primer-Sequenz und Anealling-Temperatur für die untersuchten Gene.

Exon	Primer-Sequenz	Anealling-Temperatur
2	5'-ATTGGAATGCTTGAGGTTGAAAC-3' 5'-CTAGATAATGCTTTTCAGAGAGTG-3'	57
3	5'-CTGGAAATACTGCAACATGGC-3' 5'-CTTGTGTCAGCAGATGACGTAG5-3'	57
4	5'-ATGGGTACATAATCAGATAAAAAC-3' 5'-GCACAAACTTTTCAACTCTGTG-3'	57
5	5'-TTGTCTCTTCCTGGCTAAAAC-3' 5'-CAAACAGAATCTGCCAGTTATATG-3'	57
6	5'-GCAGTTTGGCTTGGTGGTAAGAC-3' 5'-GAAAAATCAGAACTTTTGAAAAGTG-3'	58
7	5'-AAATATCAACATATTCACAACTG-3' 5'-CAATAGTTAAGGCTGCCTTC-3'	57
8	5'-GAGGTATACTAACAAGCATAG-3' 5'-CCAGATAGTGTATACTAAGCTC-3'	57

Tabelle a.): Zeigt die Primer-Sequenz und Anealling-Temperatur für die DHPLC-Analyse des Fibulin-3-Gen

Exon	Primer-Sequenz	Anealling-Temperatur
1	5'-TCAAAAACATCTGGAAGCC-3' 5'-ATTCCTTGAGAGTCTAGCAG-3'	57
2	5'-GGTCTGTGTATGTGTCAGTGTTC-3' 5'-AAGCTAGAGCACTTCCTAGG-3'	57
3	5'-GTCTTCTGTTTGCTCCAGC-3' 5'-GAAATTTTCACTTGTATTCTACG-3'	57
4	5'-TGTTTCCCCAGCAGCGATTC-3' 5'-TGTTTCCCCAGCAGCGATTC-3'	54

Tabelle b.): Zeigt die Primer-Sequenz und Anealling-Temperatur für die DHPLC-Analyse des Dermato-pontin-Gen

Exon	Primer-Sequenz	Anealling-Temperatur
2	5'-TACCACACCACTGCCAATCC-3' 5'-TGACAGGTGGCACTGTGTGC-3'	58
3	5'-GGCAATAAGCGTGAGACTTC-3' 5'-TTGGCCACAAATTCAGCTC-3'	58
4.1	5'-TTGAATGTTTCAGCAGGCAAG-3' 5'-TACTTCATGCCTGGATTCTCC-3'	56
4.2	5'-TCGTTCAAGGTCGATAATCCC-3' 5'-TAGTGCTTGAATTGGCTTTCTC-3'	58
5	5'-TTGCAAGTTGAACCTTGCGTC-3' 5'-GTTACTACTAGTGAGTACTCCC-3'	57
6	5'-ACAGAAGATATTGGCCATTAG-3' 5'-ACTCAGTGACCATCTGCTGCTGG-3'	58
7	5'-AAGAGAACAATGATGGGAC-3' 5'-AGCATCTAATTTAGAACACATGC-3'	58
8	5'-GTAGATTTCTGCAAATGAG-3' 5'-ACACCCTGAACCAAATACAG-3'	54
9	5'-ACACCCTGAACCAAATACAG-3' 5'-AGGTACAATTAGCTCTACCAG-3'	58
10	5'-TTCTAGGGTCCATCTCAAGA-3' 5'-GCCAAAGACTCCCTCTAGAG-3'	58
11.1	5'-TGAGAATGTGAAGATTTGCTAAG-3' 5'-TCTAGATCGACATCCTCAGG-3'	58
11.2	5'-TTCAGGAGGTGCCTTGGAGG-3' 5'-TCGACCAATTCAGAGACTTGG-3'	58
11.3	5'-CATAGTTTGGAGATGGAGAATG-3' 5'-ATTTTCATGCTGGGATACCTGC-3'	56

