

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Mag.rer.nat. Michael Stojanov
aus: Wien, Österreich

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2007

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie Genexpressionsänderungen in Brustkrebsgeweben gemessen, die mit den vier wichtigsten klinischen Parametern auf dem Gebiet der Brustkrebs-Behandlung einhergehen: Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus, dem Histologischen Grading, dem TNM-Status und der Expression des ErbB2-Rezeptors.

Zwischen 78 hormonrezeptorpositiven und 43 hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen wurden Genexpressionsunterschiede bestimmt. Dabei wurde das Vorliegen einer systematischen Messabweichung entdeckt, die durch das bevorzugte Auftreten einer lymphozytären Infiltration in hormonrezeptornegativen Brustkrebsgeweben hervorgerufen wurde. Mithilfe einer Varianzanalyse wurde diese systematische Messabweichung korrigiert und festgestellt, dass die Genexpressionsunterschiede zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen wesentlich geringer waren als in den bisher publizierten Studien beschrieben wurde. GO-Analysen konnten zeigen, dass von 44 differentiell exprimierten Genen bezüglich des Hormonrezeptorstatus überdurchschnittlich viele Funktionen beim Zellwachstum ausübten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei positivem Hormonrezeptorstatus das antiproliferative Gen *BTG3*, der putative Tumor-Suppressor *EXT1* und das wachstumsinhibierende Gen *FABP7* inhibiert werden, wodurch die Proliferation östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome gefördert wird.

In 118 Brustkrebsgeweben wurden Genexpressionsänderungen aufgrund des Histologischen Gradings gemessen. Eine Teststatistik mit linearer Regression wurde eingesetzt, um den progressiven und graduellen Charakter des Histologischen Gradings zu erfassen und 113 Gene zu identifizieren, deren Expression mit der Differenzierung des Brustkrebsgewebes korrelierte. KEGG-Pathway- und GO-Analysen zeigten, dass überdurchschnittlich viele dieser Gene Funktionen bei der mitotischen Zellteilung ausübten. Mithilfe einer SAM Survival Analyse wurde gezeigt, dass die Expression dieser Gene mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Brustkrebs-Patienten korrelierte. Damit wurde die Möglichkeit aufgezeigt, mithilfe der Expressionswerte von Genen, welche die Differenzierung des Mammakarzinoms charakterisieren, dieselbe prognostische Information zu erhalten wie bei Durchführung des Histologischen Gradings durch einen Pathologen.

In 109 Mammakarzinomen wurden keine Genexpressionsänderungen aufgrund des Tumor Stagings gefunden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Tumor Staging keine zugrundeliegenden molekularen Veränderungen während der Tumorprogression erfasst, sondern lediglich ein Maß dafür darstellt, wie fortgeschritten die Krankheit ist bzw. zu welchem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes ein Patient zur Therapie gelangt.

Transkriptionelle Änderungen wurden gemessen, die bei einem Vergleich von 23 *ErbB2*-überexprimierenden Mammakarzinomen mit 103 Brustkrebsgeweben auftraten, die eine normale *ErbB2*-Expression aufwiesen. Dabei wurden in Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression sieben Gene aufgrund einer genomischen Amplifikation der Region 17q12 überexprimiert: Neben den in der Literatur bekannten Genen *ErbB2*, *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, und *THRAP4* wurde auch *ORMDL3* stärker transkribiert, wenn *ErbB2* überexprimiert wurde. Eine neuartige Beobachtung war die verringerte Transkription des Gens *C20orf35* in Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression, das zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose führen könnte.

Summary

By using cDNA microarray technology changes in the gene expression of breast cancer tissues were measured, which occurred as a result of the four most important clinical parameters in the treatment of breast cancer: Changes in the gene expression due to the status of the estrogen receptor, the histological grading of the tissue, the TNM status and the expression of the ErbB2-receptor.

Between 78 hormone receptor-positive and 43 hormone receptor-negative breast cancer tissues differences in gene expression were measured. The preferred occurrence of a lymphocytic infiltration in hormone receptor-negative breast cancer tissues led to a bias, which could be corrected by applying an ANOVA Analysis. It appears that the real difference in gene expression between hormone receptor-positive and hormone receptor-negative breast cancer is much smaller than previous studies suggested. GO-Analyses showed, that genes involved in cell growth were overrepresented among the 44 differentially expressed genes. From the results it was hypothesized, that the antiproliferative gene *BTG3*, the putative tumor suppressor gene *EXT1*, and the growth-inhibiting gene *FABP7* are inhibited in hormone receptor-positive breast cancer tissues, leading to increased proliferation in these cancer tissues.

