

Aus der Chirurgischen Klinik des
Akademischen Lehrkrankenhauses Marienhospital Euskirchen
- Chefarzt Prof. Dr. med. Hans Schwering -

In Kooperation mit der Abteilung für Frauenheilkunde und Gynäkologische Onkologie der Klinik und Poliklinik für
Geburtshilfe und Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Bonn,
- Direktor Prof. Dr. med. W. Kuhn, -

**Molekulargenetische Untersuchungen zur Pathogenese
des Mammakarzinoms:
Untersuchungen zur Beteiligung des Kandidatengens MGEA5 auf dem Chromosom 10
an der Pathogenese des sporadischen Mammakarzinoms**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von

Kirsten I. M. Timpert

aus München

2003

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Referent: Prof. Dr. med. H. Schwering

2. Referent: Prof. Dr. med. P. Preusser

Am Tag der mündlichen Prüfung vertreten durch Prof. Dr. med. H. M. Loick

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2003

Aus der Chirurgischen Klinik des
Akademischen Lehrkrankenhauses Marienhospital Euskirchen
- Chefarzt Prof. Dr. med. Hans Schwering -

In Kooperation mit der Abteilung für Frauenheilkunde und Gynäkologische Onkologie der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und
Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Bonn, - Direktor Prof. Dr. med. W. Kuhn -

1. Referent: Prof. Dr. med. H. Schwering

2. Referent: Prof. Dr. med. P. Preusser

Zusammenfassung:

**Molekulargenetische Untersuchungen zur Pathogenese des Mammakarzinoms:
Untersuchungen zur Beteiligung des Kandidatengens MGEA5 auf dem Chromosom 10
an der Pathogenese des sporadischen Mammakarzinoms**

Doktorandin: Timpert, Kirsten I. M.

Das Mammakarzinom stellt in den westlichen Ländern die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar. In Deutschland erkranken jährlich 46.000 Frauen, 18.000 deutsche Frauen versterben pro Jahr an dieser Erkrankung. Der Erkrankungsgipfel des Brustkrebses liegt zwischen 45 und 75 Jahren. Eine kurative Therapie zeigt im metastasierten Stadium der Erkrankung keine Erfolge mehr. Tumorprogression und Metastasierung des Brustkrebses bedingen die meisten Todesfälle.

Aus diesem Grund ist eine frühe und zuverlässige Diagnostik bzw. die Kenntnis genetischer Prädispositionen für die Entstehung des Brustkrebses mittels neuer molekulargenetischer Marker von großer Bedeutung in der Bekämpfung des Brustkrebses und der gezielten Therapieplanung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit molekulargenetischen Analysen zur Tumorgenese des sporadischen, d.h. zufällig auftretenden, nicht familiären, Mammakarzinoms. Das Kandidatengen MGEA5 auf Chromosom 10q24.1-q24.3, dem bereits onkogenes Potential bei der Pathogenese anderer Tumorentitäten, den Meningeomen, nachgewiesen werden konnte (Heckel et al., 1998), wurde mittels LOH-Analysen (loss of heterozygosity) auf Allelverluste in dieser Region untersucht. Insgesamt wurden 66 Probenpaare aus sporadischen Mammakarzinomen und Blut (bzw. Normalgewebe) mit Mikrosatellitenmarkern in der genannten Region auf Verluste von Allelen hin untersucht.

Die Ergebnisse dieser Analysen deuten darauf hin, dass das gewählte Kandidatengen in der Pathogenese des sporadischen Mammakarzinoms keine kausale Rolle spielt. Es bedarf demnach weiteren Untersuchungen an anderen Kandidatengenen, um zuverlässige genetische Marker für die Diagnostik, Prognostik und Therapie des Brustkrebses zu finden und einsetzen zu können.

Meinen Eltern und meinem Großvater

Inhaltsverzeichnis	
1)	Einleitung 1
1.1)	Mammakarzinom 1
1.1.1)	Definition, Epidemiologie und kurze historische Abhandlung 1
1.1.2)	Klinik 2
1.1.3)	Histopathologie 5
1.1.4)	Therapieansätze 7
1.2)	Hereditäres und sporadisches Mammakarzinom 7
1.3)	Molekulargenetische Charakterisierung 8
1.3.1)	Pathogenese des Mammakarzinoms anhand tumorassoziierter Gene 8
1.3.2)	Identifizierung chromosomaler Allelverluste in Mammakarzinomen als Hinweis auf die Existenz relevanter Tumorsuppressorgene 10
1.4)	Kandidatengen MGEA5 16
1.4.1)	Die Bedeutung des Kandidatengens MGEA5 bei der Entstehung des Mammakarzinom 16
2)	Fragestellungen 18
3)	Material und Methoden 19
3.1)	Material 19
3.1.1)	Probenkollektiv 19
3.1.2)	Geräte 24
3.1.3)	Chemikalien und Lösungen 25
3.1.4)	Enzyme 29
3.1.5)	Andere Materialien und Reagenzien 29
3.2)	Methoden 30
3.2.1)	Aufbereitung des Tumorgewebes 30
3.2.2)	DNA-Extraktion 30
3.2.2.1)	DNA-Extraktion aus Blut
	Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten 30
3.2.2.2)	DNA-Extraktion aus Tumorgewebe 31
3.2.2.3)	DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebettetem Gewebe 31
3.2.3)	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) 31

3.2.4)	Mikrosatelliten-Untersuchung zum Nachweis von Allelverlusten, LOH-Nachweis	34
3.2.5)	Agarose – Gelelektrophorese	36
3.2.6)	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	37
3.2.7)	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	39
4)	Ergebnisse	40

4.1.)	Molekulargenetische Analyse des Kandidatengens MGEA5	40
4.1.1)	Mikrosatellitenanalyse auf Chromosom 10q.24.1-q24.3 in primären Mammakarzinomen, Metastasen und Rezidiven	40
5)	Diskussion	44

5.1)	Beteiligung des Kandidatengens MGEA5 an der Pathogenese des sporadischen Mammakarzinoms	44
6)	Literaturverzeichnis	47
7)	Danksagung	56
8)	Lebenslauf	58
9)	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	60

9.1)	Abbildungsverzeichnis	60
9.2)	Tabellenverzeichnis	61
10)	Abkürzungsverzeichnis	62

11)	Anhang	I
11.1)	Abbildungen zu 3.1.1)	I

1) Einleitung

1.1) Mammakarzinom

1.1.1) Definition, Epidemiologie und kurze historische Abhandlung

Das Mammakarzinom ist definiert als ein vom Epithel ausgehender maligner Tumor der Brustdrüse. Er tritt mit 19-26% als häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau in den westlichen Ländern in Erscheinung (Schmidt-Matthiesen et al., 2000; Becker et al., 2000, WHO, 1999).

In Deutschland erkranken jährlich 46.000 Frauen (weltweit 500.000), 18.000 deutsche Frauen versterben pro Jahr an dieser Erkrankung. 22% aller durch Malignome verursachten Todesfälle bei Frauen bis zum Alter von 75 Jahren sind durch Brustkrebs bedingt.

Statistisch gesehen erkrankt ca. jede 8. Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (Tumorregister Saarland, 2000; Becker et al., 2000; WHO, 1999).

Erstmals tauchte der Begriff des ‚Karzinoms‘ in Form der griechischen Metapher „karkinos“, das „Krebstier“, zur Beschreibung bösartiger Geschwulste im „Corpus hippocraticum“ auf, einer Sammlung von 60 Einzelschriften aus dem Zeitraum von 400 vor bis etwa 100 nach Christi Geburt. In der Antike wurden als Charakteristika des Krebses seine Widerstandsfähigkeit gegen Entfernungsversuche und das oberflächlich sichtbare Venennetz beschrieben (ref. in Bröer et al., 1996). Das Mammakarzinom als eine Erscheinungsform dieser Krankheitsgruppe findet sich erstmals im zweiten Buch über die „Krankheiten der Frauen“ (De morbis mulierum, II): „In den Brüsten bilden sich harte Knötchen, die einen größer, die anderen kleiner. Diese vereitern nicht, sondern werden immer härter, später entwickeln sich aus ihnen verborgene Krebse“ (ref. in Kapferer, 1939). Der Autor vermutete damals als Ursache für die Entstehung des Mammakarzinoms eine Sekundärerkrankung, resultierend aus einem Abflusshindernis des Monatsflusses bei verschlossener bzw. verlegter Gebärmutter mit konsekutivem Rückstau in die Brüste. Dort entstehe dann gemäß seiner Theorie im Verlauf von mehreren Monaten ein maligner Krankheitsprozess. Als kausale Therapie empfahl er daraufhin eine Vaporisation der Gebärmutter und vaginale Einlagen von fettigen Kienspänen zur Aufrichtung des Uterus und zum Wiedereinsetzen der Menstruation.

Seither wurden zahlreiche, auch widersprüchliche bzw. sich ergänzende Theorien, sowohl über die Krankheitseinteilung, z.B. lokal versus systemisch, heilbar versus unheilbar (Celsus, 1. Jahrhundert nach Christus), Ätiologie (Strafe/ Weg zur Reifung, Lymph-/ Säftetheorie, Zellwucherungen), als auch über die Therapiemöglichkeiten (operativ, chemotherapeutisch, endokrin, strahlentechnisch)

entwickelt. Noch heute wird weltweit über das Mammakarzinom geforscht und publiziert. Die komplexe Theorie des Mammakarzinoms der Gegenwart kombiniert viele Einzeltheorien der Vergangenheit.

1.1.2) Klinik

Das Mammakarzinom bietet ein breites Symptomenspektrum aus lokalen und generalisierten Kennzeichen. Die häufigsten sind meist schmerzlose, derbe Knoten in der Brust (mit 75% auch Leitsymptom der Erkrankung), die zu 60-70% von den Patientinnen selber entdeckt werden. Weitere Kennzeichen sind eine sezernierende Mamille (10%), ein lokales Ödem (ca. 4%), Einziehungen der Brustwarze (ca. 3%) bzw. der übrigen Haut, Unverschieblichkeit über einer Verhärtung und Grobporigkeit (Orangenschalenhaut), offene Ulzerationen bis hin zum geschwürigen Zerfall der Brust, angeschwollene Achsellymphknoten und Metastasierung in andere Organe (Pschyrembel, 1999; Jonat, 1999).

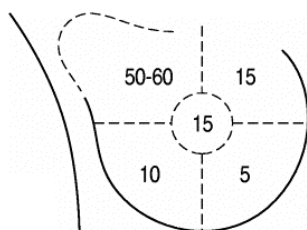


Abb.1.1: Lokalisationshäufigkeit (%) der Knoten in den verschiedenen Quadranten
(Copyright ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG)

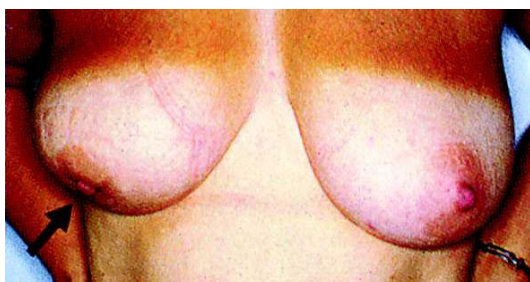


Abb.1.2: Deutliche Einziehung der Brustwarze (Pfeil) infolge eines Karzinoms von
3,5 cm Durchmesser (Copyright ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG)

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist oft multifaktoriell bedingt. Der größte Risikofaktor besteht im hohen Alter. Das relative Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken ist in der Altersgruppe zwischen 65 und 69 Jahren ca. 17x höher als in der Altersgruppe zwischen 30 und 34 Jahren (Jonat, 1999). Ein weiterer bedeutender Faktor stellt die genetische Prädisposition dar, die eine Erkrankungsrate von 50% bis zum 50. Lebensjahr, bzw. sogar 85% bis zum 65. Lebensjahr bei Mutationsträgerinnen des BRCA-1 (Breast Cancer Gene 1) erreicht. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen weiteren Genabschnitt zu finden, dessen Mutationen zur Genese des Mammakarzinoms beitragen, um zuverlässige Parameter für Diagnosestellung, Prognose und individuelle Therapiepläne zu erlangen. Des weiteren korrelieren hohes Östrogenvorkommen, frühe Menarche, späte Menopause, Nullipara (oder späte Erstgeburt), exogenes Östrogen (Kontrazeptiva, Hormonsubstitution), fettreiche Ernährung („Western-style“-Diät), gutartige Brustkrebserkrankungen sowie vorausgegangener Brustkrebs und vorausgegangene Bestrahlungen positiv mit der Krankheitsentstehung.

Ebenso wie die Herkunft sind auch der Verlauf und die Therapiemöglichkeiten der Erkrankung multifaktoriell beeinflusst. Vordringliche Prognosefaktoren bei Diagnosestellung sind die pTNM-Klassifikation (TNM-Klassifikation, 1997), hier besonders die Metastasierung, außerdem die histologische Klassifikation mit unterschiedlichem biologischem Verhalten (WHO-Klassifikation, 1981; Rosen und Obermann, 1992), das Grading (Bässler, 1995) und der Steroidhormonrezeptorgehalt (Remmele et al., 1987). Jüngere Prognosefaktoren sind u.a. zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark (Braun et al., 2000), zellkinetische Parameter wie TLI, SPF und MIB1 (Silvestrini et al., 1993), Kathapepsine und Plasminogenaktivatoren vom Urokinasetyp (uPA) (Jänicke et al., 1993), molekulargenetische Faktoren wie c-erbB2, P53 und EGF-R (Gusterson et al., 1992; Mathieu et al., 1995; Klijn et al., 1994).

Die Metastasierung wird unterschieden in den lymphogenen Weg in Form von meist axillärem Lymphknotenbefall und in den hämatogenen Weg, vornehmlich in das Skelettsystem (70%), Pleura/ Lungen (50%), Leber (60%), Gehirn (15-30%), Ovarien (20%) und Haut (Boogerd, 1996; Wronski et al., 1997). Der Metastasierungsgrad ist ein wichtiger Prognosefaktor und gibt Hinweise auf Progression, Mortalität und Rezidivrisiko der Erkrankung. Metastasen zeichnen die häufigste Todesursache auf. Im metastasierten Stadium ist der Brustkrebs nicht mehr heilbar. Bei einer Tumorgöße von 1-2 cm bestehen bereits in über 50% der Fälle Fernmetastasen, oberhalb von 2 cm steigt die Wahrscheinlichkeit auf 80-85% an (Kaiser und Pfeleiderer, 1989). Oftmals liegt bei der Diagnosestellung bereits eine okkulte Generalisierung vor. Des weiteren kann eine Ausbreitung per continuitatem in die Haut und die angrenzende Muskulatur erfolgen.

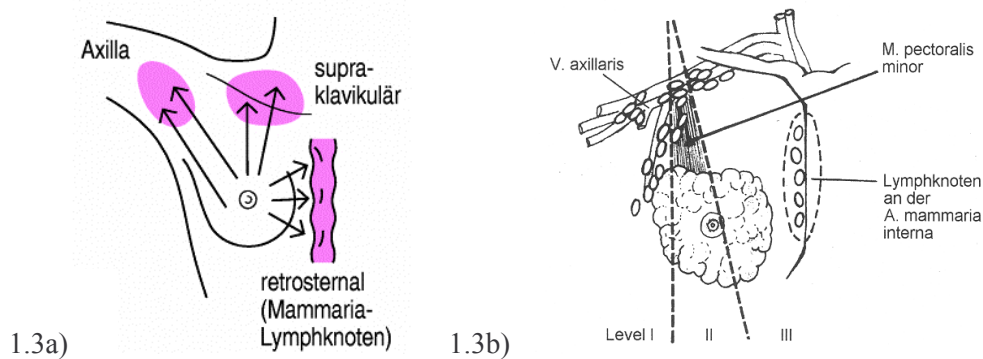


Abb.1.3a und 1.3b: Lymphogene Metastasierungswege (1.3a) und Einteilung gemäß der Lokalisation der befallenen Lymphknoten in drei Level → Prognostik (1.3b)
(Copyright ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG)

- Gehirn (15-30%)
- Pleura/ Lunge (50%)
- Haut (50%)
- Skelettsystem (70%)
- Leber (60%)
- Ovarien (20%)

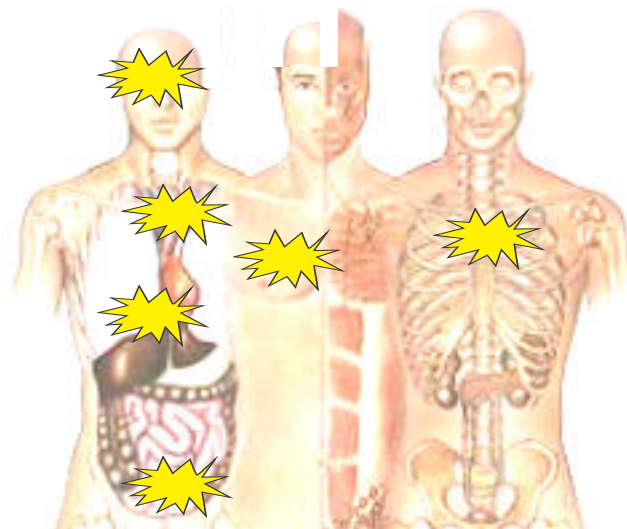


Abb.1.4: Prädilektionsorte der hämatogenen Fernmetastasierung des Mammakarzinoms und deren Häufigkeit in Prozent

Die Diagnostik des Mammakarzinoms besteht aus der klinischen Untersuchung, bildgebenden Verfahren (Mammographie, Galaktographie, Sonographie, Kernspintomographie, Röntgen, Computertomographie und Skelettszintigraphie), sowie Zytologie und Punktion (Biopsie), gegebenenfalls diagnostische Knotenexzision.

1.1.3) Histopathologie

Histologisch wird das Mammakarzinom in verschiedene Subtypen unterteilt. Die beiden häufigsten sind die duktales Karzinome (65-75%), die sich vom Epithel mit Merkmalen der Milchgänge herleiten, und die lobulären Karzinome (10-20%), die von den lobulären Drüsenendstücken ausgehen. Die übrigen Subtypen sind selten.

Gemäß der WHO erfolgt eine Einteilung in nichtinvasive Karzinome, invasive Karzinome und in das Pagetkarzinom der Mamille. Subtypen der nichtinvasiven Gruppe sind das duktales Carcinoma in situ (DCIS) und das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS). Zu den invasiven Karzinomen zählen das invasive duktales Karzinom, das invasive duktales Karzinom mit dominanter intraduktaler Komponente, das invasive lobuläre, das medulläre (3-7%), das muzinöse (2%), das tubuläre (1-3%), das papilläre (0,5-1,5%), das adenoid-zystische (<1%), das sekretorische (juvenile), das apokrine Karzinom, sowie das Karzinom mit Metaplasie und andere Typen.