Tabelle c.): Zeigt die Primer-Sequenz und Anealling-Temperatur für die DHPLC-Analyse des Epin-Gens

Exon	Primer-Sequenz	Annealing-Temperatur
1	5'-CGTGTCCGCCTGCAGGAG-3' 5'-AAGTTTGCCAGTCGCTGG-3'	50
2	5'-CCTTTCGTTGTTGACTCTGG-3' 5'-CACATACCTCCCACTGGGC-3'	58
3	5'-GATAGTTAGGGGAATGCCTG-3' 5'-TGGGCACACAAAGGTCTGC-3'	58
4	5'-CATCTCCAGGCCTGACTG-3' 5'-TACTTAGAGGCCTGGCTAAGG-3'	58
5	5'-AGGTCAGAGGTCATGAGAAG-3' 5'-CATCTACAGACAGCCCTGG-3'	58
6	5'-CCAGGGCTGTCTGTAGATG-3' 5'-CCTAAGCAGGGCAGCAGG-3'	58
7	5'-CTAGCCTGCCTTCTTACTAG-3' 5'-CCCACCTGGATCAAGAATCG-3'	58
8	5'-TGGCTGGGAGTTGGGTTCTG-3' 5'-TGAGAGAAGCCTCCAGTCAG-3'	58
9	5'-TATGGCTGGGCTGACATTGG-3' 5'-GCGTCTAGCTCCTGGAGC-3'	58
10	5'-AACCTACCATCTTGGGTTGG-3' 5'-GAGGCAGGTAGGTATGGTC-3'	58
11	5'-TCCTTCAGGCCACCCA-3' 5'-CAACATCACCATGGTCAAGC-3'	58
12	5'-CTGTCGCTGCATTGAGTGTG-3' 5'-GAGTCTTCTGCCCTCTGTC-3'	58
13	5'-TTCCAACAGCTCACTGTGAG-3' 5'-CCCAACAGCTGAAGCCATG-3'	58
14	5'-CATGGCTTCAGCTGTTGGG-3' 5'-CTGTGAGCCAGGGTCCTC-3'	58
15	5'-TGTGAACCACGTGAGGACTG-3' 5'-TGTCAGGGGAAGGCAACAGC-3'	58
16	5'-AAGGAGGTGAGGAACCAGC-3' 5'-TCTCTGGGTGATGTGATGTC-3'	58
17	5'-TTGAGGCTCCCTCCTTGAG-3' 5'-ACCTGAGAACAGGCAGAGTC-3'	58
18	5'-CCACGAGAGCAAAGAGTGAG-3' 5'-GAGATGGCATATGAGTTGGG-3'	58
19	5'-CCCAACTCATATGCCATCTC-3' 5'-TACACACATCCAGAGACTGG-3'	58
20	5'-GCTCCAGAAACCAGTAGCTG-3' 5'-ACAGATGGCCCAGAACACAG-3'	60
21	5'-CATGCCTAAGCCAGGGTGA-3' 5'-AGCACATCACAATGCATGAC-3'	58
22	5'-TCACCCTGGCTTAGGCATG-3' 5'-GGCATGCCAAGGAGAATCTG-3'	58
23	5'-TATTTGTCCCATGCACACGG-3' 5'-TTCAGCCATCAGCTTCTCC-3'	58
24	5'-AACTCATTTGAGCCAGTGCC-3' 5'-AGCTGGAGGCCTCAGCTG-3'	60
25	5'-CATGCCAAGGTTGGCAGG-3' 5'-TTTTGCACCCACCAGGGCCC-3'	60
26	5'-CCCCAACCTTCCTGGGTG-3' 5'-GTTTCATCTGCATAGGCTTGTC-3'	60
27	5'-GGTGAGGAAGTCCCCTGTG-3' 5'-ACATAAACAGACTCCAACGGC-3'	60
28	5'-ACAGATGCTGACTGAGCCTC-3' 5'-ACTGGTGGGGAGAGGCTTGC-3'	60
29	5'-CAAGCCTCTCCCACCAGTC-3' 5'-AATGGTCTCACCTGTCTC-3'	58
30	5'-TGCAATCTTGCTGGCAGGG-3' 5'-ACTCCTCTGCACTTCTAGAG-3'	658
31	5'-TGCCAAGGTATCTGCAGCAG-3' 5'-CCCAGGGAGAAGAAACTG-3'	58
32	5'-GTAATATTGTCTGGCATTGGG-3' 5'-AGTTCGCGGCATTCTAGAAG-3'	55