In 118 breast cancer tissues changes in gene expression were measured, which occurred as a result of different histologic grading of the tumour. A test statistic which used a linear regression was applied to fit the progressive and gradual character of histological grading and to identify 113 genes, whose expression was correlated with tumour differentiation. KEGG Pathway- and GO-Analysis showed an overrepresentation of genes involved in mitotic cell cycle. A SAM Survival analysis demonstrated, that the expression of these genes correlated with the survival of the patients. This result suggests the possibility, that gene expression profiling might obtain the same prognostic information like conventional histologic grading done by a pathologist.

In 109 breast cancer tissues no changes in gene expression could be observed as a result of different TNM status. This result indicates that the TNM status does not reflect the underlying molecular changes, which occur in the progression of breast cancer.

Transcriptional changes between 23 breast cancer tissues with *ErbB2*-overexpression and 103 tissues with normal expression of *ErbB2* were measured. In breast cancer tissues with *ErbB2*-overexpression seven genes were stronger transcribed due to a genomic amplification of the chromosomal locus 17q21: *ErbB2*, *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *THRAP4* and *ORMDL3* showed a stronger transcription, when *ErbB2* was overexpressed. A new observation was the reduced transcription of the gene *C20orf5* in breast cancer tissues with *ErbB2*-overexpression, possibly leading to an increased resistance against the induction of apoptosis.

Genexpressionsstudien in Brustkrebsgeweben
mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie

Gutachter:

PD Dr. Ralf Bischoff

Prof. Dr. Annemarie Poustka

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Histologische Klassifikation des Mammakarzinoms	1
1.1.1	Abgrenzung des Mammakarzinoms von gutartigen Brusttumoren	1
1.1.2	Das invasiv duktales Karzinom (IDC)	1
1.1.3	Das invasiv lobuläre Karzinom (ILC)	2
1.2	Epidemiologie des Mammakarzinoms	2
1.2.1	Verbreitung	2
1.2.2	Inzidenz und Mortalität	3
1.2.3	Trends	3
1.3	Aetiologie des Mammakarzinoms	3
1.3.1	Genetische Disposition für das Mammakarzinom	4
1.3.2	Umwelt- und Lebensstilfaktoren	4
1.3.3	Sexualhormone und Brustkrebs	4
1.4	Prognosefaktoren	5
1.4.1	TNM-Klassifikation und Tumor Staging	5
1.4.2	Histologisches Grading	7
1.4.3	Hormonrezeptorstatus	8
1.4.4	Histologische Klassifikation als Prognosefaktor	9
1.4.5	Amplifikation des Protoonkogens ErbB2	9
1.5	Genexpressionsanalysen im Hochdurchsatzverfahren	9
1.5.1	DNA-Mikroarrays	9
1.5.1.1	Oligonukleotid-Mikroarrays	12
1.5.1.2	cDNA-Mikroarrays	12
1.5.2	Genexpressionsanalysen mithilfe der DNA-Mikroarray-Technologie	13
1.5.3	Genexpressionsanalysen mithilfe der Mikroarray-Technologie beim Mammakarzinom	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Gewebe	17
2.1.2	Chemikalien	17
2.1.3	Puffer, Medien und Lösungen	18
2.1.4	Enzyme	18
2.1.5	Kits	18
2.1.6	„Assays on Demand“ für Taqman qRT-PCR-Analysen	18
2.1.7	Nukleinsäure und Nukleotide	19
2.1.8	Software	19
2.1.9	Geräte	19
2.1.10	Sonstige Materialien	20
2.2	Methoden	21