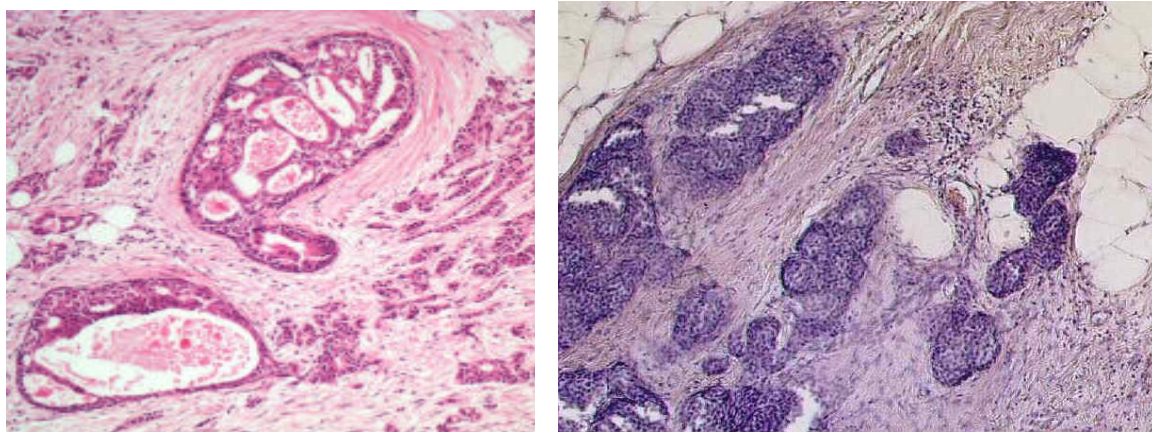


Abb.1.5a und 1.5b: Histopathologie der beiden häufigsten Mammakarzinome:

1.5a): Invasives duktales Mammakarzinom,

1.5b): Invasives lobuläres Karzinom (Copyright ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG)



Abb.1.6: Invasives duktales Mammakarzinom, 17mm Durchmesser; radiär-streifige Tumorausläufer in das angrenzende Mammagewebe (Prof. Stoemmer)

Eine detaillierte Stadieneinteilung erfolgt gemäß der WHO mit Hilfe der TNM-Klassifikation:

TNM-Klassifikation:

Tis	in situ	
T1	≤ 2 cm	T1a ≤ 0,5 cm T1b > 0,5 cm bis 1 cm T1c > 1 bis 2 cm
T2	> 2 bis 5 cm	
T3	> 5 cm	
T4	Brustwand, Haut	T4a Brustwand T4b Hautödem, Ulzeration, Satellitenknoten der Haut T4c a und b T4d entzündliches Karzinom
TX	Die Minimalerfordernisse zur Bestimmung des Sitzes oder Ausbreitungsgrades des Primärtumors liegen nicht vor.	
N1	beweglich axillär pN1	pN1a nur Mikrometastasen ≤ 0,2 cm pN1b Makrometastasen i 1-3 Lymphknoten > 0,2 cm bis < 2 cm ii ≥ 4 Lymphknoten > 0,2 cm bis < 2 cm iii durch Kapsel, < 2 cm iv ≥ 2 cm
N2	fixiert axillär pN2	
N3	Mammaria interna pN3	
NX	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionären Lymphknoten liegen nicht vor.	
M0	keine Evidenz für Fernmetastasen	
M1	Evidenz für Fernmetastasen	
MX	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen liegen nicht vor.	

Tab.1.1: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms gemäß WHO mit Hilfe der TNM-Klassifikation

1.1.4) Therapieansätze

Die komplexe Therapie der Gegenwart besteht aus vier Säulen: der Chirurgie, der Strahlentherapie, der Chemotherapie und der Hormontherapie. Die ersten beiden Therapieansätze setzen lokal an, die dritte und vierte Option gehen das Mammakarzinom systemisch an. Die Entscheidung für eine jeweilige Therapie oder eine Kombination aus den vier Möglichkeiten wird individuell und dem Staging entsprechend getroffen.

Eine frühe Diagnosestellung erlaubt häufig eine kurative Therapie. 70% der nodalnegativen Fälle können durch alleinige operative Maßnahmen kurativ therapiert werden. Bei den übrigen 30% schreitet die Erkrankung fort und generalisiert bereits früh. Aufgrund dieser früh einsetzenden Generalisierung der Erkrankung wird heute meist eine Kombination aus sicher lokaler operativer Therapie, in Form eines brusterhaltenden Eingriffes, in Verbindung mit adjuvanter systemischer Therapie im Sinne einer Chemotherapie und/ oder Hormontherapie (nur bei Rezeptor-positiven Tumoren möglich) und/ oder zusätzlich eine moderne Bestrahlungstechnik gewählt. Auf eine Ablatio mammae kann dadurch in zwei Drittel der Fälle verzichtet werden.

Die Überlebensrate bei Nachweis von Fernmetastasen beträgt ca. 55% für 1-2 Jahre, 30% für 2-3 Jahre, nach 3-4 Jahren leben noch 20% der Patientinnen. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung für das Mammakarzinom insgesamt liegt weltweit bei 50%, die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 30% (Schmidt-Matthiesen et al., 2000).

Die Heilungsrate macht bisher lediglich 35-40% aus. Aus diesem Grund besteht weiterhin großer Bedarf an spezifischen Prognosefaktoren.

1.2) Hereditäres und sporadisches Mammakarzinom

Entsprechend dem Vorhandensein einer genetischen Belastung gliedert man das Mammakarzinom in eine häufiger vorkommende (95%) sporadische, d.h. vereinzelt auftretende, und eine hereditäre, d.h. genetisch vererbte Erkrankung (5%) (Hoskins et al., 1995).

Das autosomal dominante, hereditäre Karzinom ist durch ein früheres Erkrankungsalter und eine höhere Morbidität charakterisiert. Mit 50 Jahren sind bereits 50% der mutationstragenden (BRCA-1) Patientinnen erkrankt, mit 65 Jahren sogar 85% (beim sporadischen Karzinom liegt der Erkrankungsgipfel zwischen 45 und 60 Jahren). 50% aller hereditären Fälle gehen auf eine familiäre Belastung mit einer genetischen Prädisposition in Form von Veränderungen in einem der beiden Tumorsuppressorgene BRCA-1 auf Chromosom 17q21 (Miki et al., 1994) und BRCA-2

(Breast Cancer Genes) auf 13q12-q13 (Tavtigian et al., 1996) zurück. Diese beiden Gene weisen eine hohe Penetranz auf. Bei den übrigen 50% der Patientinnen besteht eine familiäre Belastung mit unbekanntem genetischen Faktoren. Es gibt jedoch auch Hinweise für die Existenz eines potentiell bestehenden BRCA-3-Gens auf Chromosom 8, das eventuell für diese Mammakarzinome zuständig sein könnte (Kerangueven et al., 1995).

Beim sporadischen Mammakarzinom kommen Mutationen in diesen beiden Genen nur selten vor (Khoo et al., 1999; Miki et al., 1996). Hohe Allelverlusten in den chromosomalen Regionen von BRCA-1 und BRCA-2 (Borg et al., 1994; Cornelis et al., 1993; Schmutzler et al., 1997) lassen jedoch auch eine Beteiligung dieser an der Entstehung und Progression des sporadischen Karzinoms vermuten, die jedoch einem anderem Mechanismus der Inaktivierung dieser Gene unterliegen könnten.

In dieser Arbeit wurden daher 66 sporadische Tumoren auf Allelverluste auf bn43 auf dem Chromosom 10 untersucht.

1.3) Molekulargenetische Charakterisierung

1.3.1) Pathogenese des Mammakarzinoms anhand tumorassoziierter Gene

Die Pathogenese des Mammakarzinoms ist multifaktoriell bedingt. Die genetischen Defekte stellen häufig Prädispositionen dar, die zusätzlich noch anderen äußeren Faktoren, wie Umweltfaktoren und Ernährung (Brustkrebs ist in Asien deutlich weniger verbreitet als in den westlichen Ländern), Hormonen und genetisch modifizierenden Faktoren unterliegen, für deren komplexe Mechanismen die Erklärungen noch ausstehen.

Genetische Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (=Antionkogenen) werden für die Entstehung des Mammakarzinoms durch die daraus resultierende Dysregulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung verantwortlich gemacht. Eine Häufung dieser genetischen Veränderungen beeinflusst die Tumorprogression. Pathologische Onkogene entstehen durch Vermehrung oder Deregulation aus physiologischen Protoonkogenen, die für Proteine kodieren, welche über Signalübertragungen die Zellvermehrung steuern. Onkogene wirken dominant, so dass eine Änderung eines Allels ausreicht, um eine übermäßige, nicht zyklusgerechte oder ungebremste Genexpression auszulösen. Tumorsuppressorgene, die physiologischerweise die Zellvermehrung unterbrechen und der Zelle so eine Differenzierung ermöglichen, sind hingegen rezessive Gene. Defekte haben daher nur dann Auswirkungen, wenn beide Allele betroffen sind.

Die Onkogene haben beim Mammakarzinom lediglich in Form des HER2/ neu-Onkogens prognostische Bedeutung erlangt (Slamon et al., 1987). Ein Einsatz von anti-HER2 Antikörpern (Herceptin®) erzielte ein besseres Ansprechen von HER2/ neu überexprimierenden Karzinomzellen auf die Chemotherapeutika Paclitaxel (Taxol®) und Doxorubicin (Adriamycin®) (Baselga et al., 1998).

Der Schwerpunkt der Untersuchungen beim sporadischen Mammakarzinom wurde daher von dem Nachweis der Veränderungen in Onkogenen auf die Suche nach potentiellen Alterationen in Tumorsuppressorgenen verlegt.

Das sporadische Mammakarzinom konnte bisher molekularpathogenetisch nicht eindeutig charakterisiert werden. Insbesondere eine Mehrschrittgenese konnte bisher nicht definiert werden. Es bestehen jedoch Hinweise auf spezifische Genalterationen in zumindest einem Teil der sporadischen Tumoren. Niedrig penetrante Mutationen könnten in Genen mit einer hohen Heterozygotenfrequenz in der Bevölkerung nicht offensichtlich familiär gehäuft auftreten. Diese genetische Disposition vermutet man bei Familien mit wenigen erkrankten Familienmitgliedern und später Tumormanifestation, die im Gegensatz zu gehäuften familiären Auftreten und frühem Erkrankungsalter bei der BRCA-1- und BRCA-2-Genese stehen. Die Kenntnis dieser Alterationen würde Aufschlüsse über die Tumorgenese geben und dadurch Diagnostik, Prognostik und Therapie verbessern.

Auch bei Tumoren anderer Organe konnten durch molekularbiologische Untersuchungen Allelverluste in über 100 Genloci nachgewiesen werden, die verdächtig auf den Sitz eines Tumorsuppressorgens sind. Bereits isoliert und identifiziert werden konnten das Retinoblastomgen auf dem Chromosom 13q14 (Friend et al., 1986), das Wilms-Tumor-Gen auf 11p13, das p53-Tumorsuppressorgen auf 17p13, das Neurofibromatosegen auf 17q11 und das Adenomatöse Polyposis-coli-Gen 5q21 (Grodin et al., 1991). Das Retinoblastomgen verhindert beispielsweise durch Bindung an Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen, die im Zellzyklus den Übergang von der G1- in die S-Phase steuern, und hemmt dadurch die Zellteilung. Seine mutationsbedingte Inaktivierung wurde erstmals bei der Tumorgenese des malignen Retinoblastoms des Kleinkindes erkannt und danach benannt. Später wurde es auch in anderen schnell und aggressiv wachsenden, sporadischen Karzinomen und Sarkomen, u.a. dem Osteosarkom entdeckt. Ebenfalls in mehreren Tumoren identifiziert wurde das p53-Tumorsuppressorgen. Seine Inaktivierung des P53-Gens durch strukturelle chromosomale Alterationen oder Genmutationen stellt den häufigsten genetischen Defekt dar, der bisher in Tumoren nachweisbar ist (Nigro et al., 1989). P53-TSG korrigiert physiologischerweise

Genomschäden durch Inaktivierung des Zellzyklus in G1. Bei Fortbestehen eines Fehlers bewirkt es den Zelltod und überwacht so die Proliferation und fördert die Differenzierung der Zelle. Es findet sich konstitutionell mutiert beim Li-Fraumeni-Karzinomsyndrom, einem familiären Krebsyndrom mit Auftreten solider Tumoren im Kindesalter in Familien, in denen auch bei anderen Familienmitgliedern unter 45 Jahren gehäuft sporadische Tumoren (Mammakarzinome zu 1% (Malkin et al., 1990), Knochen-, ZNS- und Lungentumoren u.a.) vorkommen. Ein Verlust des Adenomatöse Polyposis-coli-Gens (APC-Gen) findet man bei Kolorektalkarzinomen und Melanomen (Riede, Wiestler, Müller, 1999). Defekte in Genen für familiäre Krebserkrankungen anderer Organe könnten also auch Aufschluss über die allgemeine Kanzerogenese und dadurch auch für das sporadische Mammakarzinom geben. Mutationen in den für das hereditäre Mammakarzinom spezifischen Dispositionsgenen BRCA-1 und BRCA-2 konnten in sporadischen Mammakarzinomen jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Es werden weitere Gene diesbezüglich auf ihre Bedeutung bei der Entstehung des Brustkrebses untersucht, unter anderem das Ataxia teleangiectasia Gen mit hoher Heterozygotenfrequenz in der Bevölkerung und niedriger Penetranz von Mutationen. Weitere Untersuchungen betreffen das bereits erwähnte p53 und Veränderungen des für die Expression des Östrogenrezeptors relevanten Chromosom 6q24-q27 (Poola et al., 2000).

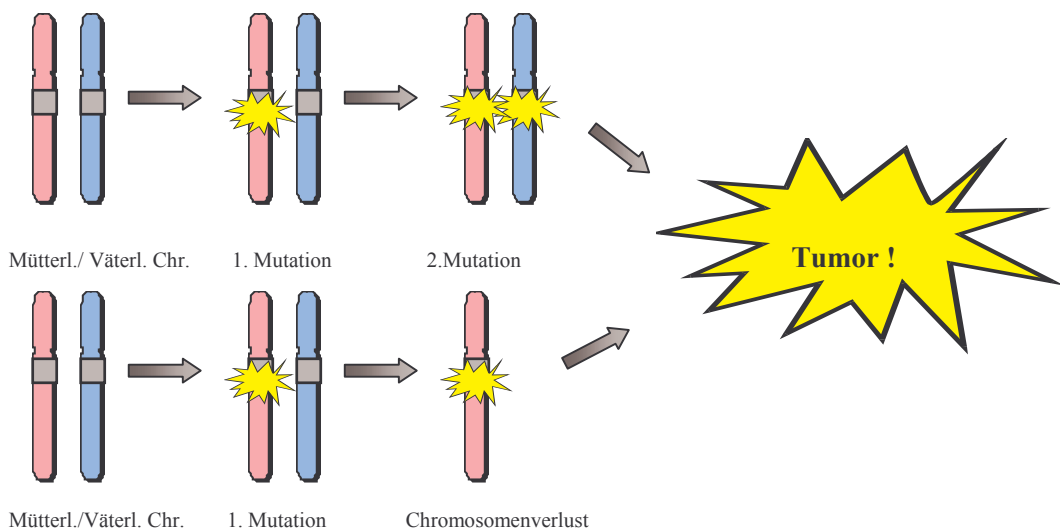
Goyette postulierte nach Untersuchungen über die Entstehung des Kolonkarzinoms, dass es zur sporadischen Tumorentstehung durch Addition verschiedener genetischer Alterationen durch mindestens fünf Mutationen kommt. Die Korrektur nur eines dieser fünf Defekte könne bereits eine Tumorchemmung herbeiführen. Dies wurde durch die Einschleusung intakter Chromosomen gezeigt (Goyette et al., 1992). Die Korrelation von LOHs und Tumorentstehung konnte in unzähligen Untersuchungen bestätigt werden. Bei Kolonkarzinomen konnte sogar der Verlust von verschiedenen chromosomalen Veränderungen (Vogelstein et al., 1989) den verschiedenen Stadien der kolorektalen Karzinogenese zugeordnet werden.

1.3.2) Identifizierung chromosomaler Allelverluste in Mammakarzinomen als Hinweis auf die Existenz relevanter Tumorsuppressorgene

Allelverluste weisen also auf die Existenz relevanter Tumorsuppressorgene (TSG) hin. Wie unter 1.3.1) bereits erwähnt wurde, handelt es sich bei den Tumorsuppressorgenen um rezessive Gene, deren Defekt erst bei Verlust beider Allele in Erscheinung tritt, da eine verbleibende Kopie eines solchen Gens ausreicht, um die Wachstumskontrolle aufrecht zu erhalten. A.G. Knudson entwickelte daraus die „Two-Hit-Hypothese“ (Abb.1.7) (Knudson et al., 1971). Danach ‚trifft‘ eine

erste Mutation zunächst das eine Allel und verursacht dadurch entweder im Keimzellstadium eine Genomveränderung (=konstitutionelle Mutation), oder später in nur einer Zelle eine somatische Mutation. Ein zweiter ‚Schlag‘ inaktiviert das zweite bis dahin intakte Tumorsuppressorgen in einer Zelle (somatische Mutation), die sich dann unkontrolliert vermehren kann. Abb.1.8 zeigt die potentiellen zum Verlust von Genmaterial und konsekutivem Verlust der Heterozygotie führenden Mutationsmechanismen.