Tabelle d.): Zeigt die Primer-Sequenz und Anealling-Temperatur für die DHPLC-Analyse des Phospholipase C- δ -1 Gens

Die Tabellen e.)-h.) zeigen die DHPLC-Bedingungen für die untersuchten Gene

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Temp III (°C)	Gradient [%B]	Zeit [min]
Exon 0	54	57	58	25-30, 30-39, 39-100 28-33, 33-43, 43-100 29-34, 34-43, 43-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 1a	56	58	59	30-35, 35-45, 45-100 32-37, 37-47, 47-100 33-38, 38-48, 48-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 1b1	55	58	60	51-56, 56-66, 66-100 49-54, 54-64, 64-100 47-52, 52-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon1b2	59	62	63	34-39, 39-49, 49-100 37-42, 42-52, 52-100 38-43, 43-53, 53-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 1d	56	58	60	34-39, 39-49, 49-100 36-41, 41-51, 51-100 38-43, 43-53, 53-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 1n	52	54	56	51-56, 56-65, 65-100 49-54, 54-64, 64-100 47-52, 52-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 2	59	61		47-52, 52-62, 62-100 45-50, 50-60, 60-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 3	55	59	60	49-54, 54-64, 64-100 44-49, 49-59, 59-100 43-48, 48-58, 58-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 4	55	59	60	45-50, 50-60, 60-100 44-49, 49-59, 59-100 43-48, 48-58, 58-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 5	55	58	59	45-50, 50-60, 60-100 43-48, 48-58, 58-100 43-48, 48-58, 58-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 6	56	58	59	45-50, 50-60, 60-100 44-49, 49-59, 59-100 43-48, 48-58, 58-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8

Exon 7	59	61	62	46-51, 51-61, 61-100 43-48, 48-58, 58-100 41-46, 46-56, 56-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 8	58	60		47-52, 52-62, 62-100 45-50, 50-60, 60-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8

Tabelle e: DHPLC-Bedingungen zur Analyse des Fibulin-3-Gens

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Temp III (°C)	Gradient [%B]	Zeit [min]
Exon 1	59	62	64	53-58, 58-68, 68-100 54-59, 59-69, 69-100 55-61, 61-71, 71-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 2	59	61	63	47-52, 52-62, 62-100 47-52, 52-62, 62-100 45-50, 50-60, 60-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 3	56	58	59	49-54, 54-64, 64-100 47-52, 52-62, 62-100 45-50, 50-60, 60-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 4	57	59		54-59, 59-69, 69-100 51-56, 56-66, 66-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8

Tabelle f: DHPLC-Bedingungen zur Analyse des Dermatotontin-Gens

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Gradient [% B]	Zeit [min]
Exon 2	59	/	(52-62)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 3	59	61	(48-58); (46-56)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 4.1	58	63	(55-65); (53-63)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 4.2	59	/	(51-61)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 5	60	/	(49-59)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 6	59	/	(56-66)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 7	58	/	(49-59)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 8	56	58	(43-53)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 9	60	/	(50-60)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 10	61	/	(51-61)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 11.1	57	62	(56-66); (55-65)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 11.2	60	/	(56-66)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 11.3	60	/	(53-63)	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8