2.2.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1	Präzipitation von Nukleinsäuren	21
2.2.1.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	21
2.2.1.3	Synthese komplementärer DNA (cDNA)	21
2.2.2	Herstellung der Sonden	22
2.2.2.1	RNA-Isolierung aus Gewebe	22
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
2.2.2.3	Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren	23
2.2.2.4	Lineare RNA-Amplifikation	24
2.2.2.5	Fluoreszenz-Markierung von Nukleinsäuren	24
2.2.3	Herstellung Unigene 3.1.-gespotteter cDNA-Mikroarrays	25
2.2.3.1	Kultivierung der Unigene 3.1. Klone	25
2.2.3.2	Hochdurchsatz PCR-Amplifikation der Unigene 3.1. Klone	25
2.2.3.3	Spotting der PCR-Produkte auf Glasobjektträger	26
2.2.3.4	Nachbehandlung der gespotteten cDNA-Mikroarrays	27
2.2.4	Hybridisierung und Spot Quantifizierung	27
2.2.4.1	Hybridisierung auf cDNA-Mikroarrays	27
2.2.4.2	Spot Quantifizierung	28
2.2.5	Analyse der cDNA-Mikroarrays	29
2.2.5.1	Präprozessierung und Normalisierung	29
2.2.5.2	Selektieren differentiell exprimierter Gene mittels t-Test	30
2.2.5.3	Korrektur für Multiples Testen	30
2.2.5.4	Significance Analysis of Microarrays (SAM)	31
2.2.5.5	Varianzanalyse (ANOVA)	34
2.2.6	Der Exakte Test von Fischer (Fischers Exakt-Test)	35
2.2.7	KEGG-Pathway-Analyse	35
2.2.8	GO-Analyse	36
2.2.9	Überlebenszeitanalyse	36
2.2.9.1	Kaplan-Meier Methode	37
2.2.9.2	Der Log-Rang-Test	37
2.2.10	Quantitative Real-Time PCR mithilfe des Taqman-Systems	38
2.2.10.1	Erstellung von Eichgeraden für die qRT-PCR	39
2.2.10.2	Relative Quantifizierung der Genexpression ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)	39
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus	41
3.1.1	Bedeutung der Östrogene für die Brustkrebsforschung	41
3.1.2	Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus in der klinischen Praxis.	41
3.1.3	Definition des Hormonrezeptorstatus in dieser Arbeit	42
3.1.4	Überlebenszeitanalyse Hormonrezeptoren	43
3.1.5	SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus	44
3.1.6	Hormonrezeptorstatus und Infiltration	46
3.1.6.1	Systematische Messabweichung aufgrund lymphozytärer Infiltration	46
3.1.6.2	Das Ausmaß der lymphozytären Infiltration	47
3.1.7	Dreifaktorielle Varianzanalyse	49
3.1.7.1	Einführung in die dreifaktorielle Varianzanalyse	49
3.1.7.2	Ergebnis der dreifaktoriellen Varianzanalyse	49
3.1.7.3	Varianzanalyse und SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus	50
3.1.7.4	Differentiell exprimierte Gene bezüglich Hormonrezeptorstatus	51

3.1.8	GO-Analyse	52
3.1.8.1	Fragestellung	53
3.1.8.2	Einführung in die GO-Analyse	53
3.1.8.3	Ergebnis der GO-Analyse	53
3.1.8.4	GO-Analyse mit einer Genliste geringer Stringenz	55
3.2	Gene assoziiert mit dem Histologischen Grading	57
3.2.1	Histologisches Grading als Prognosefaktor beim Mammakarzinom	57
3.2.2	SAM-Analyse bezüglich des Histologischen Gradings	58
3.2.3	KEGG Pathway- und GO-Analyse	61
3.2.3.1	KEGG Pathway- und GO-Analyse bei einem Signifikanzniveau von 5% falsch Positiven	61
3.2.3.2	KEGG Pathway- und GO-Analyse mit einer Genliste, die 20% falsch Positive enthält	64
3.2.3.3	Zusammenfassung der KEGG-Pathway- und GO-Analysen	65
3.2.4	Histologisches Grading und Überleben	65
3.2.4.1	SAM Survival Analyse	66
3.2.4.2	Validierung mithilfe des Wilcoxon-Tests	67
3.3	Gene assoziiert mit dem Tumor Staging	68
3.3.1	SAM-Analyse Tumor Staging	69
3.4	Transkriptionelle Änderungen bei Überexpression von ErbB2	69
3.4.1	SAM-Analyse auf Grundlage des DAKO HercepTest	70
3.4.2	Expression des Protoonkogens ErbB2 in 126 Brustkrebspatienten	71
3.4.3	ErbB2-Expression und Überleben der Patienten	72
3.4.4	Differentielle Genexpression zwischen ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinomen und Brustkrebsgeweben mit normaler ErbB2-Expression.	73
3.4.4.1	Validierung der Mikroarraydaten mittels Taqman qRT-PCR	76
4	DISKUSSION	78
4.1	Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus	78
4.1.1	Östrogene stimulieren das Wachstum von Mammakarzinomen	78
4.1.2	Funktion des Östrogenrezeptors	78
4.1.3	Stimulation des Wachstums durch den Östrogenrezeptor	79
4.1.4	Östrogenrezeptorstatus und Klassifikation	80
4.1.5	Definition hormonrezeptorpositiver Patienten und Überlebenszeitanalyse	80
4.1.6	Differentiell exprimierte Gene und systematische Messabweichung	82
4.1.7	Korrektur der systematischen Messabweichung mithilfe der Varianzanalyse	83
4.1.8	Auswirkung der systematischen Messabweichung	83
4.1.9	Lymphozytische Infiltration in der Literatur	84
4.1.10	GO-Analyse der differentiell exprimierten Gene aufgrund des Hormonrezeptorstatus	85
4.1.11	Differentiell exprimierte Gene mit Relevanz für das Zellwachstum	85
4.1.11.1	BTG3/BTG2	86
4.1.11.2	BTG2	86
4.1.11.3	BTG3	87
4.1.11.4	EGFR	87
4.1.11.5	EXT1	87
4.1.11.6	FABP7	87