Somatische Mutationen:



Konstitutionelle und somatische Mutation:

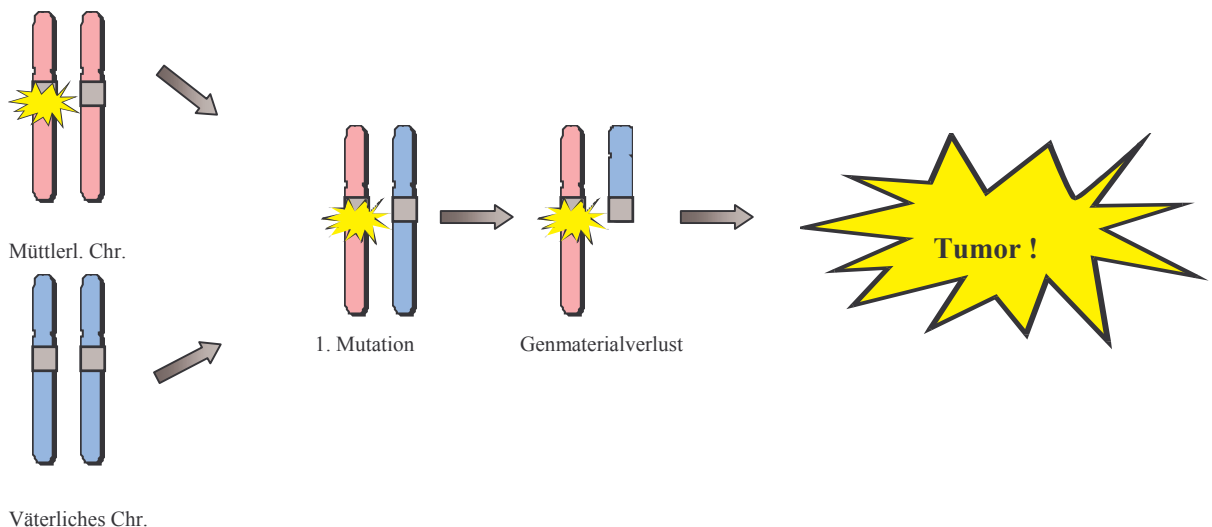


Abb.1.7a und 1.7b: Modelle der „Two-Hit-Hypothese“ von A.G. Knudson (1971)

1.7a: Somatische Mutationen

1.7b: Konstitutionelle und somatische Mutation

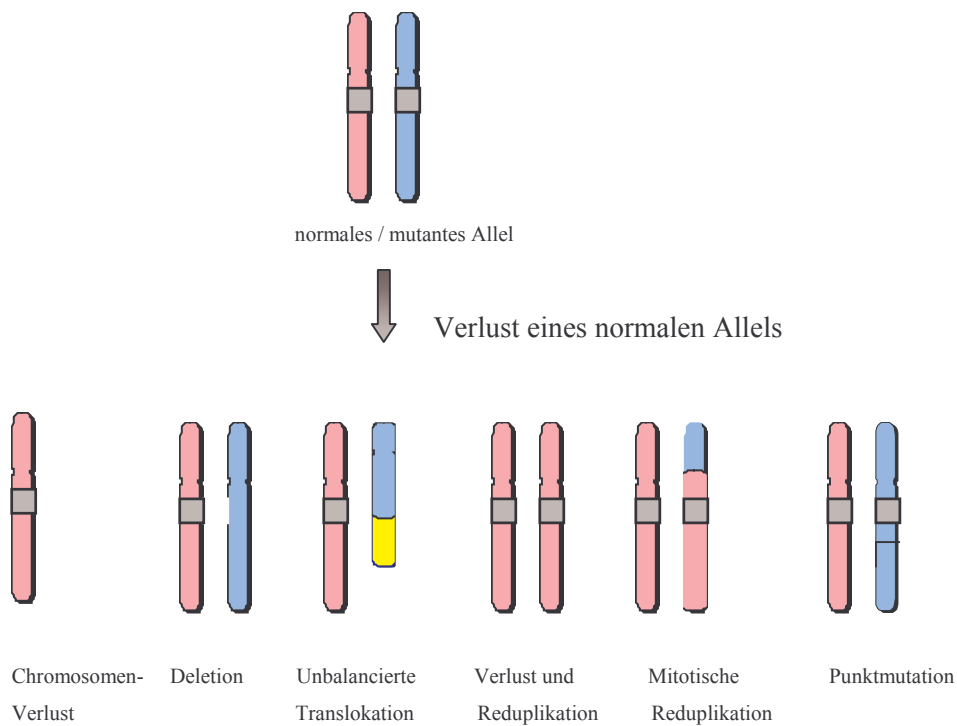


Abb.1.8: Zum Verlust der Heterozygotie führende Mechanismen

Nach Bekanntwerden der Bedeutung der Allelverluste mit konsekutiver Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bei der Entstehung des Mammakarzinoms wurde in weiteren Untersuchungen betreffend der Entstehung sporadischer Tumoren (Cavane et al., 1983) nachgewiesen, dass nach Mutation des ersten der Verlust des zweiten Allels am häufigsten durch mitotische Nondisjunction und Rekombination oder durch Chromosomenverlust entsteht (Zhu et al., 1983).

Daraufhin wurde 1987 das erste Tumorsuppressorgen (RB1-Gen) im Rahmen der Untersuchung der Entstehung des Retinoblastoms identifiziert (Friend et al., 1987).

Bei hereditären Karzinomen wird die erste Mutation bereits vererbt, es bedarf daher nur noch einer einzigen, weiteren Mutation zur Tumorentstehung. Bei der sporadischen Form bedarf es zwei somatischer Mutationen, um die Erkrankung hervorzurufen. Knudson erklärte damit das höhere Erkrankungsalter bei sporadischen Karzinomen (Knudson et al., 1971).

Mikrosatelliten-Studien mit polymorphen Markern zeigten große Anzahlen an Regionen mit hohen Allelverlustraten im menschlichen Genom.

Ein anderer Hinweis auf die Existenz von Tumorsuppressorgenen in normalen Zellen wurde von Stanbridge 1990 beschrieben. Während Untersuchungen an Hybridzellen aus fusionierten normalen- und Tumorzellen erkannte er, dass es in den Hybridzellen einen supprimierten Tumorzell-Phänotyp gibt, der nach Chromosomenverlust aus normalen Zellen wiederkehrt (Abb.1.9) (Stanbridge et al., 1982; Stanbridge, 1990).

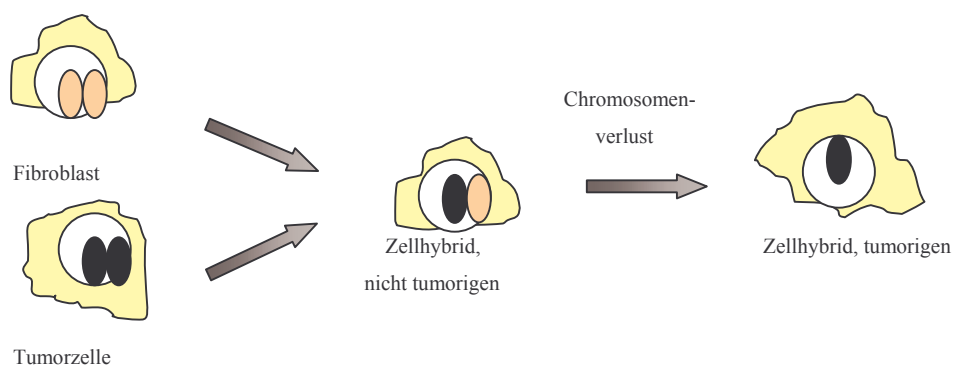


Abb.1.9: Zell-Zell-Hybridisierung (Stanbridge, 1990)

Heterozygotie besteht bei Individuen, bei denen derselbe Genort auf den homologen Chromosomen durch zwei verschiedene Allele (väterliches und mütterliches Allel) besetzt ist. Von einem Allelenpaar eines Elternteils wird immer nur ein Allel an das gleiche Kind weitergegeben. Die Ausprägung der Merkmale erfolgt je nach Vererbungsmodus (Dominanz-Rezessivität, Co-Dominanz, unvollständige Dominanz) unterschiedlich.

Die Identifikation von Allelverlusten gelingt durch den Nachweis von Heterozygotie-Verlusten mit Hilfe bestimmter Markern nahe eines Tumorsuppressorgens. Die heterozygote normale Zelle wird dann ohne das zweite (verschiedene) Allel zu einer homozygoten oder hemizygoten Tumorzelle (Abb.1.10). Die unterschiedlichen Allele werden durch sogenannte Mikrosatellitenmarker (Startermoleküle, „Primer“) charakterisiert. Dies sind kurze, polymorphe, repetitive DNA-Sequenzen, die sich tandemartig wiederholen. Über das ganze Genom verteilt machen sie 1% aus. Sie wiederholen sich in regelmäßigen Abständen von ca. 10–30 Basenpaaren (Louis et al., 1992). Di-, Tri-, Tetra- und Pentanukleotidwiederholungen werden bevorzugt zur Identifizierung von Allelverlusten eingesetzt. Mikrosatellitenmarker mit variabler Anzahl an Wiederholungseinheiten innerhalb der Population, d.h. mit einer Vielzahl alleler Formen, sind besonders geeignet für diese Untersuchungen, da sie polymorph sind und eine hohe Heterozygotenfrequenz besitzen (Hamada et al., 1982; Hamada et al., 1984; Weber et al., 1990; Louis et al., 1992). Meist bestehen sie aus Cytosin-Adenin-Wiederholungen.

Auf menschlichen physischen Genomkarten sind Mikrosatellitenmarker im Abstand von circa 0.7 centiMorgan (cM) dargestellt (Dib et al., 1996). Per definitionem entspricht ein cM der Frequenz von ungefähr einem Prozent, dass es zum Austausch der genetischen Marker während der Rekombination (während der Meiose) kommt und gibt einen Hinweis auf die Entfernung zwischen zwei genetischen Markern auf einem Chromosom. Bei der Rekombination überkreuzen sich Chromatiden zweier homologer Chromosomen, brechen und verbinden sich wieder reziprok. Dies hat dann Auswirkung auf die Häufigkeit, mit der ein Merkmal vererbt wird (Morgan, Th. H., 1911). Beim Menschen entspricht ein cM im Durchschnitt einer Million Basenpaaren. Mikrosatellitenmarker, die sich in dem zu untersuchenden Genabschnitt befinden, können mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. In den verschiedenen Allelen unterscheiden sich die Wiederholungen, so dass die Amplifikationsprodukte verschiedene Größen besitzen, welche sich elektrophoretisch auf hochauflösenden Gelen aus Polyacrylamid (Polyacrylamid-Gelelektrophorese=PAGE) auftrennen lassen (Weber et al., 1989). Ein „Loss of heterozygosity“ (LOH) wird durch den Verlust einer Bande sichtbar gemacht (Abb.1.10).

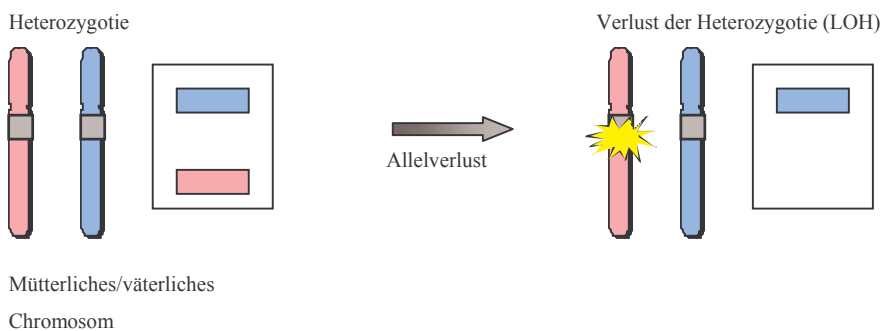


Abb.1.10: Zunächst normale Zelle mit Heterozygotie für mütterliches und väterliches Allel mit folgendem Allelverlust und daraus entstehendem Tumor. Vereinfachte Darstellung der PCR-Amplifikationsprodukte nach gelelektrophoretischer Auftrennung.

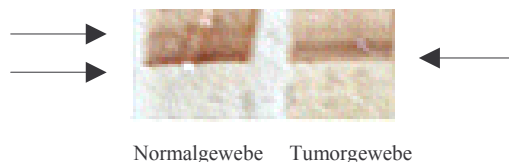


Abb.1.11: Beispiel für einen Loss of Heterozygosity=LOH nach Polyacrylamid-Gelelektrophoretischer Auftrennung mit zwei dicht aneinander liegenden Banden links und einer verbleibenden Bande nach Allelverlust rechts.

Die voranstehende Abb.1.11 demonstriert den direkten Vergleich der Amplifikationsprodukte der konstitutiven DNA von normalem Gewebe und Tumor-DNA nebeneinander auf einem Gel. Auf der linken Seite erkennt man als Zeichen der Heterzygotie zwei Banden, im Tumorgewebe auf der rechten Seite befindet sich nur noch eine Bande. Die konstitutive DNA als Referenz-DNA kann zu diesem Zweck aus jedem Normalgewebe entnommen werden (z.B. Leukozyten/ Blut, gesundes Gewebe etc.).

Im Allgemeinen wählt man folgende Vorgehensweise, um den Verlust von Tumorsuppressorgenen zu erkennen: In einem ersten Schritt werden die Tumoren auf heterozygote chromosomale Verluste (LOHs) auf definierten Chromosomenabschnitten hin untersucht. Bei erfolgreichem Nachweis eines Genabschnittes mit vielen Allelverlusten wird in einem zweiten Schritt auf diesen mutierten Abschnitten nach potentiellen Tumorsuppressorgenen gesucht. Der dann folgende Nachweis einer Kombination von strukturellen genetischen Veränderungen wird benötigt, um den genetischen Entstehungsmechanismus eines spezifischen Tumors zu erfassen.

Vorausgegangene Untersuchungen haben bereits häufige Allelverluste in Brusttumoren angezeigt. Zahlen über die Häufigkeit dieser Ereignisse variieren jedoch noch erheblich. Soussi beschrieb eine LOH-Frequenz von über 50% auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (Soussi et al., 1994), Singh gab P53-Allelverluste von 64% in primären Mammakarzinomen an. Diverse Autoren nennen eine Anzahl zwischen 40 und 75% (Soussi et al., 1994; Singh et al., 1993; Knyazev et al., 1993; Andersen et al., 1992; Thorlacius et al., 1991). Chromosom 17 scheint hier äußerst relevante Regionen zu beinhalten. Allelverluste des P53-Gens auf 17p13.1 sind, wie bereits oben erwähnt, ursächlich für das Li-Fraumeni-Syndrom, bei dem es in 1% der Fälle zum Mammakarzinom kommt (Malkin et al., 1990). Weiter konnten Mutationen in 17p13.3, 17q21 (BRCA-1) und 17q24 nachgewiesen werden (Lindblom et al., 1993). Insgesamt werden folgende Regionen für die Brustkrebsentstehung durch chromosomale Aberrationen verantwortlich gemacht: 1p, 1q2, 3p, 6q, 7q, 8q(q24, c-MYC), 11p, 11q(q13, CCND1, HAST-1, GST, SEA), 10q, 11q(q22-q23, ATM), 13q14(RBI), 15q(q25-q26, IGF1R), 16q, 17p, 17q, 18p, 18q und 22q (Pandis et al., 1995, Negrini et al., 1992; Callahan et al., 1992, Borg et al., 1992). In fortgeschrittenen Tumoren wurden Deletionen in 2q35-37, 3p12-14, 4p15-16, 5q, 7p15, 8p22-q23, 11q, 11p, 14q211-q31 und 15q beschrieben (Richard et al., 2000). Bisher wurden überwiegend einzelne Allelverluste untersucht, die Kombination mehrerer Verluste wurde erst selten beschrieben. Auf dem in dieser Arbeit untersuchten Chromosom 10q wurden Allelverluste bei sporadischen Mammakarzinomen bis zu 50% beobachtet (Steck et al., 1997; Li et al., 1997; Rasheed et al., 1997).

1.4) Kandidatengen MGEA5

1.4.1) Die Bedeutung des Kandidatengens MGEA5 bei der Entstehung des Mammakarzinom

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Mutationsanalysen des Kandidatengens MGEA5 beim Mammakarzinom auf dem Chromosom 10q24.1-q24.3. Hier wird eine Beteiligung an der Entstehung des Mammakarzinoms vermutet, da sein onkogenes Potential bereits bei der Tumorgenese anderer Tumorentitäten, den Meningeomen, nachgewiesen wurde (Heckel et al., 1998). Zusätzlich beschrieben diverse Autoren bereits auf PTEN, einem nahegelegenen Gen auf 10q, Allelverluste in sporadischen Mammakarzinomen (Steck et al., 1997; Li et al., 1997; Rasheed et al., 1997).

MGEA5 kodiert für Hyaluronidase. Dies ist ein lysosomales Enzym (Glykosidase), das die hydrolytische Spaltung glykosidischer Bindungen in Hyaluronsäure und Chondroitinsulfaten katalysiert. Hyaluronsäure ist ein Proteoglykan, das in der extrazellulären Matrix vorkommt, und für die Aufrechterhaltung der Zelle zuständig ist. Eine Depolymerisation derselben führt zu erleichterter Tumordinvasion (Liu et al.). Hyaluronidase kommt in vielen Geweben vor, ermöglicht z.B. das Eindringen der Spermien in die Eizelle und erhöht die Gefäß- u. Bindegewebspermeabilität bei Entzündungen. Therapeutisch wird es als Zusatz zu Infusions- u. Injektionslösungen zur Förderung der lokalen Ausbreitung und Resorption verwendet. Eine Permeabilitätssteigerung in zahlreichen Geweben ist auch bei der Tumorprogression und der

Metastasierung von großer Bedeutung. Tumorzellen benutzen Hyaluronidase als molekulare ‚Saboteure‘, welche die Hyaluronsäure depolymerisieren. Die Expression von Hyaluronidase in Tumorzellen ermöglicht es den Malignomzellen, interzelluläre Adhäsionen zu umgehen, extrazelluläre Matrix zu depolymerisieren, in der Matrix gespeicherte Wachstumsfaktoren freizugeben und die Angiogenese zu induzieren. Damit erleichtern sie die Ausbreitung der Tumorzellen.

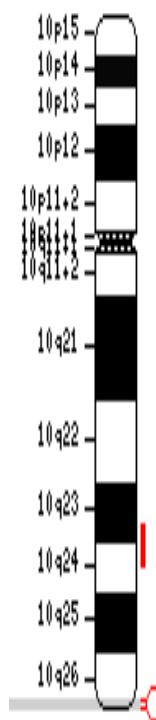


Abb.1.12: Chromosom 10 mit Markierung der Region des MGEA5, 10q24.1-q24.3,

Das MGEA5 ist nur eines der vielen, die menschliche Hyaluronidase kodierenden Antigene. Insgesamt wurden vier MGEA5 Klone von Heckel et al. beschrieben, die unterschiedliche Nukleotidsequenzen am 3'-Ende aufweisen, durch die alternative Splicing Ereignisse auftreten können. Diese Veränderungen der Aminosäuresequenzen beeinflussen die Proteinfunktion und die Expressionskontrolle der Zellen. Es kann dann zu einem Einfluss auf die Stabilität, die Lokalisation in der Zelle und die Regulation der Translation und der Transkription führen. Auf diesem Wege können Mutationen in diesem Bereich zur Tumorentstehung beitragen.

In Tumorzellen von Melanomen, Kolonkarzinomen, Glioblastomen und Mammakarzinomen wurden bereits erhöhte Level an Hyaluronsäure nachgewiesen (Liu et al., 1996; Bertrand et al., 1992). Es wird vermutet, dass diese hochgradig Hyaluronsäure exprimierenden Tumorzellen vor der Immunantwort des Körpers geschützt werden (Delpech et al., 1997).