Tabelle g : DHPLC-Bedingungen zur Analyse des Eplin-Gens

	Temp I (°C)	Temp II (°C)	Temp III (°C)	Gradient [%B]	Zeit [min]
Exon 1	64	65		46-51, 51-60, 60-100 45-50, 50-59, 59-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 2	60	61	62	49-54, 54-65, 65-100 48-53, 53-64, 64-100 47-52, 52-63, 63-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 3	60	61	62	50-55, 55-64, 64-100 49-54, 54-63, 63-100 48-53, 53-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 4	62	63		47-52, 52-61, 61-100 46-51, 51-60, 60-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 5	62	65		47-53, 53-62, 62-100 44-50, 50-59, 59-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 6	61	63		51-56, 56-65, 65-100 49-54, 54-63, 63-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 7	61	63		49-54, 54-63, 63-100 47-52, 52-61, 61-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 8	62	63		49-54, 54-63, 63-100 48-53, 53-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 9	61	62	64	51-56, 56-65, 65-100 50-55, 55-64, 64-100 48-53, 53-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 10	61	62		49-54, 54-63, 63-100 48-53, 53-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 11	62	65		49-54, 54-63, 63-100 46-51, 51-60, 60-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 12	62	65		50-55, 55-64, 64-100 49-54, 54-63, 63-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 13	61	63		51-56, 56-65, 65-100 49-54, 54-63, 63-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 14	61	63		50-55, 55-64, 64-100 49-54, 54-63, 63-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 15	61	62	63	50-55, 55-64, 64-100 51-54, 54-63, 63-100 48-53, 53-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 16	61	64		52-57, 57-66, 66-100 49-54, 54-63, 63-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 17	62	64		51-56, 56-65, 65-100 49-54, 54-63, 63-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 18	63	65		47-52, 52-61, 61-100 44-49, 49-58, 58-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 19	61	63		52-57, 57-66, 66-100 50-55, 55-64, 64-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8

Exon 20	60	63		50-55, 55-64, 64-100 47-52, 52-61, 61-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8;
Exon 21	61	62		48-53, 53-64, 64-100 47-52, 52-63, 63-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 22	62	64		49-54, 54-63, 63-100 47-52, 52-61, 61-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 23	61	64		48-53, 53-62, 62-100 45-50, 50-59, 59-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 24	62	64		52-57, 57-66, 66-100 50-55, 55-64, 64-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 25	62	64		49-54, 54-63, 63-100 47-52, 52-61, 61-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 26	61	63		52-57, 57-66, 66-100 50-55, 55-64, 64-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 27	63	65		48-53, 53-64, 64-100 46-51, 51-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 28	61	63		50-55, 55-64, 64-100 48-53, 53-62, 62-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 29	60	63		49-54, 54-63, 63-100 46-51, 51-60, 60-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 30	61	63	65	49-54, 54-63, 63-100 47-52, 52-61, 61-100 45-50, 50-59, 59-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 31	62	64		52-57, 57-66, 66-100 50-55, 55-64, 64-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8
Exon 32	63	66		46-51, 51-60, 60-100 43-48, 48-57, 57-100	0,0; 0,1; 5,1; 5,2; 5,7; 5,8; 7,8

Tabelle h: DHPLC-Bedingungen zur Analyse des Phospholipase C- δ -1

Tabelle i und j zeigen die PCR- Bedingungen und Primer Sequenz für die LOH-Analyse.

F3-Marker und F2- Marker (Fibulin-3)	94°C	10 min	} 35 ×
	94°C	30 sec	
	58°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
	72°C	10 min	
D1-Marker und B1-Marker: (Phospholipase-C- γ -1 und Dermatopontin)	4°C	5 min	} 35 ×
	94°C	10 min	
	94°C	30 sec	
	60°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
E1-Marker (Eplin)	72°C	10 min	} 35 ×
	4°C	5 min	
	94°C	10 min	
	94°C	30 sec	
	60°C	30 sec	
	72°C	30 sec	} 35 ×
	72°C	20 min	
	4°C	5 min	