4.1.12	Zusammenfassung	88
4.2	Gene assoziiert mit dem Histologischen Grading	88
4.2.1	Einführung in das Histologische Grading	89
4.2.2	Histologisches Grading und Genexpressionsänderungen	89
4.2.3	Gene assoziiert mit dem Histologischen Grading	90
4.2.4	Grading-Gene und Prognose	90
4.2.5	Grading-Gene in der Literatur	91
4.2.6	Der Nutzen weiterer Genexpressionsstudien zur Analyse des Histologischen Gradings	92
4.2.7	Zusammenfassung	93
4.3	Gene assoziiert mit dem Tumor Staging	93
4.3.1	Einführung in das Tumor Staging	93
4.3.2	Bedeutung des Tumor Stagings	94
4.3.3	Tumor Staging und Genexpression	94
4.3.4	Zusammenfassung	95
4.4	Transkriptionelle Änderungen bei Überexpression von ErbB2	95
4.4.1	Funktion des Protoonkogens ErbB2	95
4.4.2	Auswirkungen einer Überexpression von ErbB2	96
4.4.3	Lokalisation des Erbb2-Gens und genomische Amplifikation	96
4.4.4	ErbB2-überexprimierende Patienten in dieser Arbeit	97
4.4.5	Transkriptionelle Änderungen bei ErbB2-Überexpression	98
4.4.6	Zusammenfassung	100
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
5.1	Einleitung	101
5.2	Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus	101
5.3	Gene assoziiert mit dem Histologischen Grading	101
5.4	Gene assoziiert mit dem TNM-Staging	102
5.5	Transkriptionelle Änderungen bei Überexpression von ErbB2	102
6	LITERATURVERZEICHNIS	103
7	TABELLARISCHER ANHANG	I
7.1	Patientendaten	i
7.2	Genlisten	viii
8	DANKSAGUNG	A

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
aRNA	Amplifizierte-RNA
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DDT	1,4-Dithiothreitol
DFS	Disease Free Survival; rezidivfreie Überlebenszeit
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dukt.-lob.	duktal-lobulär
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
ER	Östrogenrezeptor
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER β	Östrogenrezeptor beta
GO	Gene Ontology; Gen-Ontologie
GS	Gewebspäne
h	Stunde(n)
IDC	invasiv duktales Karzinom
IDC (NOS)	invasiv duktales Karzinom (not otherwise specified)
ILC	invasiv lobuläres Karzinom
k.A.	keine Angabe
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kyoto-Enzyklopädie der Gene und Genome
l	Liter
LOWESS	Locally Weighted Scatterplot Smoothing
M	molar
medulläres Ca	medulläres Karzinom
min	Minuten
Mol/l	Mol pro Liter
ml	Milliliter
mM	Milimolar

mm	Millimeter
MMLV	Mouse Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
muzinöses Ca	muzinöses Karzinom
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OS	Overall Survival; gesamte Überlebenszeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Sedimentationskoeffizient
s	Sekunden
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SSC	Standard Salz-Citrat Lösung
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit(s)
Vol	Volumen
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 EINLEITUNG