Angiogene Oligosaccharide sind Abbauprodukte von Hyaluronsäure. Sie stimulieren endotheliale Zellproliferation und fördern Neovaskularisation, die zur Erhaltung und für das Wachstum des Tumorgewebes benötigt werden.

In Seren von Meningeom-Patienten konnten Antikörper gegen MGEA5 isoliert werden, die wohl von Überexpressionen auf dem Proteinlevel resultieren (Heckel et al., 1998).

Folglich könnte das Risiko einer Tumorentstehung durch einen Genverlust in der Region des MGEA5 mit konsekutiver genetischer Instabilität deutlich ansteigen. Untersuchungen in der genannten Region zeigten signifikant erhöhte Allelverlustfrequenzen in Meningeomen (Heckel et al., 1998). Hier soll die Frequenz von Allelverlusten in dieser Region bei sporadischen Mammakarzinomen übergeprüft werden.

2) Fragestellungen

In dieser Arbeit wird das Kandidatengen MGEA5 auf 10q24.1-q24.3 mittels Mutationsanalysen bearbeitet. Hier wird eine Beteiligung an der Entstehung des sporadischen Mammakarzinoms vermutet, da bereits auf PTEN, einem weiteren Gen an nahegelegenen Stellen von 10q Allelverluste beschrieben wurden (Steck et al., 1997; Li et al., 1997; Rasheed et al., 1997). Es wird somit ein Kandidatengen in einer relevanten chromosomalen Regionen untersucht. Das onkogene Potential von MGEA5 wurde bereits bei der Tumorgenese anderer Tumorentitäten nachgewiesen (Meningeom) (Heckel et al., 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es:

- **mittels differentieller PCR und PAGE die Verantwortlichkeit von potentiell vorhandenen Allelverlusten von Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 10q24.1-24.3 in MGEA5 (bn43) für die Entstehung eines sporadischen Mammakarzinoms zu prüfen und eine potentielle Korrelation zu klinisch-histopathologischen Kriterien diesbezüglich nachzuweisen. Hier soll der Hinweis auf die Existenz eines tumorassoziierten Gens in der untersuchten Region an einem definierten Tumorkollektiv erhärtet werden.**
- **Frequenzen von Alterationen im untersuchten Tumorkollektiv herauszufinden**
- **eine Region höchster Allelverlustraten einzugrenzen**
- **potentielle Kombinationen von Allelverlusten nachzuweisen**
- **eine eventuelle Korrelation von Allelverlusten oder Kombinationen von Allelverlusten mit klinisch-prognostischen Markern (Tumorstadium, Tumorprogression) zu erkennen**

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit 66 Probenpaare, davon 47 Primärtumoren, 8 Rezidive und 3 Metastasen (8 ohne Angaben) mittels 12 Mikrosatellitenmarkern auf Allelverluste (Verlust der Heterozygotie, LOH) auf dem langen Arm von Chromosom 10 in der Region 10q24.1-q24.3 hin untersucht, um eine eventuelle Beteiligung an der Pathogenese des Mammakarzinoms nachzuweisen.

3) Material und Methoden

3.1) Material

3.1.1) Probenkollektiv

Es wurden in den molekulargenetischen Analysen 66 Probenpaare, jeweils bestehend aus Gewebe- und Referenz-DNA von insgesamt 50 Patientinnen untersucht. Die Gewebe-DNA stammte aus Tumoren (50 Proben), Lymphknoten (2 Proben), Phylloidestumoren (1 Probe), Fibroadenomen (1 Probe), Mastopathien (1 Probe) und angrenzenden Geweben = neben Tumor (11 Proben). Als Referenz-DNAs dienten Blut (59 Proben), Normalgewebe (6 Proben) und Mastopathien (1 Probe). 55 dieser Proben waren maligne Mammakarzinome (83,3%), 11 waren benigne Tumoren (16,67%). In 47 Fällen lag ein Primärtumor vor, 8 Proben stammen aus Rezidivtumoren und 3 Proben wurden aus Metastasen gewonnen, in 8 Fällen war der Tumortyp nicht zuzuordnen.

Die histopathologische Untersuchung ergab folgende histologische Typen: 23 duktale Mammakarzinome, 13 lobuläre Karzinome, 3 gemischt duktal/ lobuläre, 2 muzinöse, 2 medulläre Tumoren, ein Phylloidestumor und ein duktales Carcinoma in situ. Einundzwanzig mal lag keine histopathologische Untersuchung vor. Die Tumoren wurden bezüglich des Gradings zwei mal im Grad 1, siebenundzwanzig mal im Grad 2 und achtzehn mal im Grad 3 operiert und begutachtet. Zusätzlich wurden vor der DNA-Extraktion Tumorstadium und Lymphknotenstatus klassifiziert.

Das Untersuchungskollektiv erfasste 2 Individuen aus „Familien mit hereditärem Mammakarzinom“.

Tab.3.1 und Abb.3.1- 3.4 charakterisieren und veranschaulichen die Verteilung und Einteilungen der verwendeten sporadischen Tumoren.

Klinische und histomorphologische Merkmale	Anzahl der Tumoren mit bek. Merkmalen	%
Dignität:		
Benigne	11	16,67
Maligne	55	83,33
Gewebetyp:		
Tumor	50	75,76%
Neben Tumor	11	16,67%
Phylloidestumor	1	1,51%
Fibroadenom	1	1,51%
Mastopathie	1	1,51%
Lymphknoten	2	3,04%

Klinische und histomorphologische Merkmale	Anzahl der Tumoren mit bek. Merkmalen	%
Tumortyp:		
Primärtumor	47	71,21%
Rezidiv	8	12,12%
Metastasen	3	4,55%
keine Angaben	8	12,12%
Histologischer Typ:		
duktal	23	34,85%
lobulär	13	19,70%
duktal/lobulär	3	4,55%
muzinös	2	3,03%
medullär	2	3,03%
phylloid	1	1,51%
ductal in situ	1	1,51%
keine Angaben	21	31,82%
Grading:		
Grad 1	2	3,03%
Grad 2	27	40,91%
Grad 3	18	27,27%
keine Angaben	19	28,79%
Tumorstadium:		
in situ	1	1,51
pT 1	11	16,67
pT 2,3,4	31	46,97
keine Angaben	23	34,85
Lymphknotenstadium:		
pN0	22	33,33
pN1 a,bi,bii,biii,biv	18	27,27
pN2	2	3,03
PNx	1	1,51
keine Angaben	12	18,18
Rezeptorstatus:		
ER-Expression		
Positiv	35	79,55
Negativ	9	20,45
PR-Expression		
Positiv	28	63,64
Negativ	16	36,36

Tab.3.1: Klinische und histopathologische Merkmale der untersuchten Tumoren

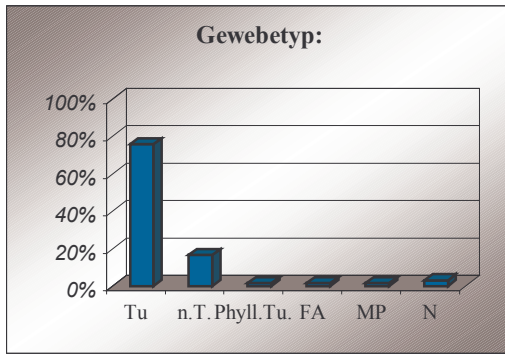


Abb.3.1: Gewebetypen des untersuchten Probenkollektives in Prozent. Tu=Tumor; n.T.=neben Tumor; Phy=Phylloides-Tumor; FA=Fibroadenom; MP=Mastopathie; N=Lymphknoten

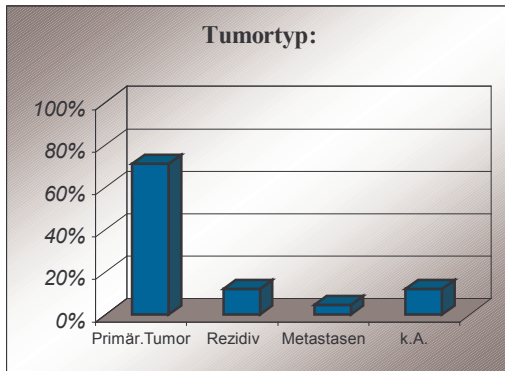


Abb.3.2: Tumortypen des untersuchten Probenkollektives in Prozent. Primär.=Primärtumor; Rezidiv=Tumorrezidiv; Metas.=Metastasen; k.A.=keine Angaben

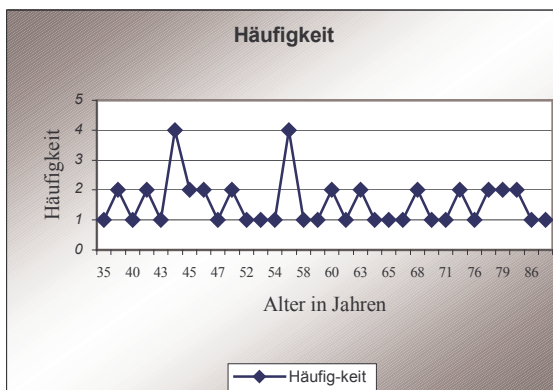


Abb.3.3: Altersverteilung bei Ersterkrankung im untersuchten Tumorkollektiv

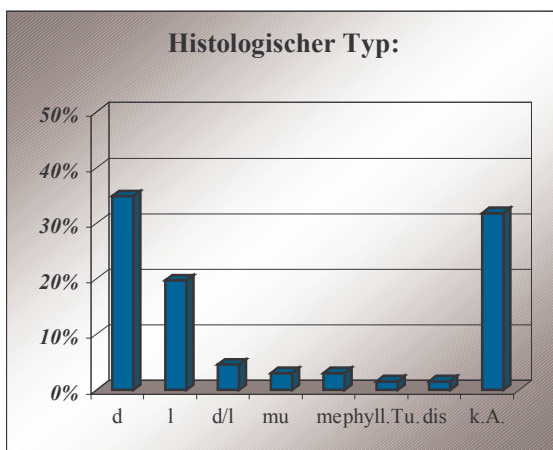


Abb.3.4: Histologischer Typ des untersuchten Probenkollektives in Prozent. d=duktal; l=lobulär; d/l=duktal/lobulär; mu=muzinös; me=medullär; ph=phylloider Tumor; dis=duktales Carcinoma in situ; k.A.=keine Angaben

Weitere Graphiken (Abb.3.5-Abb.3.8) zur Charakterisierung des untersuchten Tumorkollektives befinden sich im Anhang.

Pat.No	Mat.No	b/m	Tu- Typ	hist.Typ	Tu-Grad	ER	PR	pT	pT-spez.	PN	pN-spez.
11	-2	m	p	d	3	9	3	4	b	2	
11	-4	b	p								
13	-2	m	p	d	3	0	0	1	c	1	bi
18	-2	m	p	l	2	0	2	4		1	
21	-2	m	p	l	2	2	2	4		1	biii
27	-2	m	m	d	2	1	6	1	c	1	a
30	-2	m	r	d	3	1	6	4		1	biii
33	-2	m	p	l	2	1	1	4	b	0	
34	-2	m	p	d	3	6	6	4		2	
35	-2	m	p	d	3	2	0	2		0	
38	-2	m	p	l	3	6	0	2		0	
39	-2	m	p	mu	1	6	0	1	c	0	
41	-2	b	p	ph							
42	-2	m	p	me	3	0	0	2		0	
42	-4	m	p								
42	-5	b	p								
44	-2	m	p	l	3	4	2	2		0	
46	-2	m	p	l	2	6	1	4		0	
46	-3	b									
74	-2	m	r	d	2	6	4			1	
74	-4	m	p								
74	-5	m	p								
85	-2	m	p	l	3	0	0	2		1	biii
85	-4	m	p								
102	-2	m	p	mu	2	12	0	2		0	
107	-2	m	p	me	3	0	6	2		0	
107	-4	b									
110	-2	m	p	l		6	2	2		1	bii
111	-2	m	r	d	3	0	0	2		1	biii
112	-2	m	r	d	3			1	c	0	
113	-2	m	p	d	2	12	0	2		1	bi
113	-4	m	p								

Pat.No	Mat.No	b/m	Tu- Typ	hist.Typ	Tu-Grad	ER	PR	pT	pT-spez.	PN	pN-spez.
114	-2	m	p	d	2	8	0	2		1	a
114	-4	b									
116	-2	m	p	d	3	6	4	2		1	bi
116	-4	b									
119	-2	m	p	d	2	4	2	4		1	biv
127	2	m	p	dis	1			is		0	
138	2	m	m		3						
144	2	m	p	l	2	85%	80%	4		X	
144	4	m									
151	2	m	r		2	30%	0%				
152	4	b									
152	5	b									
152	2	m	p	d/l	2			2		1	bii
153	2	m	p	d	2	20%	30%	2		0	
156	2	m	r								
165	2	m	p	d	2	60%	70%	1	c	0	
169	2	m	p	d/l	2	5%	50%	1	c	1	bii
170	2	m	p	d/l	2	75%	30%	1	c	0	
173	2	m	p	l	2	10%	0%	3		1	bi
173	4	b									
174	2	m	p	d	3	80%	0%	1	c	0	
176	2	m	p	d	2	0%	70%	1	c	0	
178	2	m	p	d	2	10%	60%	2		1	bi
186	2	m	p	l	2	70%	60%	1	c		
188	2	m	p	d	2	60%	60%	1	c	0	
189	2	m	p	d	2	80%	60%	2		0	
190	2	m	r								
192	2	m	p	l	2	50%	60%	2		0	
194	2	m	r		2	85%	5%				
195	2	m	p	d	2	0%	70%	4		0	
201	2	m	p	d	3	0%	0%	2		0	
201	4	m	m		3	40%	0%				

Pat.No	Mat.No	b/m	Tu-Typ	hist.Typ	Tu-Grad	ER	PR	pT	pT-spez.	pN	pN-spez.
213	2	m	p	d	3	30%	0%	2		0	
235	4	b	p	l	2	75%	20%	3		1	iiii

Tab. 3.2: In dieser Arbeit analysierte Mammatumoren

Pat.No= Patientenidentifizierungsnummer; Mat.No= Materialnummer; b=benigne; m=maligne; Tu-Typ= Tumortyp; histl Typ= histologischer Typ; Tu-Grad= Tumor Grading; ER= Östrogenrezeptorstatus; PR= Progesteronrezeptorstatus; p=Primärtumor; r= Rezidivtumor; m=Metastase; d=duktal; l=lobulär; d/l=gemischt duktal/lobulär; me=medullär; mu=muzinös; phyll.=Phylloidestumor; pT/ pT- spez= Tumorausdehnng gemäß TNM-Klassifikation, pN/ pN-spez= Lymphknotenbefall gemäß TNM-Klassifikation

3.1.2) Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Deionisierungsanlage	Ultra Pure Water System MilliQ UF Plus	Millipore
Färberahmen		Eigene Herstellung
Gelkammer (Agarosegele), klein	Pharmacia CKB GNA 100	Hofer, Pharmacia Biotec
Gelkammer (Agarose), groß	HE 99X – 15 – 1,5	Hofer, Pharmacia Biotec
Gelkammer (Polyacrylamidgele)	Blue Line, Blue Seq 400	Serva
Gelkammer (Polyacrylamidgele)	Grey Line, SQ 3 Sequencer	Hofer™
Gelkammer (Polyacrylamidgele)	Pokerface II, SE 1600	Hofer Scientific Instruments (hsi)
Geltrockner	Slab Gel Dryer, Modell GD 2000 – 230V, 35x44cm	Hofer™, Pharmacia Biotec
Kamera	PHC 34	Hofer Scientific Instruments
Netzgerät, Power Supply	2103 Power Supply	LKB Biochrom
Netzgerät, Power Supply	Blue Power 3000	Serva

Gerät	Modell	Hersteller
Magnetrührer (Magnet stirrer)	HI 300N	Hanna Instruments
Magnetrührer mit Heizplatte	Infa amag ® Ret	JK
Mikrotom		Microm
Mini-Shaker (Tisch – Shaker)	Modell Kühner	Braun
PCR – Thermocycler	Uno - Thermoblock	Biometra®
PCR – Thermocycler	Tri – Thermoblock, T3 - Thermocycler	Biometra®
Pipetten	P10, P20, P100, P200 eppendorf research	Eppendorf
Pipetten	Einmalpasteurpipetten mit integriertem Saugball, 1 ml	Sarstedt
UV-Lampe (Membran –) Vakuumpumpe	MZ 2C	Hoefer Scientific Instruments Vacuubrand GmbH ATB
Vortex	Genie 2	Bender und Hobein
Waage	SPB 52	Scal tec
Wasserbad 37°/ 55°C	1003	Ges. für Labortechnik
Zentrifuge (Tischzentrifuge)		Eppendorf
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus

Tab. 3.3: Verwendete Geräte, Modell – und Herstellerangaben

3.1.3) Chemikalien und Lösungen

Substanz	Hersteller
40% (w/v)Acrylamide/ Bis Solution	Life Technologies
Agarose	Boehringer
Agarose	Serva Electrophoresis
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampuwa®	Fresenius Kabi
Aqua Spüllösung Delta Pharma	Boehringer Ingelheim
Blue Slick (Repellents)	Serva

Substanz	Hersteller
Borsäure	Fluka
Bromphenolblau	Merck
DNTP's	Life Technologies
EDTA	Sigma
Essigsäure 99 – 100%	Merck
Ethanol absolut	Merck
Ethanol absolut p.a. 100%	Riedel de Haën
Ethydiumbromid	Sigma
Filterpapier	Schleicher und Schüll
Formaldehydlösung, p.a., min 37%	Merck
Formamid, p.a.	Merck
Harnstoff zur Analyse	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid 50 mM	Life Technologies
Natriumcarbonat, wasserfrei, reinst	Merck
Natriumchlorid für die Molekularbiologie	Merck
20% Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
0,1% Nonidet P40 / 0,9% NaCl	Sigma
Paraffin dickflüssig	Merck
10x PCR Puffer minus Mg	Life Technologies
Proteinase K	Boehringer Mannheim
QUIAamp Tissue Kit	Quiagen
Salpetersäure 65%, reinst	Merck
Salzsäure 32%, p.a.	Merck
SE – Kernpuffer pH8,0	Merck
Silbernitrat p.a., ACS, ISO	Merck
Taq-DANN-Polymerase	Gibco
TEMED	BioRad
Trizma®Base Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma Chemical Co.
Tris Puffer, HCl	Life Technologies
Xylencyanol	Merck

Tab3.4.: Verwendete Chemikalien und Lösungen mit Herstellerangaben

Lösungen:**Agarose – Gel**

Agarose	1,4 g
0,6x – TBE	ad 70 ml

20% - APS

APS – Pulver	2 g
H ₂ O	10 ml

dNTPs

2 mM dATP	10 µl
2 mM dCTP	10 µl
2 mM dGTP	10 µl
2 mM dTTP	10 µl
H ₂ O	460 µl

0,5 M EDTA

EDTAx2 H ₂ O	144,4 g
NaOH - Plättchen	80 g

10% - Essigsäure

99 – 100% - Essigsäure	1 l
dest. Wasser	0 l

10% - Ethanol

100% - Ethanol	1 l
dest. Wasser	9 l

70% - Ethanol

100% - Ethanol	7 l
dest. Wasser	3 l

6M NaCl (gesättigt)

NaCl	350,64 g
Aqua bidest.	1 l

+ rühren und erhitzen, 30 – 60 min.