Tabelle i: PCR-Programme für die LOH-Marker

Marker	Primer-Sequenz
F3- Marker	5'-GTAGTCCCAGCTACTCAGAG-3' 5'Cy5-AAGCTGGCTTCAAAATTTGGG-3'
F2- Marker	5'-GTAAGTCTTAATGCCTTACC-3' 5'Cy5-CTGGGCAACAGAGTGAGAC-3'
D1- Marker	5'-TGCCTCCCATTTTCCAGCC-3' 5'Cy5-AGAAAGACAGCCCCTTCCC-3'
B1- Marker	5'-CACCTGTTCTGCCTTCAAC-3' 5'Cy5-CTGCTGTCATCCCCCTCC-3'
E1- Marker	5'-TCAGTTGACGAACATTTGTGTAC-3' 5'Cy5-GAGTTACCATGGGATCCAGCA-3'

Tabelle i: Primer-Sequenz für die LOH-Marker

Tabelle k zeigt die Primer -Sequenz für die BST-PCR der einzelnen Kandidatengene.

Marker	Primer-Sequenz
EFEMP-1:	
AF1 AR1	5'-TGTTGGATGGGTATGTGTGTG -3' 5'CCCCAACACAAACTCTCAAAA -3'
AF2 AR2	5'-TATTTGGATTTTATAGGAGTTGGTTAGA-3' 5'-CTCTTTTTTCTTATCAATCTAAATCCC-3'
BF1 BR1	5'-AATTGTTTTGGATTGTGTAGGGTGTTT-3' 5'-5'-CTCTTTTTTCTTATCAATCTAAATCCC-3'-3'
BF2 BR2	5'-AGGGAGGTGGAGGTGTGTAGTTT-3' 5'-ATAAAAACCCCTTTCTTAACAACAAAC-3'
Caveolin-1:	
BF BR	5'-TGTGTATTTTGAAATATGGTATAATTTG-3' 5'-CCATCTCTACCTTAAAACACAT-3'
AF AR	5'-GGATAGGGTAGGATTGTGGATT-3' 5'-CACATCCCCAAAATTCTAACA-3'
SASH1:	
A1F A1R	5'-GTGGGTTTAATTGTTTTTGGG-3' 5'-AAAATAAATTACCCAATAAATAAC-3'
A2 F A2 R	5'-GGATTTTGTTTTTTGTATTFTTGTGT-3' 5'-CCAAATAACTTACCAAAATACCCAT-3'
B1F B1R	5'-TGTTTAAGTTTTTATATTTGTTTTGT-3' 5'-CCCAAAAACAATTAACCCAC-3'
B2F B2R	5'-GAGGTAGGATTTGTAATTTTT-3' 5'-AAAACCAACTAACTAAAACAC-3'

Tabelle k: Primer -Sequenz für die BST-PCR.

Danksagung

Diese Dissertation entstand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alfons Meindl in der Abteilung Medizinische Genetik der LMU München in der Zeit von Juni 2001 bis Dezember 2005.

Prof. Dr. Thomas Cremer danke ich sehr für seine Bereitschaft, meine Dissertation vor der Fakultät für Biologie der LMU zu vertreten. An dieser Stelle möchte ich mich ausdrücklich für sein entgegengebrachtes Vertrauen herzlich bedanken.

Meinem Projektleiter Prof. Dr. Alfons Meindl möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine Betreuung und Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Forschung während der Zeit meiner Promotion danken.

Prof. Dr. Jahn Murken danke ich sehr für die Schaffung der Arbeitsbedingungen, dass ich meine Arbeit in der Abteilung „Medizinische Genetik“ durchführen durfte. Für sein Interesse sowie seine Hilfestellungen möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich möchte mich bei den Mitgliedern des GCC-Konsortiums und der Arbeitsgruppe von Prof. Meindl für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und Motivation während der 4 Jahre der Anfertigung dieser Arbeit bedanken, besonders bei Dr. E. Dahl, Dr. E. Klopocki, Dr. M. Himmelfarb, Dr. S. Größl, Dr. D. Niederacher, Dr. B. Betz, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmutzler, Dipl. Biol. R. Kreuzfeld Prof. N. Arnold, Dr. J. Ramser und Dr. E. Große ALM Biol. M R. Dufault.

Für die Kooperation im Bereich der TMAs möchte ich mich bei Dr. Jörg Nährig herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Ortrud. Steinlein und ihrer Arbeitsgruppe, Frau. Dr. Seidl und Frau Dr. Wirtz im Institut für Humangenetik in München dafür, dass ich meine Arbeit dort beenden konnte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr A. Lebeau und Prof. U. Löhrs von dem Pathologischen Institut der LMU München für die Bereitstellung der Materialien und die Zusammenarbeit bei der IHC-Färbung.

Der Arbeitsgruppe von Prof. S.Scharneck am MDC in Berlin, Frau Dr. S. Seitz und Frau Constanze Zeller möchte ich für die Bereitstellung der Zelllinien und der Chip-Daten danken.

Herrn. Dr. G. Kostka, Frau Dr. T Sasaki und Frau C. Went am MPI für Biochemie gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Antikörpers und der IHC-Färbungen und für die Unterstützung während dieser Zeit.

Bedanken möchte ich mich bei Dipl. Math. R. Busch im Statistik-Institut an der TU München für die Statistikenarbeiten.

Dem MVZ für Humangenetik, Frau Dr. med. Dr. rer. nat C. Nevinny-Stickel-Hinzpeter und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für das Verständnis, welches mir entgegengebracht wurde während des Zusammenschreibens des Manuskriptes.

Großer Dank gebührt Frau Dr. Y. Mehraein und Herrn. Prof. Dr. P. Mehraein für ihre wissenschaftlichen Anregungen und die Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dipl. Ing. Gehard Compostella danke ich für dass genaue und für mich sehr hilfreiche Korekturlesen meines Manuskriptes.

Herren Dipl. Betriebsw. Ali Er danke ich die für Unterstützung bei computerbedingten Problemen und bei der Gestaltung der Arbeit.

Mein tiefster Dank gebührt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in allen meinen Wegen und Entscheidungen vom Studienbeginn bis hin zur Dissertation unterstützt haben.

Meinem Mann und seiner Familie danke ich für die Unterstützung und die Geduld, die sie mir während der Zeit meiner Arbeit an der Dissertation entgegen gebracht haben.

Lebenslauf

Name:	Ariane Sadr-Nabavi
Geburtsdatum:	3. Juli 1975
Geburtsort:	Frankfurt am Main, Deutschland
Familienstand:	Verheiratet
Institutsanschrift:	MVZ für Humangenetik Josephspitalstraße. 15 80331 München
Schulbildung:	
1982-1987	Grundschule Ajentarbieat Maschhad-Iran
1987-1990	Mittelschule Isar Maschhad-Iran
1990-1994	Gymnasium Kosar, Maschhad-Iran
1994	Abitur, naturwissenschaftlich/mathematischer Zweig, Maschhad, Iran
1994- 1995	Abschluss der deutschen Hochschulreife in München Bayrisches Abitur
Studium:	
1994/1995	Studium der Biologie, LMU-München
1998	Vordiplomprüfung
2000	Ablegung der mündlichen Diplomhauptprüfung in Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik Nebenfach: Biochemie, Immunologie und Genetik
09/ 2000	Beginn der Diplomarbeit in der Abteilung Medizinischen Genetik der LMU-München
05/ 2001	Abschluss als Diplombiologin
06/ 2001	Doktorand in der Abteilung Medizinische Genetik, LMU- München, DNS-Labor, (Betreuer Prof. A. Meindl, TU- München)
04/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Humangenetik in München

Veröffentlichungen, Poster, Seminare und Vorträge:

Veröffentlichungen:

Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E, Betz B, Grube S, Kreutzfeld R, Himmelfarb M, An H, Gelling S, Klaman I et al. (2005). "Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer." *J Pathol*; 205 (1): 21-8.