Salz fällt beim Kühlen wieder aus.

3% - Natriumcarbonat

Natriumcarbonat	450 g
37% Formaldehydsg.	7,5 ml
dest. Wasser	ad 15 l

0,1% Nonidet P40 / 0,9% NaCl

NaCl	18 g
Nonidet P40	2 ml
Aqua bidest.	ad 2 l

PAGE – Gellösung, 8%

40%Acrylamid/Bis,19:1	200 ml
10x - TBE	100 ml
Harnstoff (Urea)	460 g
MilliQ - Wasser	ad 1 l

PAGE – Gellösung, 10%

40%Acrylamid/Bis,19:1	250 ml
10x - TBE	100 ml
Harnstoff (Urea)	460 g
MilliQ - Wasser	ad 1 l

PAGE – Ladepuffer

Formamid	45 ml
10x –TBE	5 ml
0,5 M EDTA	100 µl
10% - SDS	50 µl
Bromphenolblau	0,025%
Xylencyanol	0,025%

10x PCR – Puffer

Tris – HCl (pH 8,4)	200 mM
KCl	500 mM

Primerlösungen

20 pMol/l in aqua bidest.

Proteinase K

Proteinase K	1 g
Aqua bidest	100 ml

+ portionieren á 5 ml bei –20°C

1% - Salpetersäure

65% - Salpetersäure	200 ml
dest. Wasser	ad 15 l

20% SDS (Natriumdehydrogensulfat)

SDS	20 g
Aqua bidest	100 ml

SE – Kernlysispuffer pH 8,0

NaCl	75 mM = 4,38 g
EDTA	25 mM = 8,41 g
Aqua bidest	ad 1 l

+ autoklavieren

02% - Silbernitrat

Silbernitrat	4 g
MilliQ - Wasser	2 l

0,6x – TBE

10x – TBE	60 ml
dest. Wasser	1 l

1x – TBE

10x – TBE	1 l
dest. Wasser	9 l

10x – TBE

Trizma Base	540 g
Borsäure	275 g
0,5 M EDTA pH0,8	200 ml
dest. Wasser	ad 5 l

0,5 TE – Puffer, pH 8,0

0,5 M EDTA	0,5 ml
1 M Tris HCl, pH8,0	2,5 ml
Aqua bidest	ad 500 ml

+steril filtrieren, autoklavieren

3.1.4) Enzyme

Taq – Polymerase (5U/ μ l) Life Technologies

3.1.5) Andere Materialien und Reagenzien

pUC 19/ MspI (DNA-Marker) MBI Fermentas, Dr. Baring GmbH

Bunsenbrenner

Meßbecher, 100 ml Schott

Messkolben, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 100 ml, 400 ml Blau Brand

Mikrotiterplatten Biozym

Pipettenspitzen, 10 μ l Biozym

Pipettenspitzen, 10 μ l, mit Filtertips Biozym

Pipettenspitzen, 100 μ l Sarstedt

Pipettenspitzenhalter Biozym

Reagensgefäße, 50 ml

Reaktionsgefäße, 0,6 ml Biozym, budget line

3.2) Methoden

3.2.1) Aufbereitung des Tumorgewebes

Das Tumorgewebe wurde durch operative Extirpation des klinisch auffällig gewordenen Knotens gewonnen. Darauf folgte unmittelbar das Tiefgefrieren zunächst auf -20°C , danach in flüssigem Stickstoff auf -80°C bis zur DNA-Extraktion. Zur Ermittlung der Histopathologie wurde das Gewebe mit Hilfe eines Gefrierkryostats in 5-10 μm dicke Schnitte unterteilt und mit Hämatoxylin und Eosin (sogenannte HE – Färbung) angefärbt. Anschließend wurde es unter dem Mikroskop begutachtet. Festgestellt wurden u.a. histologischer Typ, Materialtyp, Dignität, Gewicht, außerdem Östrogen- (ER-) und Progesteron- (PR-) Rezeptoranteil. Des Weiteren wurde vom Pathologen eine Einteilung nach TNM-Klassifikation und ein Grading vorgenommen. Der Anteil des Normalgewebes wurde bestimmt, da hohe Prozentsätze diesbezüglich die DNA-Analysen des Tumormaterials verfälschen. In diesem Fall (Normalgewebe >10%) wurden mittels manueller Mikrodissektion nicht tumorhaltige Areale entfernt und 10-20 μm dicke Tumorgewebs-Schnitte zur DNA-Isolierung direkt in flüssigen Stickstoff geraspelt. Dadurch konnte eine Anreicherung auf mindestens 80% erzielt werden. Bei der DNA-Extraktion wurde Blut aus 20ml EDTA- oder Citrat-Blut entnommen.

3.2.2) DNA-Extraktion

3.2.2.1) DNA-Extraktion aus Blut

Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten.

Zur DNA-Extraktion aus gefrorenem und frischem Blut wurde die Methode nach Blin und Stafford (1976) angewandt.

Durchführung:

Dabei wird das Blut je nach Bedarf entweder durch Erwärmen bei Raumtemperatur oder im Wasserbad aufgetaut. 20ml Blut fügt man das gleiche Quantum 0,1% Nonidet P40 Lösung hinzu. Dieses wird zur Zellyse gut geschüttelt und dann 20 min. auf Eis gestellt. Danach wird 15 min. lang bei 4000U und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Erythrozyten und Plasma) wird dekantiert. Das Pellet (mit der in den Leukozyten sitzenden DNA) wird anschließend mit 30ml 0,1% Nonidet P40 Lösung mindestens ein mal, evtl. zwei mal gewaschen (abhängig vom Farbton als Indikator für Reinheit: das Annehmen klarer Farbe bedeutet zunehmende Reinheit). Es folgt ein weiterer 15-minütiger Schritt durch erneutes Zentrifugieren bei oben genannten Parametern, der Überstand

wird wiederum abgekippt. Das jetzt weiße Pellet wird nach Abtropfen auf Fliespapier in 10µl SE-Kernpuffer, 100µl Proteinase K und 500µl 20%-SDS-Lösung resuspendiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Als nächster Schritt folgt eine Zugabe von 6ml 6M NaCl, Schütteln, eine 15-minütige Inkubation im Wasserbad bei 55°C und eine 15-minütige Zentrifugation (4000U, Raumtemperatur). Der Überstand, der nun aus der DNA besteht, wird in ein Reaktionsgefäß gefüllt. Das Pellet verwirft man. Die DNA wird durch Addieren der zweifachen Menge des Überstands an eiskaltem 100%igen Ethanol präzipitiert. Je nach Menge wird die DNA nach Aufnahme mit einer Pasteurpipette schließlich in 400-700µl TE Puffer resuspendiert, die DNA-Konzentration durch eine photometrische Messung ($\lambda=260\text{nm}$; OD1 = 50mg/ ml) bestimmt und bis zur Verwendung in der PCR bei 4°C aufbewahrt.

Bei größeren Mengen Blut werden die Parameter (außer den 30ml 0,1% Nonidet P40 Lösung zu Waschzwecken) entsprechend erhöht.

3.2.2.2) DNA-Extraktion aus Tumorgewebe

Bei der DNA-Extraktion aus Tumorgewebe entfällt die Zellyse durch 0,1% Nonidet P40 Lösung, da die Schnitte bei -80°C in Stickstoff gelagert wurden. Zum Pellet gibt man direkt SE-Kernpuffer, Proteinase K und 20% SDS. Es wird über Nacht bei 37°C inkubiert, dann 6M NaCl hinzugefügt, 15 min. bei 55°C inkubiert, 15 min. bei 4000U/ 4°C zentrifugiert. Zum Schluss wird mit 100%-Ethanol ausgefällt und die DNA in TE-Puffer resuspendiert (entsprechend 3.2.2.2).

3.2.2.3) DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebettetem Gewebe

Bei dieser Methode wurde das DNA-Extraktionskit QIAamp Tissue Kit der Firma Qiagen verwendet: Ca. 10 Gewebsschnitte werden mit 20µl Proteinase K versetzt und bei 55°C über Nacht inkubiert. Es folgen 200µl Kit-Puffer AL, Vermischen und Inkubation bei 70°C für 10 min.. Anschließend fügt man 210µl 100% - Ethanol und zentrifugiert 1 min. bei 8000rpm. Nach Addition von 500µl Kit-Puffer AW und erneutem Zentrifugieren werden das erste bis dritte Filtrat verworfen. Durch Zugabe von 200µl und Zentrifugieren wird die DNA gewonnen. Der letzte Schritt kann zur größeren Materialgewinnung wiederholt werden.

3.2.3) DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988) ermöglicht eine exponentielle Amplifikation ausgewählter DNA-Abschnitte aus Nukleinsäuremolekülen. Für diese Vervielfältigung werden kurze, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die den flankierenden Bereichen der Zielsequenz komplementär sind. Eine PCR besteht aus sich wiederholenden Zyklen der

Denaturierung, des Annealings und der Extension. Beim ersten Denaturierungsschritt werden die Nukleinsäuremoleküle durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C in Einzelstränge zerlegt. Durch eine darauf folgende Temperatursenkung auf einen vom GC-Gehalt der Oligonukleotide abhängigen Wert, lagern sich im zweiten Schritt die Primer an die nun zugänglich gewordenen, komplementäre Sequenzen an (Annealing). Im dritten Schritt wird die hitzestabile Taq-Polymerase, ein aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnenes Enzym mit einem Temperaturoptimum von 72°C, als Katalysator eingesetzt. Mit ihrer Hilfe erfolgt die Neusynthese des Gegenstranges (Extension). Sie benutzt die freien 3'-OH-Enden als Ansatzstelle. Optimale Reaktionsbedingungen, d.h. Inkubationszeiten, Temperaturen (meist zwischen 50°C und 65°C), Magnesiumchlorid-Konzentrationen (meist zwischen 1,0mM und 2,5mM) und Zyklenzahlen (meist zwischen 25 und 35) variieren für jeden Primer und müssen jeweils ausgetestet werden.

Die Primersequenzen wurden z.T. der Literatur entnommen, z.T. eigenständig ausgesucht und durch die Firma Life Technologies synthetisiert.

Durchführung:

Das Gesamtvolumen einer PCR-Reaktion betrug 10µl. Das Pipettierschema ist in Tab.3.5 dargestellt. Die Lösungen sind unter 3.1.3) auf S. 27-29 beschrieben. Der PCR-Ansatz wurde für mehrere Proben pipettiert und anschließend in Reaktionsgefäße oder Mikrotiterplatten aliquotiert. Nach Zufügen der DNA wurde die Mischung mit einem Tropfen dickflüssigem Paraffinöl beschichtet, um einem Verdunsten des Ansatzes während der PCR vorzubeugen.

PCR - Ansatz	Einheiten
DNTP's	1
Puffer	1
MgCl ₂	0,2/0,3/0,4/0,5*
1.Primer	0,5
2.Primer	0,5
H ₂ O	5,74/5,64/5,54/5,44*
Taq	0,06
DNA	1
Gesamt	10

*In Abhängigkeit der gewünschten Molarität des PCR-Ansatzes wird die entsprechende Menge MgCl₂ und H₂O hinzugefügt:

1,0mM = 0,2µl MgCl ₂ = 5,74µl H ₂ O
1,5mM = 0,3µl MgCl ₂ = 5,64µl H ₂ O
2,0mM = 0,4µl MgCl ₂ = 5,54µl H ₂ O
2,5mM = 0,5µl MgCl ₂ = 5,44µl H ₂ O

Tab.3.5: PCR-Pipettierschema zum LOH-Nachweis



Abb.3.9: PCR-Ansätze in Mikrotubes im PCR-Thermocycler (Biometra®)

Den oben beschriebenen (S.31-32) drei PCR-Schritten des PCR-Programms gingen ein initialer Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 min voraus und das Programm wurde abgeschlossen durch einen abschließenden Extensionsschritt bei 72°C für 10 min. Die PCR-Produkte wurden bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei Temperaturen um 4°C aufbewahrt.

Die für jedes Primerpaar ermittelten PCR-Bedingungen sind in entsprechenden Kapiteln angegeben. Optimale PCR-Bedingungen sind besonders bei der LOH-Analyse von hoher Bedeutung, da eine geringe Stringenz (zusätzliche Banden von unspezifischen Produkten) oder schwache Banden (hohe Stringenz) die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.

Zyklus	Temperatur	Arbeitsschritt	Dauer
Zyklus 1	95°C	Denaturieren	5 min.
Zyklus 1 bis x	95°C	Denaturieren	30 sec.
	y°C	Annealing	30 sec.
	72°C	Extension	40 sec.
nach Zyklus x	72°C	Inkubation	10 min.
	4°C	Reaktionsstop	Pause

Tab.3.6: PCR-Programm zum LOH-Nachweis. x= Variable,= Anzahl der Zyklenzahl;

y=Variable= Annealing-Temperatur

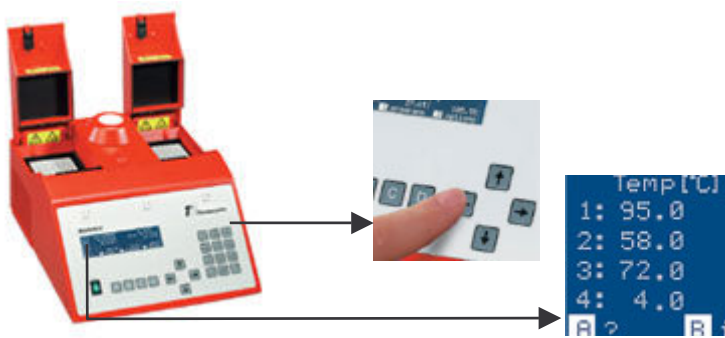


Abb.3.10: PCR – Thermocycler, Tri – Thermoblock, (Biometra®)

Zu Kontrollzwecken wird das PCR-Produkt mit 5µl Ladepuffer versetzt und auf 2%-igen Agarosegelen, die Ethydiumbromid (3-5ml/ Ansatz) enthielten, neben einem Größenstandard (pUC 19) aufgetrennt. Anschließend konnte es unter der UV-Lampe sichtbar gemacht und analysiert werden.

3.2.4) Mikrosatelliten-Untersuchung zum Nachweis von Allelverlusten, LOH-Nachweis

Die Identifikation der Allelverluste wurde mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern mittels PCR durchgeführt. Mikrosatellitenmarker bestehen aus kurzen, polymorphen, sich tandemartig wiederholenden Sequenzen. Sie machen mehr als 1% des Genoms aus, sind über das ganze Genom verteilt und wiederholen sich in regelmäßigen Abständen von ca. 10–30 Basenpaaren (Louis et al., 1992). Di-, Tri-, Tetra- und Pentanukleotidwiederholungen werden bevorzugt zur Identifizierung von Allelverlusten eingesetzt. Mikrosatellitenmarker mit variabler Anzahl an Wiederholungseinheiten innerhalb der Population, d.h. mit einer Vielzahl allerer Formen, sind besonders geeignet für diese Untersuchungen, da sie polymorph sind und eine hohe Heterozyotenfrequenz besitzen (Hamada et al., 1982; Hamada et al., 1984; Weber et al., 1990, Louis et al., 1992).

Eine heterozygote Allelverteilung ist durch eine unterschiedliche Anzahl der Wiederholungseinheiten der Mikrosatellitenmarker des mütterlichen und des väterlichen Allels gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu entspricht die Anzahl der Wiederholungseinheiten des mütterlichen Allels bei einem nicht informativen Allelstatus der des väterlichen Allels. Dies kann nach Amplifikation und Analyse der PCR-Produkte in denaturierten Polyacrylamidgelen durch elektrophoretische Auftrennung dargestellt werden: heterozygote Allele zeigen zwei Banden, nicht informative Allele nur eine Bande. Das Fehlen einer Bande, d.h. eines Allels, weist bei heterozygotem Allelstatus auf einen Allelverlust oder einen Verlust der Heterozygotie hin. Die

Identifizierung dieser LOHs gelingt durch die Amplifikation konstitutioneller DNA aus Blut- und Tumorproben mit den oben beschriebenen spezifischen Primern, die diese polymorphen Bereiche flankieren.

Die Darstellung der Heterozygotie-Verluste (LOHs) mittels elektrophoretischer Auftrennung in einem Polyacrylamidgel und anschließender Silberfärbung erweist sich als zuverlässige Methode und ist laut von Deimling et al. (1993) vergleichbar mit der Darstellung von LOHs mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP). Der Vorteil der Silberfärbung besteht außer ihrer Zeitersparnis gegenüber den RFLPs in der nicht radioaktive Analyse (Budowle et al.,1991; von Deimling et al.,1993).

Die verwendeten Mikrosatellitenmarker mit ihren charakteristischen Merkmalen, die zum Nachweis der Allelverluste eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3.7 aufgelistet:

Marker		Locus	Typ	Allelgröße (kb)
MS-bn43-1	F	44231genMGEA5	DINC	239
	R	44449genMGEA5		
MS-bn43-2	F	99721genMGEA5	DINC	201
	R	99902genMGEA5		
MS-bn43-3	F	45779genMGEA5	3x DINC	246
	R	46006genMGEA5		
MS-bn43-4	F	10979genMGEA5	DINC	208
	R	11167genMGEA5		
MS-bn43-5	F	64147genMGEA5	PENC	180
	R	64305genMGEA5		
MS-bn43-6	F	94047genMGEA5	TRINC	239
	R	94203genMGEA5		
MS-bn43-7	F	98728genMGEA5	TETNC	254
	R	98981genMGEA5		
MS-bn43-8	F	8584genMGEA5	PENC	130
	R	8714genMGEA5		
MS-bn43-9	F	85708genMGEA5	TETNC	246
	R	85954genMGEA5		

Marker		Locus	Typ	Allelgröße (kb)
MS-bn43-10	F	35468genMGEA5	PENC	186
	R	35654genMGEA5		
MS-bn43-11	F	96006genMGEA5	TETNC	171
	R	96177genMGEA5		
MS-bn43-12	F	10q24.1 - q24.3	PENC	148
	R	10q24.1 - q24.3		

Tab. 3.7: Mikrosatellitenmarker zum Nachweis von LOHs.