Sadr-Nabavi A, Betz B, Kreutzfeld R, Niederacher D, Schmutzler R.K., Dahl E, and Meindl A. "The *EFEMP* gene is downregulated in a substantial portion of breast cancer samples due to methylation." *Manuskript in Vorbereitung*

Members of the Consortium 'Hereditary Breast and Ovarian Cancer of the Deutsche Krebshilfe' G. Bastert, H.G. Bender, M.W. Beckmann, H. Caffier, C. Crohns, J. Deininger, J. Dietl, N. Ditsch, W. Distler, L. Estevez-Schwarz, U.Hahn, H. Hepp, N. Herröder, V. Hübbel, C. Hüttner, C. Jackisch, W. Jonat, M. Kandl, K. Kast, M. Kaufmann, A. Kempe, M. Kiechle, Kreienberg, B. Kuschel, H. Luck, G. von Minckwitz, C. Nestle-Krämling, B. Prieshof, K. Rensing, K. Rhiem, M. Schäffer, R.K. Schmutzler, U. Schwarz-Boeger, L. Straub, M. Untch, T. Volm; Arbeitsgruppe 'Humangenetik': C.R. Bartram, K. Bosse, I. Debatin, B. Fischer, U. Froster, D. Gadzicki, T. Goecke, T. Grimm, W. Grote, L. Harder, D. Horn, J. Horst, F. Kreuz, U. Langenbeck, T. Neumann, I. Nippert, P. Propping, D. Schäfer, B. Schlegelberger (Sprecherin), D. Schmidt, J. Schröder, R. Siebert, K. Sperling, S. Streng, W. Vogel, T. Voigtländer, B. Welling; Arbeitsgruppe 'Molekulargenetik': J. Arnemann, B. Betz, K. Bandick, I. Bendig, B. Dworniczak, E. Eberhardt, W. Hofmann, K. Kast, R. Klaes, A. Kujat, A. Meindl, D. Niederacher, S. Preissler-Adams, Sadr-Nabavi A, S. Scherneck, R.K. Schmutzler, B. Wappenschmidt, B.H.F. Weber; Arbeitsgruppe 'Psychoonkologie': I. Bodnar, R. Dahlbender, H. Faller, D. Fuchs, K. Gebhardt, W.D. Gerber, A. Gonnermann, Ch. von der Groeben, P. Henningsen, S. Hoppe, J. Jordan, A. Rohde, A. Sundermeier, A. Vodermaier, U. Wagner (2003). "Women's Experiences of Undergoing BRCA1 and BRCA2 Testing: Organisation of the German Hereditary Breast and Ovarian Cancer Consortium". "Survey and Preliminary Data from". "*Community Genet*": 249-258.

Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E, Betz B, Grube S, Kreutzfeld R, Himmelfarb M, Gelling S, Klaman I, Hinzmann B, Kristiansen G, Grützmann R, Kuner R, Petschke B, Rhiem K, Wiechen K, Sers C, Wiestler O, Schneider A, Höfler H, Nhörig J, Dietel J, Schäfer R, Rosenthal A, Schmutzler R, Dürst M, Niederacher D, Meindl A (2004) Hochdurchsatz-Identifizierung und molekularbiologische Charakterisierung von Genen, die im Mammakarzinom differentiell exprimiert werden. "*Onkologie*" ;27(suppl 2):1-66

Straub J., Rühl I., Ditsch N., Sadr-Nabavi A., Vodermaier A., Meindl A., Untch M., (2004) „Hereditäres Mamakarzinom. *Diagnostik und Therapie des Mamakarzinoms-State of the Art*“. W.Zukschwert Verlag München. Wien .New York

Poster:

Sadr-Nabavi A., M.Du., B.Betz., D.Schmidt., E.Dahl., S.Gelling., B.Heinzmann., R.Kreutzfeld., R.,Schmutzler., A.Meindl.,D. Niederacher.(2002 May 25-29) "Characterization of differentially expressed candidate genes associated with gynaecological tumors ". European Human Genetics Conference 2002, Strasbourg, *Eur. J. Hum. Genet.* **10** (Suppl. 1): 109.