DINC=Dinukleotid; TRINC=Trinukleotid; TETNC=Tetranukleotid; PENC=Pentanukleotid
 kb=Kilobasen; F=forward primer; R=reverse primer

3.2.5) Agarose - Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes auf Agarosegelen (Sambrook, 1989) erfolgte zu Kontrollzwecken. Ihr Prinzip beruht auf der Beweglichkeit der geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Die Phosphatgruppen im Rückrat der Nucleinsäuren sind ionisiert. Die Nucleinsäuren bewegen sich daher als Polyanionen von der Kathode (-) zur Anode (+), wobei ihre Beweglichkeit größenabhängig ist. Es wurden 2%-ige Agarosegele verwendet. 1,4g Agarose wurde mit 0,6x-TBE ad 70ml aufgefüllt, erst aufgeköcht, dann abgekühlt und mit 5µl Ethydiumbromid versetzt und dann in die Kammern gegossen, in denen das Gel polymerisierte. Die Proben (10µl Produkt) wurden mit 5µl Laufpuffer versetzt (Verhältnis 2:1) und neben einem Größenstandard (pUC 19) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0,6x-TBE. Die Laufzeit betrug 15 min. bei 200V. Ethydiumbromid schiebt sich zwischen die DNA und fluoresziert bei UV-Bestrahlung ($\lambda=366\text{nm}$). Dadurch konnte das Produkt visualisiert werden.

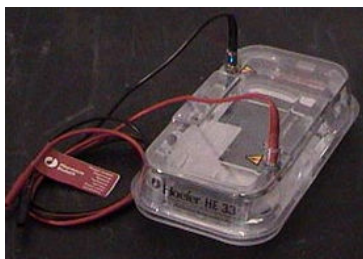


Abb.3.11: Gelkammer (Agarosegele) (Pharmacia CKB GNA 100, HoeferTM, Pharmacia Biotec)

3.2.6) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) werden die PCR-Produkte auf hochauflösenden 8%- bzw. 10%-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Durchführung:

Die Gele sind 43,8 x 36,8cm (Pokerface II), 40,8 x 32,8cm (Blue Line) oder 41,8 x 33,2cm (Grey Line) groß, 0,35mm dick und enthalten je 32 Taschen (0,6 cm). 70ml (Blue Line, Grey Line) bzw. 80ml (Pokerface) der Acrylamidmischung (siehe S.27-28) werden mit 360 μ l 20%-igem Ammoniumpersulfat (APS) und 40 μ l TEMED versetzt und zügig zwischen zwei Glasplatten gegossen. Diese behandelt man vorher mit Blue Slick, um das Anhaften des Gels an den Glasplatten zu vermeiden, versieht sie mit 0,35mm- Spacern und klebt zwei Platten zusammen. Nach Polymerisation des Gels wird es in den Glasplatten in die Gelkammer eingesetzt und mit 1x-TBE als Laufpuffer versehen. Das Gel benötigt zum Aufwärmen eine Vorlaufzeit von 20 min. bei 75 Volt. In dieser Zeit werden die Proben mit 5 μ l Ladepuffer versehen, kurz vor dem Auftragen bei 95°C für 8 min. erhitzt (denaturiert) und direkt auf Eis gestellt (Verhindern des Renaturierens). Vor dem Beladen der Geltaschen wird aus diesen mittels einer Pasteurpipette der Harnstoff ausgespült. Die Proben werden dann neben einem Größenstandard (pUC 19) bzw. einem laborinternen Größenstandard und einer Negativprobe (Wasserprobe) aufgetragen. Die Laufzeit der Polyacrylamidgelelektrophorese beträgt je nach Produktgröße 90- 150 Minuten bei 75 Volt. Nach Beendigung der Auftrennung wird das Gel aus der Kammer entfernt und eine der Glasplatten vorsichtig abgehoben, um durch anschließende Silberfärbung die Produkte sichtbar machen zu können.



Abb.3.12: PAGE-Kammern, Biometra®

Tabelle 3.8 stellt die verwendeten Primersequenzen und Bedingungen dar:

Primer		Sequenz	PCR- Bedingungen	Zeit [sec]	Gel-Bed. in %
MS-bn43-1	F	5'-GGA ATG GAC TGA GGC CAA C-3'	95°C	30	8%
	R	5'-CTA TCC ATG GCC CAC GAT C-3'	52°C 72°C 30 Zyklen 1,0 mM	30 40	
MS-bn43-5	F	5'-TCT AGT ATG GCT TGG CTT TG-3'	95°C	30	8%
	R	5'-GTT TGC AGT TAG CCG AGA TG-3'	56°C 72°C 30 Zyklen 2,0 mM	30 40	
MS-bn43-6	F	5'-TGA GGC CCT GTG TAC CGT TC-3'	95°C	30	8%
	R	5'-CCC CAC ACT GTA ATG AGT GC-3'	60°C 72°C 30 Zyklen 1,5 mM	30 40	
MS-bn43-12	F	5'-CCA AGA CCA TGA AAC CCA TC-3'	95°C	30	10%
	R	5'-GGA ACT TCA TTT CAT TTT CAG G-3'	63°C 72°C 72°C 31 Zyklen 2,0 mM	30 40 40	

Tab.3.8: Primersequenzen, PCR – Bedingungen und Gelbedingungen der verwendeten Primer

3.2.7) Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung weist mit einer hohen Sensitivität DNA-Fragmente in Polyacrylamidgelen nach (Budowle et al., 1991).

Durchführung:

Die nach Trennung der Glasplatten verbleibende Glasplatte, an der das Gel haftet, wird in einen Färberahmen eingespannt (Bender et al., 1994) und nach dem Färbeschema der Tabelle 3.9 gefärbt.

Silberfärbung:

Lösung:	Einwirkzeit [Minuten]	Funktion
10% Ethanol	5 - 10	Fixieren
1% Salpetersäure	1 - 2	pH - Steigerung
aqua deion.	1 x Spülen	Spülen
0,2% Silbernitrat	20 - 25	Komplexbildung, Anfärben
aqua deion.	3 x Spülen	Spülen
3% Natriumcarbonat + Formaldehyd	5 - 20 / bis Banden sichtbar	Farbreaktion durch pH-Wert-Änderung, Red. zu elem. Ag
10% Essigsäure	3 - 5	Reaktionsstop durch pH-Wert-Umkehr
aqua deion.	2 x Spülen	Spülen
auf Papier aufziehen		
Trocknen bei 80°C, ca. 0,5 - 2h		

Tab.3.9: Färbeschema mit den einzelnen Schritten der Silberfärbung

Red. zu elem. Ag.=Reduktion zu elementarem Silber (aus komplexierten Silberionen)

Die DNA wird als deutlich braun gefärbte Bande sichtbar.

Nach der Silberfärbung wird das Gel mit Filterpapier von der Glasplatte gezogen und bei 80°C für eine halbe bis eine ganze Stunde auf einem Vakuumtrockner getrocknet.

4) Ergebnisse

4.1) Molekulargenetische Analyse des Kandidatengens MGEA5

4.1.1) Mikrosatellitenanalyse auf Chromosom 10q.24.1-q24.3 in primären Mammakarzinomen, Metastasen und Rezidiven

In dieser Arbeit wurden 66 Proben, davon 47 Primärtumoren, 8 Rezidive und 3 Metastasen (8 ohne Angaben) mittels der Mikrosatelliten-Marker MS-bn43-1, MS-bn43-5, MS-bn43-6 und MS-bn43-12 auf Allelverluste auf dem langen Arm von Chromosom 10 in der Region 10q24.1-q24.3 untersucht, um eine eventuelle Beteiligung an der Pathogenese des Mammakarzinoms nachzuweisen. Hierbei handelt es sich um ein Gen, dessen onkogenes Potential bereits bei anderen Tumorentitäten nachgewiesen wurde (dem Meningeom).

Tabelle 4.1 veranschaulicht die ermittelten Ergebnisse der LOH-Analysen.

Primer	Lokalisation	Primäre Mammakarzinome					Rezidive					Test chi ²
		n	h	ni	LOH	%	n	h	Ni	LOH	%	
Marker: 579/580 MS-bn43-1	44231 - 44449 genMGEA5	41	19	22	0	0	8	4	4	0	0	n.s.
Marker: 587/588 MS-bn43-5	64147 - 64305 genMGEA5	47	47	0	0	0	8	8	0	0	0	n.s.
Marker: 589/590 MS-bn43-6	94047 - 94203 genMGEA5	47	2	44	1	2,13	8	1	7	0	0	n.s.
Marker: 646/647 MS-bn43-12	10q24.1 - q24.3	47	45	2	0	0	8	8	0	0	0	n.s.
Gesamt:		182	113	68	1	0,55	32	21	11	0	0	n.s.

Tab.4.1: Allelverluste auf Chromosom 10q in primären Mammakarzinomen und Rezidiven

n = Anzahl der untersuchten Proben; h = heterozygot; ni = nicht informativ

LOH = loss of heterozygosity; % = Prozentsatz an LOHs; chi² = chi²-Test

n.s.= nicht signifikant

Primer	Lokalisation	Metastasen					keine Angabe					Test chi ²
		n	h	ni	LOH	%	n	h	ni	LOH	%	
Marker: 579/580 MS-bn43-1	44231 - 44449 genMGEA5	3	1	2	0	0	8	4	3	0	0	n.s.
Marker: 587/588 MS-bn43-5	64147 - 64305 genMGEA5	3	3	0	0	0	8	8	0	0	0	n.s.
Marker: 589/590 MS-bn43-6	94047 - 94203 genMGEA5	3	0	3	0	0	8	0	8	0	0	n.s.
Marker: 646/647 MS-bn43-12	10q24.1 - q24.3	3	3	0	0	0	8	8	0	0	0	n.s.
Gesamt:		12	7	5	0	0	32	20	11	0	0	n.s.

Tab. 4.2: Allelverluste auf Chromosom 10q in Metastasen und Tumoren mit fehlender Zugehörigkeit zum Tumortyp
n = Anzahl der untersuchten Proben; h = heterozygot; ni = nicht informativ
LOH = loss of heterozygosity; % = Prozentsatz an LOHs; chi² = chi²-Test
n.s.= nicht signifikant

Es zeigte sich, dass nur ein Primärtumor einen Allelverlust aufwies.

Somit wurde in 0,62% aller untersuchten informativen (heterozygoten) Tumoren (insgesamt 113) ein Allelverlust mit dem Mikrosatellitenmarker MS-bn43-6 festgestellt.

Es konnten keine signifikant erhöhten LOH- Frequenzen in der chromosomalen Region 10q24.1-q24.3 evaluiert werden.

Abbildung 4.1 demonstriert die prozentuale Verteilung der Allelverluste für die einzelnen aussagekräftigen Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10q.

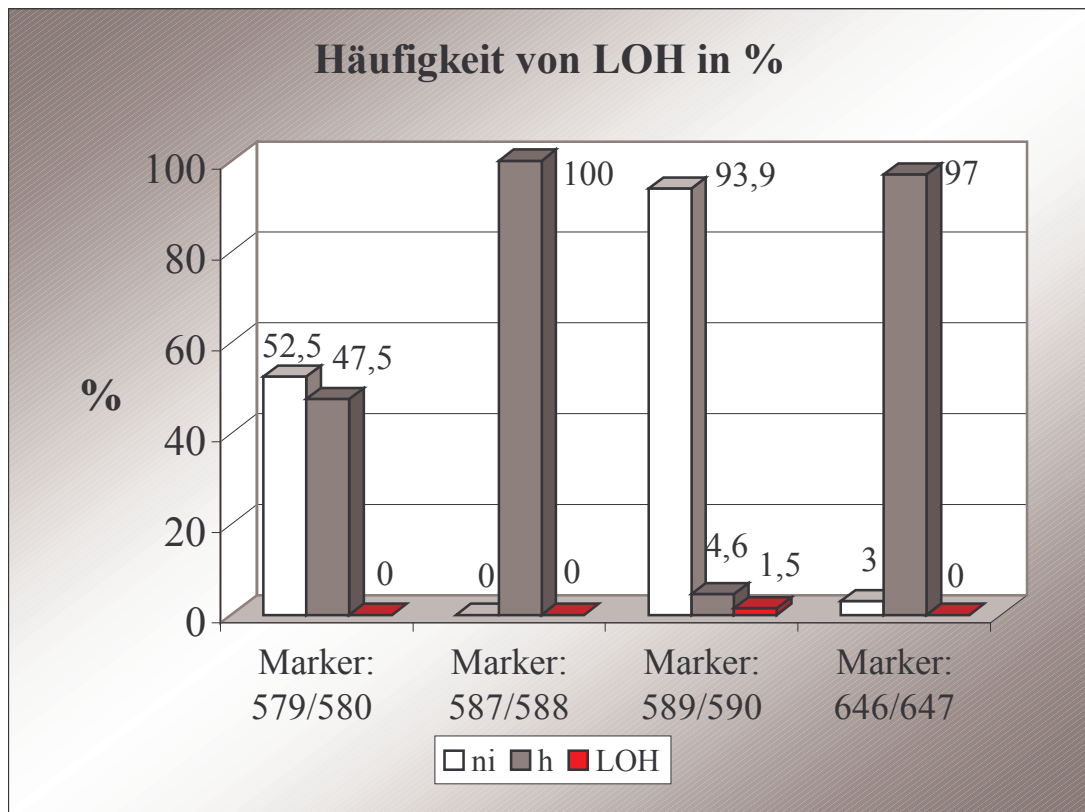


Abb.4.1: Häufigkeit von LOH in Prozent, markerspezifisch

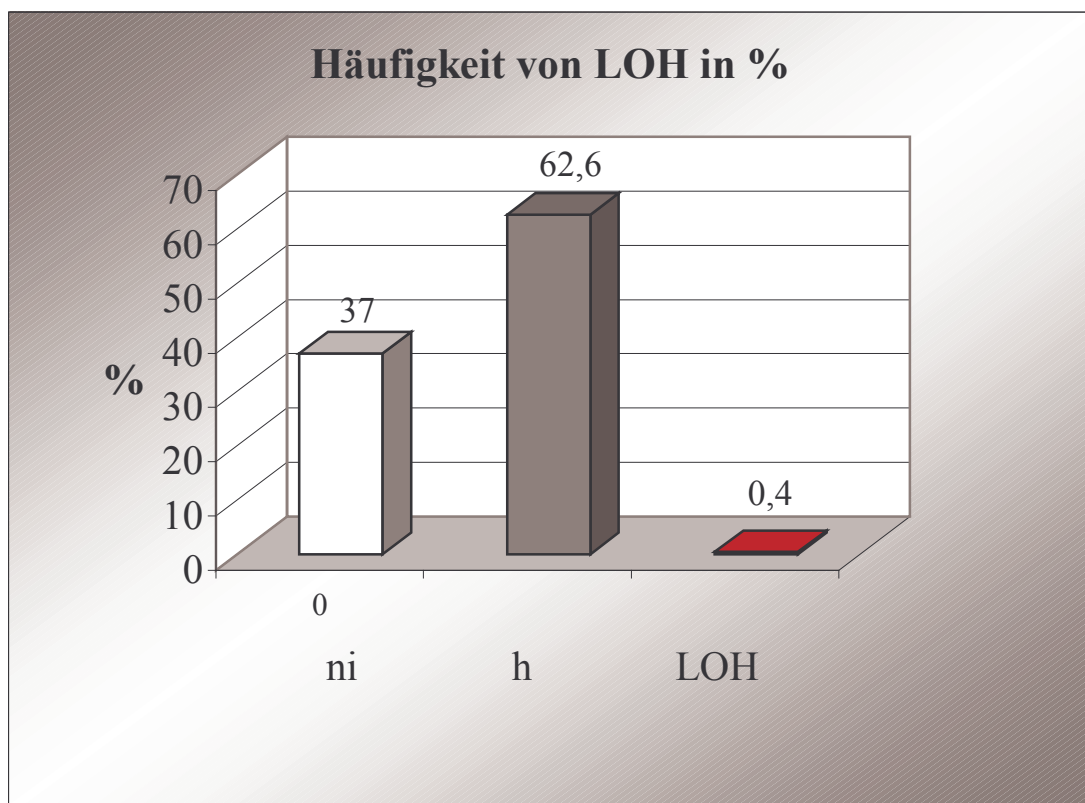


Abb.4.2: Häufigkeit von LOH in Prozent: aller Marker des Genabschnittes 10q24.1-q24.3

In Abbildung 4.2 ist der Vergleich der Produkte des Primärtumors 332 eines Mammakarzinoms mit dem korrespondierenden Blut (331) anhand der aussagekräftigen Mikrosatellitenmarker MS-bn43-1, -5, -6 und -12 dargestellt. Des weiteren ist der gefundene LOH des Tumors 1102 mit dem zugehörigen Blut 1103 abgebildet.

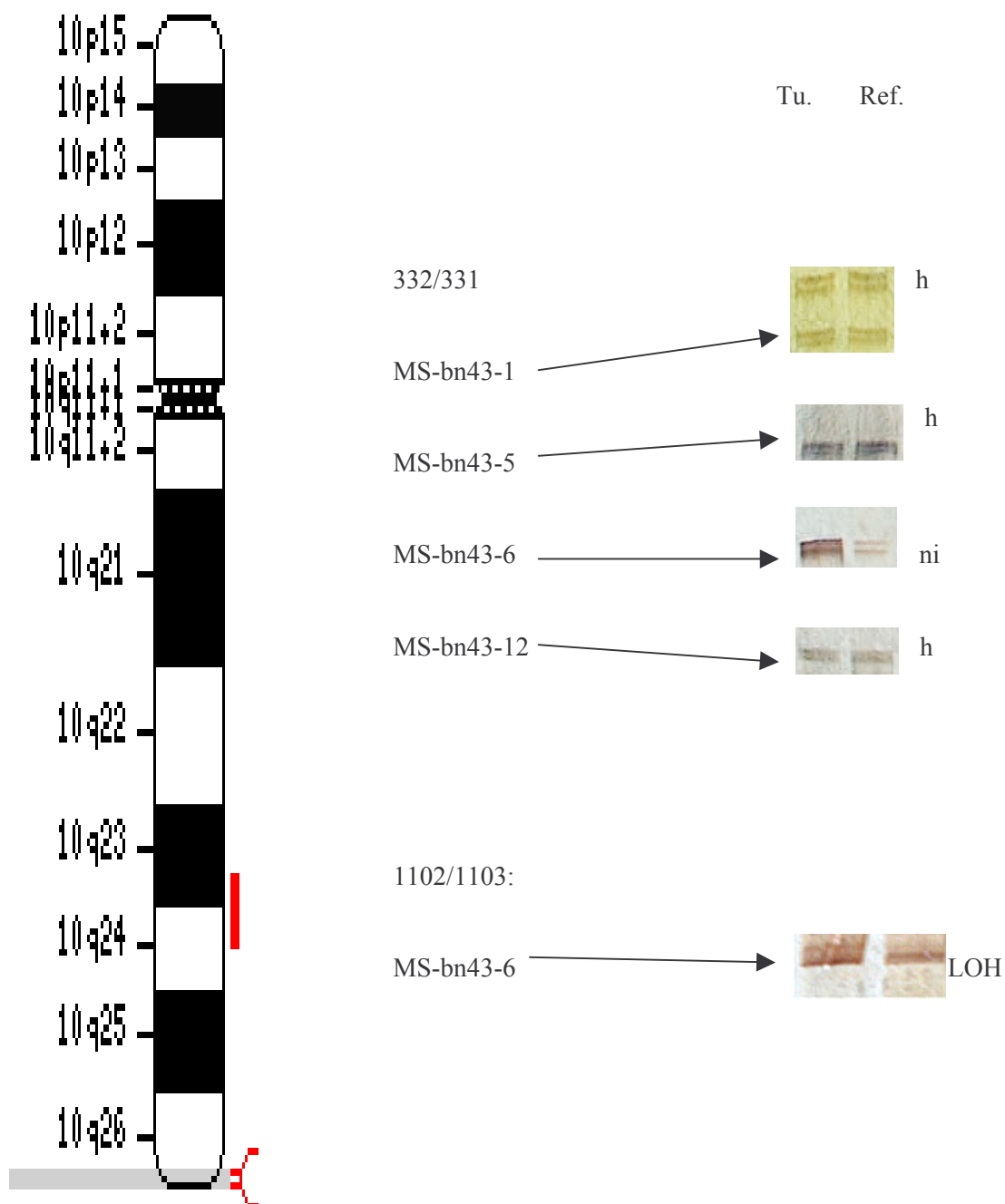


Abb. 4.2: Ein Allelverlust auf 10q in einem Primärtumor (1102) im Vergleich zum Blut (1103)
LOH = loss of heterozygosity; h = heterozygot; ni = nicht informativ; Ref. = Referenz; Tu. = Tumor

5) Diskussion**5.1) Beteiligung des Kandidatengens MGEA5 an der Pathogenese des sporadischen Mammakarzinoms**

In einer vorausgegangenen Arbeit wurde die Expression des Meningeoma Expressed Antigen 5 (MGEA5) auf Chromosom 10q24.1-q24.3 in verschiedenen Meningeomen und anderen menschlichen Geweben mittels reverser Transkriptase (RT)-PCR und northern-blot Hybridisierung nachgewiesen (Heckel et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Hinweise auf den kausalen Zusammenhang von Veränderung des Genmaterials dieses Genabschnittes und der potentiellen Entstehung weiterer Tumoren, hier mit Hinblick auf die Entstehung des Brustkrebses untersucht. Bei der Untersuchung von 66 sporadischen Mammakarzinomen auf Allelverluste auf 10q24.1-q24.3 mit Mikrosatellitenmarkern, welche die genannte Region abdeckten, konnte kein Zusammenhang zwischen ‚loss of heterozygosities‘ und der Genesis des Mammakarzinoms nachgewiesen werden.

Auf Chromosom 10 wurden andere bekannte Genveränderungen bereits früher als potentielle Ursache für das Mammakarzinom mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht:

Das Gen PTEN/MMAC1/TEP stellt beispielsweise ein interessantes, bezüglich der Pathogenese des Brustkrebses jedoch umstrittenes Kandidatengen dar. Es befindet sich auf 10q23-24 (Li et al., 1997; Steck et al., 1997) und ist für das Cowden-Syndrom (=multiples Hamartom-Syndrom) verantwortlich. Dies ist eine komplexe Erkrankung mit autosomal-dominantem Erbgang, welche die betroffenen Patienten für die Entstehung von Adenomen in Schilddrüse, Leber u. Knochen, sowie auch Tumoren der Mammae prädisponiert. Die Patienten weisen Keimbahnmutationen in PTEN/MMAC1/TEP auf (Liaw et al., 1997). Dieses stellt ein Tumorsuppressorgen dar, das nach Singh auch bei sporadischen Mammakarzinomen Allelverluste bis zu 50% aufzeigte (Singh et al., 1998; Steck et al., 1997; Li et al., 1997; Rasheed et al., 1997). Es kodiert für eine duale Phosphatase, die sowohl Phosphotyrosin- als auch Phosphoserin/ Phosphothreonin-Reste dephosphoryliert. Phosphatidylinositol(3,4)-diphosphat und Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat stellen die bisher bekannten Substrate des PTEN dar. PTEN ist also ein Antagonist der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Vazquez and Sellers, 2000), die als Lipid- und Proteinkinase einige Signalmoleküle aktiviert oder inaktiviert, welche für Zellwachstum, Zellalterung, Zellüberleben und Zellimmortalisierung bedeutend sind. Diese Teilnahme an Signaltransduktionswegen kann das onkogene Potential der PI3K erklären. Über den gleichen

PI3K-Schlüssel wirken auch die viralen und zellulären Onkogene *src*, *ras*, *rac*, *alb* und das SV40-T-Antigen (Liu et al., 1998; Meili et al., 1998). Versuche zeigten, dass ektopisch exprimiertes PTEN die aktivierende Phosphorylierung der PKB/ AKT-Kinase (Teil des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges) in Mammakarzinom- Zellen verhindert (Ghosh et al., 1999). Im Widerspruch dazu stehen molekulargenetische Untersuchungen von Freihoff et al., in denen keine relevanten Mutationen, Allelverluste oder Veränderungen von Expressionen festgestellt werden konnten (Freihoff et al., 2000). Kerangueven stimmte mit diesen Ergebnissen überein (Kerangueven et al., 1997). Sie schlossen daher eine Beteiligung an der Tumorgenese des sporadischen Mammakarzinom aus.

In den oben beschriebenen experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit konnten keine signifikant erhöhten Allelverlustraten auf 10q24.1-q24.3 (in unmittelbarer Nähe von PTEN) gefunden werden. Die gewonnenen Ergebnisse entsprechen und bestätigen daher die zuletzt genannten Voruntersuchungen dieser Region. Es wurde hier lediglich ein LOH mit einem Mikrosatellitenmarker (Marker: 589/590 = MS-bn43-6) in einem primären Mammakarzinom gefunden. Die übrigen Tumoren zeigten eine unveränderte Kopienanzahl; d.h. es konnte kein Hinweis auf einen homozygoten Allelverlust ermittelt werden. Die Existenz von potentiellen Tumorsuppressorgenen, die bei der Genese und Progression des sporadischen Brustkrebses einen entscheidenden Beitrag leisten, ist demnach nicht anzunehmen. Der gefundene Verlust eines Allels in diesem Genabschnitt hat somit voraussichtlich keine kausale Bedeutung und ist als ein zufälliger, für die Tumorgenese der sporadischen Krebserkrankung der Brust nicht relevanter Genverlust zu werten. Aufgrund dieser Ergebnisse kann auf eine Differenzierung in Allelverluste, die für die Tumorgenese verantwortlich sind, von LOHs, die ein Korrelat in der Tumorprogression oder der histologischen Ausprägung innehaben, verzichtet werden. Des weiteren ist es aufgrund des singulären LOHs nicht möglich, eine Region mit einer erhöhten Frequenz an Allelverlusten einzugrenzen oder eine Kombination von Verlusten mit potentieller Korrelation zu klinisch-histologisch und -prognostischen Kriterien aufzudecken.

Parallel zur vorliegenden Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe Untersuchungen desselben Gens (MGEA5) bezüglich der Genese des Mammakarzinoms mit SSCP (single- strand conformation polymorphism) (Orita et al., 1989; Hayashi et al., 1992), einem weiteren Screeningverfahren, begonnen. In dieser Methode des Einzelstrang-Konformationspolymorphismus, mit dem kurze DNA-Fragmente nach PCR-Amplifikation untersucht werden, weist ein verändertes Laufverhalten von mutationstragender einzelsträngiger DNA im Vergleich zur Wildtyp-DNA in nicht denaturierten Gelen auf Genveränderungen hin. Diese Forschungen sind aktuell bei Einreichen

dieser Aufzeichnungen noch nicht abgeschlossen. Die bisher in dieser Analyse erhobenen Resultate scheinen jedoch die gleiche Tendenz wie die in dieser Arbeit erhobenen Daten aufzuweisen. Auch hier konnten bisher keine Mutationen in MGEA5 bei sporadischen Mammakarzinomen gefunden werden.

Fazit:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widerlegen also die Annahme, dass Allelverluste von Tumorsuppressorgen auf dem MGEA5-Gen, das in anderen Tumorentitäten zur Tumorgenese beigetragen hat, auch an der Entstehung des sporadischen Mammakarzinoms beteiligt sind. Die Existenz eines Tumorsuppressorgens konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen dieses Gens erbringen daher keine Möglichkeit zur verbesserten Diagnostik und individuellen Therapie des sporadischen Brustkrebses. Da das untersuchte Tumorkollektiv überwiegend aus Primärtumoren bestand, kann eine Beteiligung an der Tumorprogression bzw. der Metastasierung des Mammakarzinoms jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

6) Literaturverzeichnis

Andersen T.I., Gaustad A., Ottestad L., Farrants G.W., Nesland J.M., Tveit K.M., Borresen A.L. (1992) Genetic alterations of the tumour suppressor gene regions 3p, 11p, 13q, 17p and 17q in human breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 4 : 113-121

Bässler R. (1995) Histologische Kriterien und aktuelle Klassifikation des Mammakarzinoms. *Onkologe* 1: 180-189

Baselga J., Norton L., Albanell J., Kim Y.M., Mendelsohn J. (1998) Recombined humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumour activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 58: 2825-2823

Becker et al. (2000) *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*. Springer Verlag.

Bender B., Wiestler O.D., von Deimling A. (1994) A Device for Processing Large Acrylamid-Gels. *Bio Techniques* 16: 204-206

Bertrand P., Girard N., Duval C., d'Anjou J., Chauzy C., Menard J.F., Delpech B. (1997) Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases. *In J Cancer* 73: 327-331

Bertrand P., Girard N., Delpech B., Duval C., d'Anjou J., Dauce J.P. (1992) Hyaluronan (hyaluronic acid) and hyaluronectin in extracellular matrix of human breast carcinomas: comparison between invasive and non-invasive areas. *In J. Cancer* 52: 1-6

Blin N., Stafford D.W. (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* 3: 2303-2308

Boogerd W. (1996) Central nervous system metastase in breast cancer. *Radiother Oncol* 40: 5-22

Borg A., Zhang Q.X., Olsson H., Wenngren E. (1992) Chromosome 1 alterations in breast cancer: allelic losses on 1p and 1q is related to lymphogenic metastases and poor prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* 5 : 311-320

- Borg A., Zhang Q.X., Johansson O., Olsson H. (1994) High frequency of allelic imbalances at the BRCA1 region on chromosome 17q in both familial and sporadic ductal breast carcinomas. *J Nat Cancer Inst.* 86: 792-794
- Braun S., Pantel K., Mueller P., Janni W., Hepp F., Kantenich C.R., Gastroph S., Wischnik A., Dimpfl T., Kindermann G., Schlimok G. (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *Nengl J Med* 342: 525-533
- Bröer R., Eckart W.U. (1996) Die Behandlung des Brustkrebses; Aspekte der Therapieggeschichte von der Antike bis ins 20.Jahrhundert : Ein Jahrhundert endokrine Therapie des Mammakarzinoms. Berlin: Springer, , S.81-93
- Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C. (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 137-144
- Callahan R., Cropp C.S., Merlo G.R., Liscia D.S., Cappa A.P., Liderau R. (1992) Somatic mutations and human breast cancer. A status report. *Cancer*
- Cavane W.K., Dryja T.P., Phillips R.A., Benedict W.F., Godbout R., Gallie B.L., Murphree A.L., Strong L.C., White R.L. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanism in retinoblastoma. *Nature* 305: 779-784
- Cornelisse C.J. (1992) Loss of heterozygosity, chromosom 7q, and breast cancer (letter comment). *Lancet* 339 : 1423-1424
- Cornelis R.S., Devilee P., van Vliet M., Kuipers-Dijkshoorn N., Kersenmaeker A., Bardoel A., Khan P.M., Cornelisse C.J. (1993) Allele loss patterns on chromosome 17q in 109 breast carcinomas indicate at least two distinct target regions. *Oncogene* 8 : 781-785
- Delpech B., Girard N., Bertrand P., Courel M.N., Chauzy C., Delpech A.: Hyaluronan (1997) fundamental principles and application in cancer. *J Intern Med* 242: 41-48
- Dib C., Faure S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Moristette J., Weissenbach J. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 152: 380

Friend S.H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R.A., Rapaport J.M., Albert D.M., Dryja T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 51 : 105-109

Ghosh A.K., Grigorieva I., Steele R., Hoover R.G., Ray R.B. (1999) PTEN transcriptionally modulates c-myc gene expression in human breast carcinoma cells and is involved in cell growth regulation. *Gene* 235: 85-91

Goyette M.C., Cho K., Fasching C.L., Levy D.B., Kinzler K.W., Paraskeva C., Vogelstein B., Stanbridge E.J. (1992) Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenesis is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Bio* 12: 1387-1395

Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M. et al. (1994) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66: 589

Gusterson B.A., Gelber R.D., Goldhirsch A., Price K.N., S ave-S oderborgh J., Anbazhagan R., Styles J., Rudenstam C.M., Golouh R., Reed R., Marinez-Tello F., Tiltman A., Torhorst J., Grigolato P., Bettelheim R., Neville A.M., B urki K., Castiglione M., Collins J., Lindtner J., Senn H.J. (1992) Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 10: 1049-1956

Hamada H., Petrino M.G., Kakunaga T., Seidman M., Stollar B.D. (1984) Characterization of genomic poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequences: structure, organization and conformation. *Mol Cell Biol.* 4 :2610-2621

Hamada H., Kakanuga T. (1982) Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 298 : 396-398

Hayashi K. (1992) PCR-SSCP: rapid and easy detection of DNA-sequence changes. *Hum Cell* 5 : 180-184

Hayashi K. (1992) PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl.* 9: 73-79

Heckel D., Compresse N., Brass N., Blin N., Zang K.D., Meese E. (1998) Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidas in meningioma *Hum Mol Genet* 7: 1859-1872

Hoskins K.F., Stopfer J.E., Calzone D.A., Merajver S.D., Rebbeck T.R., Garber J.E., Weber B.L. (1995) Assessment and counselling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. *Jama* 273: 577-585

Jänicke F., Schmitt M., Pache L., Ulm K., Harbeck N., Höfler H., Graeff H. (1993) Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast cancer Res Treat* 22: 197-206

Kaiser R., Pfleiderer A. (1989) *Lehrbuch der Gynäkologie*. Stuttgart-New-York: Thieme Verlag

Kapferer R. (1939) *Die Werke des Hippokrates*. Teil 24, Stuttgart S.39

Kerangueven F., Eisinger F., Noguchi T., Allione F., Wargniez V., Eng C., Padberg G., Theillet C., Jacquemier J., Longy M., Sobol H., Birnbaum D. (1997) Loss of heterozygosity in human breast carcinomas in the ataxia teleangiectasia, Cowden disease and BRCA1 gene regions. *Oncogene* 14: 339-347

Kerangueven F., Essioux L., Dibi A., Noguchi T., Allione F., Geneix J., Longy M., Liderau R., Eisinger F., Pebusque M.J. et al. (1995) Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma: indication for a putative third susceptibility gene on a short arm of chromosome 8. *Oncogene* 10: 1023-1026

Khoo U.S., Ozcelik H., Cheung A.N., Chow L.W., Ngan H.Y., Done S.J., Liang A.C., Chan V.W., Au G.K., Ng W.F., Poon C.S., Leung Y.F., Loong F., Ip P., Chan G.S., Andrulis I.L., Lu J., Ho F.C. (1999) Somatic mutations in the BRCA1 gene in Chinese sporadic breast and ovarian cancer. *Oncogene* 18: 4643-44646

Klijn J.G.M., Look M.P., Portengen H., Alexievafigusch J., Vanputten W.L.J., Foeckens J.A. (1994) The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer – results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* 29: 73-83

Knudson A.G.J. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 68: 820-823

Knyazev P.G., Imyanitow E.N., Chernitsa O.I., Nikiforova I.F. (1993) Loss of heterozygosity at chromosome 7p is associated with HER-2 amplification and lack of nodal involvement in breast cancer. Int J Cancer 53: 11-16

Li J., Yen J.C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang S.I., Puc J., Miliareis C., Rodgers L., McCombie R., Bigner S.H., Giovanella B.C., Ittmann M., Tycko B., Hibshoosh H., Wigler M.H., Parsons R. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer (see comments). Science 275 : 1943-1947

Liaw D., Marsh D.J., Li J., Dahia P.L., Wang S.I., Zheng Z., Bose S., Call K.M., Tsou H.C., Peacocke M., Eng C., Parsons R. (1997) Germline mutation of the PTEN gene on Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet 16:64-67

Liu A.X., Testa J.R., Hamilton T.C., Jove R., Nicosia S.V., Cheng J.Q. (1998) AKT2, a member of protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithel cancer cells. Cancer Res. 58 : 2973-2977

Liu D., Pearlman E., Diaconu E., Guo K., Mori H., Haqqi T., Markowitz S., Wilson J., Sy M.S. (1996) Expression of hyaluronidase by tumor cells includes angiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 93: 7832-7837

Liu D., Pearlman E., Diaconu E., Guo K., Mori H., Sy M.S.: Expression of hyaluronidase by metastatic human melanoma cells.