Betz,Beate., Czystowska, Malgorzata., Heimerzheim, Torsten.,Sadr-Nabavi, A., Meindl, Alfons.,Dahl, Edgar.,Neideracher, Dieter. (2003 May 25-28)“ Investigation of differentially expressed candidate genes in gynecological tumors“.Genomics and Cancer, *Integrating Genomics and Clinical Research*, Heidelberg, Germany.

Dahl,E.,Betz,B.,Dietel.M., Dürst.M., Meindl., Gelling.S., Größl.S., Grützmann.R.,Himmelfarb.M., Hinzmann.B., Höfler.H., Klopocki.E., Kreutzfeld.R., klaman.I., Rhiem.K., Kristiansen G., Kuner.R., Pilarsky.C., Rosenthal.A., Sadr-Nabavi.A., Schäfer.R., Schmitt.A., Schmutzler.R. Schneider. A., Specht.T, Wiestler.O, Niederacher.D, Meindl.A. (2003 May 25-28) “Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in gynecological cancer“.Genomics and Cancer, *Integrating Genomics and Clinical Research*, Heidelberg, Germany.

Seminare und Vorträge:

- | | |
|--------------|--|
| Juni 2001 | <u>Sadr-Nabavi A.</u> Abschlussbericht Diplomarbeit, Abteilung Medizinische Genetik, Kinderpoliklinik, der LMU; Institut für Humangenetik. Goethestraße 29. 80331 München. |
| Januar 2002 | <u>Sadr-Nabavi A</u> Journal Clubs” und “Progress Reports”, Abteilung Medizinische Genetik, Kinderpoliklinik, der LMU; Institut für Humangenetik. Goethestraße 29. 80331 München. |
| Oktober 2002 | <u>Sadr-Nabavi A.</u> TP3 (Gruppe Meindl) Überblick zu den in München validierten Kandidatengenen metaGen Pharmaceuticals GmbH, Oudenarder Str. 16, D-13347 Berlin Aufgang 9; Raum 325 |
| April 2003 | <u>Sadr-Nabavi A.</u> Das bn-40 gen ist in Sporadischen Mamakarzinom Inaktiviert metaGen Pharmaceuticals GmbH, Oudenarder Str. 16, D-13347 Berlin Aufgang 9; Raum 325 |

- Juni 2003 Sadr-Nabavi A Wiesenschaftskonforenz der Frauenklinik am Klinikum rechts der Isar an der Technischen Universität München.
Ismaninger Str. 22, 81675 München, Seminarraum II.
- Oktober 2003 Sadr-Nabavi A, Der Promotor des bn-40 gen ist in Sporadischen Mamakarzinom Inaktiviert. metaGen Pharmaceuticals GmbH, Oudenarder Str. 16, D-13347 Berlin Aufgang 9; Raum 325
- November 2003 Sadr-Nabavi A “PhD Progress Report”, an der Frauenklinik am Klinikum rechts der Isar. der Technischen Universität München.
Ismaninger Str. 22, 81675 München, Seminarraum II
- Dezember 2003 Sadr-Nabavi A , “Genetic Basis of Sporadic Gynecological carcinomas“. 2nd Iranian Congress of genetic Disorders & Disabilities. Tehran-Iran
- April 2004 Sadr-Nabavi A. Das Kandidategen Fibulin-3. Institut für Pathologie. Pauwelsstraße 30. 52074 Aachen. Seminar Raum 2
- März 2005 Sadr-Nabavi A. The Role of EFEMP1and Identification of Candidate Genes in Sporadic Breast Cancer. Ludwig-Maximilians-Universität München Department Biologie II Großhaderner Str. 2 82152 Planegg-Martinsried Raum B03:45