Lindblom A., Rotstein S., Skoog L., Nordenskjold M., Larsson C. (1993) Deletions on chromosome 16 in primary familial breast carcinomas are associated with development of distant metastases. Cancer Res 53: 3707-3711

Lindblom A., Skoog L., Andersen T.I., Rotstein S., Nordenskjold M., Larsson C. (1993) Four separate regions on chromosome 17 show loss of heterozygosity in familial breast carcinomas. Human Genet 91: 6-12

- Malkin D., Li F.P., Strong L.C., Fraumeni J.F.J., Nelson C.E., Kim D.H., Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z., Tainsky M.A. et al. (1990) Germ line p53 mutations in familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 250: 1233- 1238
- Mathieu M.C., Koscielny S., Le Bihan M.L., Spielmann M., Arriagada R. (1995) P53 overexpression and chemosensitivity in breast cancer. *Lancet* 345: 1182
- Meili R., Cron P., Hemmings B.A., Ballmer-Hofer K. (1998) Protein kinase B/AKT is activated by polyomavirus middle-T antigen via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Oncogene* 16: 903-907
- Miki Y., Katagiri T., Kasumi F., Yoshimoto T., Nakamura Y. (1996) Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nat Genet* 13: 24-247
- Miki Y., Swenson J., Shattuck E.D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W. et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66-71
- Negrini M., Castagnoli A., Sabbioni S., Recananti E., Giovanni G., Possati L., Stanbridge E.J., Nenci I., Barbanti B.G. (1992) Suppression of tumorigenesis by the breast cancer cell line MCF-7 following transfer of a normal human chromosome 11. *Oncogene* 7 : 2013-2018
- Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Hostetter R., Cleary K., Bigner S.H., Davidson N., Baylin S., Devilee P. et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770
- Pandis N., Jin Y., Gorunova S., Tetersson C., Bardi G., Idvall I. et al. (1995) Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas identification of 8 karyotypic subgroups. *Genes, Chromosomes and Cancer* 12: 173-185
- Pschyrembel (1999) ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG

- Rasheed B.K., Stenzel T.T., Mc Lendon R.E., Parsons R., Friedman A.H., Friedman H.S., Bigner D.D., Bigner S.H. (1997) PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res* 57 : 3657-3659
- Remmele W., Stegner H.E. (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Scores (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis (ERICA) in Mammakarzinomgewebe. *Pathologie* 8: 138-140
- Richard F., Pacyna-Gengelbach M., Schluns K., Fleige B., Winzer K.J., Suzymas J., Dietel M., Petersen I., Schwendel A. (2000) Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer. *Int J Cancer* 89:305-310
- Rosen P.P., Obermann H. (1992) Tumours of mamary gland. *Atlas of tumor pathology*. 3rd ser. fasc.7. AFIP, Bethesda
- Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-162
- Sambrook K., Fritsch E.F., Maniatis T. (1986) eds. *Molecular cloning; a laboratory manual*, Cold Spring Harbour, New York
- Schmidt-Matthiesen H., Bastert G., Wallwiener D. (2000) *Gynäkologische Onkologie*. Stuttgart – New York; Schattauer,: 105
- Schmutzler R.K., Fimmers R., Bierhoff E., Lohmar B., Homann A., Apeiser P., Kubista E., Jaeger K., Krebs D., Zeilinger R., Wiestler O.D., von Deimling A. (1997) Association of allelic losses on human chromosomal arms 11q and 16q in sporadic breast cancer. *In J Cancer* 69: 307-311
- Silvestrini R., Daidone M.G., Mastore M., Di Fronzo G., Coradini D., Boracchi P., Sqicciarini P., Salvadori B., Veronesi U. (1993) Cell kinetics as a predictive factor in node-poitive breast cancer treated with adjuvant hormone therapy. *J Clin Oncol* 11: 1150-1155

- Singh R.K., Bucana C.D., Gutman M., Fan D., Wilson M.R., Fidler I.J. (1994) Organ site-dependent expression of basic fibroblast growth factor in human renal cell carcinoma cells. *Am Pathol* 145: 365-374
- Slamon D.J., Clark G.M., Wong, S.G., Levin W.J., Ulrich A. and McGuire W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 : 177-182
- Soussi T., Legros Y., Lubin R., Ory K., Schlichtholz B. (1994) Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. In *J Cancer* 1: 57
- Stanbridge E.J. (1990) Human tumour suppressor genes. *Annu Rev Genet* 24 : 615
- Stanbridge E.J., Der C.J., Doersen C.J., Nishimi R.Y., Peehl D.M., Weissman B.E., Wilkinson J.E. (1982) Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity. *Science* 215 : 252-259
- Steck P.A., Pershouse M.A., Jasser S.A., Yung W.K., Lin H., Ligon A.H., Langford L.A., Maumgrd M.L., Hattier T., Davis T., Frye C., Hu R., Swedlund B., Teng D.H., Tavtigian S.V. (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene. MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 15: 356-362
- Tavtigian S.V., Simard J., Rommens J., Couch F., Shattuck E.D., Neuhausen S., Merajver S., Thorlacius S., Offit K., Stoppa L.D., Belanger C., Bell R., Berry S., Bogden R., Chen Q., Davis T., Dumont M., Frye C., Hattier T., Jammulapati S., Janecki T., Jiang P., Kehrer R., Leblanc J.F., Goldgar D.E. et al. (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds (see comments). *Nat Genet* 12 : 133-137
- Thorlacius S., Jonasdottir O., Eyfjord J.E. (1991) Loss of heterozygosity at selective sites on chromosomes 13 and 17 in human breast carcinoma. *Anticancer Res* 11: 1501-1507
- TNM-Klassifikation maligner Tumoren (1997) Berlin-Heidelberg-New York_ Springer
- Tumorregister Saarland (2000) Morbidität und Mortalität an bösartigen Neubildungen im Saarland -Jahresbericht-, Statistisches Landesamt Saarland, Saarbrücken

- Vazquez F., Sellers W.R. (2000) The PTEN tumor suppressor protein : an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochem* 1470: 21-35
- Vogelstein B., Fearon E.R., Kern S.E., Hamilton S.R., Peisinger A.C., Nakamura Y., White R. (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244: 207
- Von Deimling A., Eibl R.H., Ohgaki H., Louis D.N., von Ammon K., Petersen I., Kleihues P., Chung R.Y., Wiestler O.D., Seizinger B.R. (1992) p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res.* 52: 2987-2990
- Weber J.L. (1990) Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr Opin Biotechnol.* 1: 166-171
- Weber J.L., May P.E. (1989) Abundant class of human DNS polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-44396
- WHO (World Health Organization) (1981) International histological classification of tumours No2: Histological typing of breast tumours, 2nd ed, Geneva
- Wronski M., Arbit C., Mc Cormick B. (1997) Surgical treatment of 70 patients with brain metastases from breast carcinoma. *Cancer* 80: 1746-1754
- Zhu X., Dunn J.M., Goddard A.D., Squire J.A., Becker A., Phillips R.A., Gallie B.L. (1992) Mechanism of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet* 59: 248-252

7) Danksagung

Danken möchte ich an erster Stelle ganz besonders herzlich Herrn Prof. Dr. med. Hans Schwering, außerplanmäßiger Professor für Chirurgie an der Hohen Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster und Chefarzt der Chirurgischen Abteilung des Akademischen Lehrkrankenhauses Marienhospital Euskirchen, für die Betreuung meiner Dissertationsarbeit. Besonders hervorheben möchte ich dabei seine spontane und kontinuierliche Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung formaler Aufgaben und sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit. Dies hat mich enorm motiviert, dieses Werk zügig fertigzustellen. Seine Ratschläge und seine Unterstützung haben maßgeblich zum Abschluss der Arbeit beigetragen.

Dank bekunden möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. med. W. Kuhn, Direktor der Abteilung für Frauenheilkunde und Gynäkologische Onkologie der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Bonn, für seinen Beitrag zu der Genehmigung und Vollendung der Arbeit.

Weiter danke ich mit großer Anerkennung:

Frau Roswitha Klasen, für die Weitergabe von Wissens- und Erfahrungswerten, für viele Ratschläge und für ihre sympathische Anteilnahme an meinen Unternehmungen.

Cand. med. Jens Roedel und cand. med. Marc Wagenbach, für die großartige Zusammenarbeit, die einzigartige Teamfähigkeit und die gegenseitige freundschaftliche Unterstützung in Höhen und Tiefen der Laborzeit.

Frau cand. med. Vicky Bodemüller, für den freundschaftlichen Austausch, die Unterstützung und Motivation während der Laborzeit.

Frau PD Dr. med. Rita Schmutzler, für die Unterstützung des Projektes mit technischer Ausrüstung und zur Verfügungstellung sämtlicher Materialien und der Tumorbank der Universitätsfrauenklinik Bonn, sowie der Schaffung der Rahmenbedingungen innerhalb der Abteilung für Frauenheilkunde und Gynäkologische Onkologie der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Bonn.

Insbesondere danke ich Herrn cand. med. Knut Beitzel, für seine kritischen und konstruktiven Korrekturvorschläge und seine besondere Art, mich während des Schreibens dieser Arbeit zu unterstützen.

Desweiteren gebührt Frau Apothekerin/ Lebensmittelchemikerin Elisabeth und Herrn Dipl. Ing. Wolfgang Timpert, meinen lieben Eltern, Dank für die unermüdliche und liebevolle Unterstützung, Aufmunterung und das Korrektur lesen.

Zuletzt möchte ich Herrn Dipl. chem. Apotheker Heinz Radermacher († 16.11.2002), meinem lieben Großvater danken, für sein immerwährendes Interesse, die vielen Ratschläge und Hinweise, menschlicher und fachlicher Natur, aus seinem unermüdlichen und wertvollen Erfahrungsschatz. Sein Stolz und seine Anerkennung haben mich tief berührt. Leider konnte er die Fertigstellung und das Ergebnis der Arbeit nicht mehr miterleben.

9) Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1) Abbildungsverzeichnis:

- Abb.1.1:** Lokalisationshäufigkeit (%) der Knoten in den verschiedenen Quadranten
(Copyright ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG)
- Abb.1.2:** Deutliche Einziehung der Brustwarze (Pfeil) infolge eines Karzinoms von
3,5 cm Durchmesser (Copyright ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG)
- Abb.1.3a und 1.3b:** Lymphogene Metastasierungswege (1.3a) und Einteilung gemäß der
Lokalisation der befallenen Lymphknoten in drei Level → Prognostik (1.3b)
(Copyright ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG)
- Abb.1.4:** Prädispositionsorte der hämatogenen Fernmetastasierung des Mammakarzinoms und
deren Häufigkeit in Prozent
- Abb.1.5a und 1.5b:** Histopathologie der beiden häufigsten Mammakarzinome: 1.5a):
Invasives duktales Mammakarzinom, 1.5b): Invasives lobuläres Karzinom
(Copyright ©1999 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG)
- Abb.1.6:** Invasives duktales Mammakarzinom, 17mm Durchmesser; radiär-streifige
Tumorausläufer in das angrenzende Mammagewebe (Prof. Stoemmer).
- Abb.1.7a und 1.7b:** Modelle der „Two-Hit-Hypothese“ von A.G. Knudson (1971)
1.7a: Somatische Mutationen, 1.7b: Konstitutionelle und somatische Mutation
- Abb.1.8:** Zum Verlust der Heterozygotie führende Mechanismen
- Abb.1.9:** Zell-Zell-Hybridisierung (Stanbridge, 1990)
- Abb.1.10:** Zunächst normale Zelle mit Heterozygotie für mütterliches und väterliches Allel mit
folgendem Allelverlust und daraus entstehendem Tumor und vereinfachter Darstellung
der PCR-Amplifikationsprodukte nach gelelektrophoretischer Auftrennung.
- Abb.1.11:** Beispiel für einen Loss of Heterozygosity=LOH nach Polyacrylamid-Gel-
elektrophoretischer Auftrennung mit zwei dicht aneinander liegenden Banden links und
einer verbleibenden Bande nach Allelverlust rechts.
- Abb.1.12:** Chromosom 10 mit Markierung von 10q24.1-q24.3, der Region des MGEA5
- Abb.3.1:** Gewebetypen des untersuchten Probenkollektives in Prozent.
- Abb.3.2:** Tumortypen des untersuchten Probenkollektives in Prozent.
- Abb.3.3:** Altersverteilung bei Ersterkrankung im untersuchten Tumorkollektiv
- Abb.3.4:** Histologischer Typ des untersuchten Probenkollektives in Prozent.
- Abb.3.5:** Dignität des untersuchten Probenkollektives in Prozent
- Abb.3.6:** Grading des untersuchten Probenkollektives in Prozent

Abb.3.7: ER-Expression der Tumorzellen

Abb.3.8: PR-Expression der Tumorzellen

Abb.3.9: PCR – Ansätze in Mikrotubes im PCR – Thermocycler (Biometra®)

Abb.3.10: PCR – Thermocycler, Tri – Thermoblock, (Biometra®)

Abb.3.11: Gelkammer (Agarosegele) (Pharmacia CKB GNA 100, Hoefer™, Pharmacia Biotec)

Abb.3.12: PAGE-Kammern, Biometra®

Abb.4.1: Häufigkeit von LOH in Prozent, markerspezifisch

Abb.4.2: Ein Allelverlust auf 10q in einem Primärtumor (1102) im Vergleich zum Blut (1103)

Abb.4.2: Häufigkeit von LOH in Prozent; aller Marker des Genabschnittes.

9.2) Tabellenverzeichnis:

Tab.1.1: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms gemäß WHO mit Hilfe der TNM-Klassifikation

Tab.3.1: Klinische und histopathologische Merkmale der untersuchten Tumoren

Tab.3.2: Maligne und benigne Mammatumoren, die in dieser Arbeit analysiert wurde.

Tab.3.3: Verwendete Geräte, Modell – und Herstellerangaben

Tab.3.4: Verwendete Chemikalien und Lösungen mit Herstellerangaben

Tab.3.5: PCR – Pipettierschema zum LOH – Nachweis

Tab.3.6: PCR-Programm zum LOH-Nachweis.

Tab.3.7: Mikrosatellitenmarker zum Nachweis von LOHs.

Tab.3.8: Primersequenzen, PCR – Bedingungen und Gelbedingungen der verwendeten Primer

Tab.3.9: Färbeschema mit einzelnen Schritten der Silberfärbung

Tab.4.1: Allelverluste auf Chromosom 10q in primären Mammakarzinomen und Rezidiven

Tab.4.2: Allelverluste auf Chromosom 10q in Metastasen und Tumoren mit fehlender Zugehörigkeit

10) Abkürzungsverzeichnis

<i>A</i>	Adenosin
A	Ampère
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
B	Blut
b	benigne
bp	Basenpaare
BRCA1	breast cancer associated gene 1
BRCA2	breast cancer associated gene 2
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
DINC	Dinukleotid
DNA	desoxyribonucleid acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
FA	Fibroadenom
g	Gramm
G	Guanin
h	heterozygot
hist.	histologisch
ID-Nr.	Identifizierungsnummer
kb	Kilobase
Konz.	Konzentration
l	lobulär
LOH	loss of heterozygosity
M	Molar
m	milli (10 ⁻³)
m	maligne
<i>m</i>	Metastase
mM	milli-Molar

me	medullär
μ	mikro- (10^{-6})
MIB1	Proliferations-assoziierte Antigene in formalinfixiertem Material
min.	Minute
MP	Mastopathie
mu	muzinös
n	Nano (10^{-9})
ni.	nicht informativ
NaOH	Natronlauge
neg.	negativ
n.s.	nicht signifikant
p	primär
p53	Tumorprotein 53
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PENC	Pentanukleotid
ph	phylloid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PK	Positivkontrolle
pos.	positiv
PR	Progesteronrezeptor
pTNM	Tumorgröße-/ Nodal-/ Metastasierungsstatus nach WHO-Klassifikation
r	Rezidiv
RNA	ribonucleid acid
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunde
SPF	S-Phase-Fraktion
SSCP	single-strand-confirmation-polymorphism
t	tubulär
T	Thymin
Tab.	Tabelle

Taq	DNA-Polymerase <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borsäure EDTA Puffer
TEMED	N-N-N-N-Tetraethylmethyldiamin
TETNC	Tetranukleotid
TLI	Thymidin-Labeling-Index Trinukleotid
TRINC	Trinukleotid
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Unit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
WHO	World Health Organisation

11) Anhang

Abbildungen zu 3.1.1):

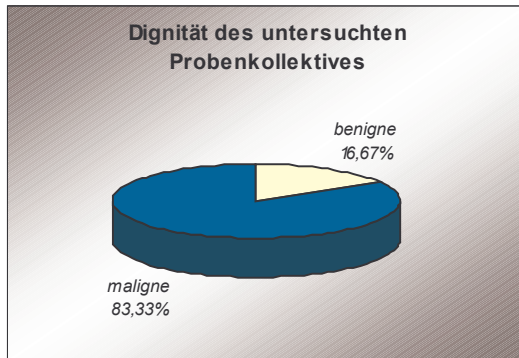


Abb.3.5: Dignität des untersuchten Probenkollektives in Prozent

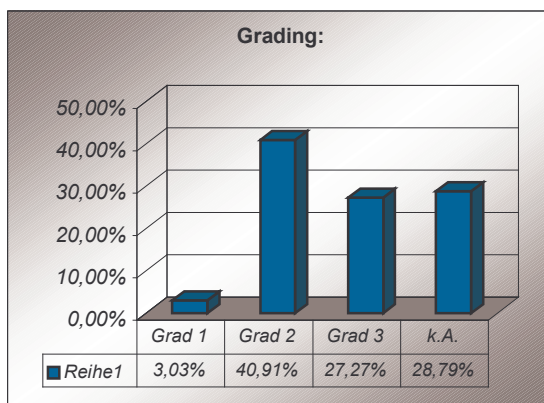


Abb3.6: Grading des untersuchten Probenkollektives in Prozent

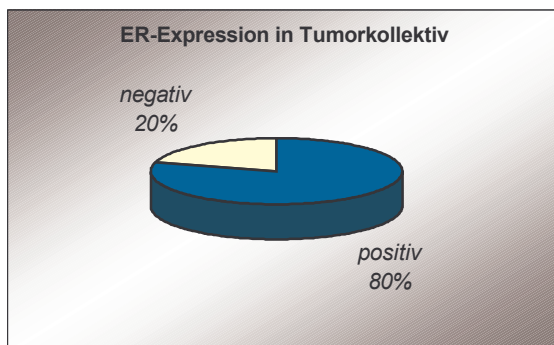


Abb.3.7: ER-Expression der Tumorzellen
ER=Östrogen-Rezeptor

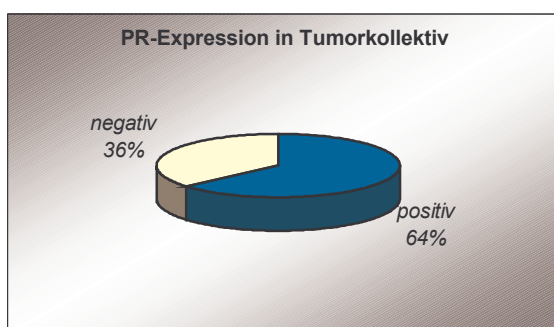


Abb.3.8: PR-Expression der Tumorzellen
PR=Progesteron-Rezeptor