1.1 Histologische Klassifikation des Mammakarzinoms

1.1.1 Abgrenzung des Mammakarzinoms von gutartigen Brusttumoren

Unter Brustkrebs (Mammakarzinom) versteht man invasive und maligne Tumoren, die sich im Epithel des Drüsengewebes entwickeln. Der invasive Charakter äußert sich in der Tendenz der Mammakarzinomzellen, die Basalmembran der Ductuli und/oder Lobuli zu durchbrechen und ins umliegende Gewebe vorzudringen. Das Potential, Fernmetastasen zu bilden, ist ebenfalls stark ausgeprägt und führt zu einer hohen Mortalität der Brustkrebspatienten. Aufgrund dieser Eigenschaften sollte das Mammakarzinom nicht mit den meist gutartigen, nichtinvasiven Brusttumoren verwechselt werden. Bei diesen handelt es sich überwiegend um vom Bindegewebe ausgehende Tumore (Fibroadenome), um mit Flüssigkeit gefüllte Hohlkörper (Cysten) oder um Fettgeschwulste (Lipome) mit sehr guter Prognose für den Patienten.

1.1.2 Das invasiv duktales Karzinom (IDC)

Das invasiv duktales Karzinom (IDC) ist mit 65 bis 80% die häufigste Erscheinungsform des invasiven Mammakarzinoms [1]. Der Name basiert auf der Auffassung, dass dieser Tumor ausschließlich dem duktales Epithel der Brust entspringt. In der Praxis wird die Diagnose „invasiv duktales Karzinom“ gestellt, sofern das Krebsgewebe kein spezielles Wachstumsmuster aufweist und sich keinem anderen spezialisierten Brustkrebstyp zuordnen lässt. Invasiv duktales Karzinome zeigen keine einheitlichen makroskopischen Eigenschaften: Sie können irregulär, sternchenförmig oder knötchenförmig aussehen. Der Tumor-Rand ist moderat bis schlecht definiert ohne scharfe Abgrenzung. Beim Betasten fühlen sich invasiv duktales Karzinome üblicherweise fest, eventuell sogar hart an. Die Morphologie variiert ebenfalls beträchtlich: Strukturelle Regelmäßigkeiten, die man bei vielen anderen Brustkrebsformen beobachten kann, fehlen meistens. Die Krebszellen können als Stränge, Cluster oder trabekulär angeordnet sein, während in manchen Fällen ein überwiegend festes oder syncytiales Wachstumsmuster mit wenig umliegendem Stroma zu beobachten ist. Mammakarzinome mit der Diagnose „invasiv duktales Karzinom“ zeigen also hinsichtlich ihrer histopathologischen Eigenschaften eine beträchtliche Bandbreite.

1.1.3 Das invasiv lobuläre Karzinom (ILC)

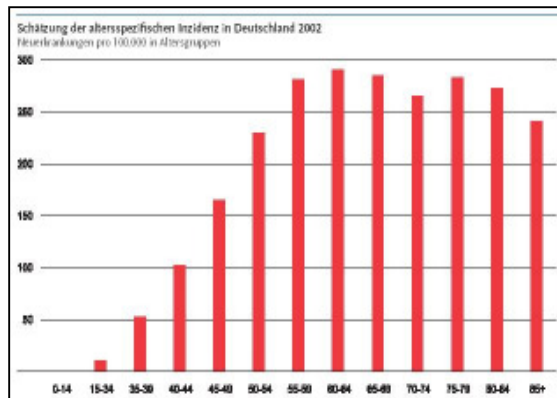
Die zweitgrößte Gruppe invasiver Mammakarzinome wird vom invasiv lobulären Karzinom (ILC) gestellt, das zwischen 5 und 15% aller Brustkrebs-Diagnosen auf sich vereinigt [2-6]. Es wird angenommen, dass sich das invasiv lobuläre Karzinom in den Drüsenlappen (Lobuli) der Brust bildet. Makroskopisch präsentiert sich das invasiv lobuläre Karzinom als schwer abgrenzbarer Tumor mit diffusem Wachstumsmuster. Histopathologisch lassen sich Krebszellen mit geringer Kohäsion erkennen, die sich entweder individuell im fibrösen Bindegewebe ausbreiten oder perlenkettenartige Zellstränge bilden, die vom Drüsengewebe ausgehen und in das umliegende Stroma hineinwachsen. Ungefähr 70-95% aller invasiv lobulären Karzinome exprimieren den Östrogenrezeptor. Diese Rate ist etwas höher als die 70-80% invasiv duktaler Karzinome mit positivem Östrogenrezeptorstatus [5,7]. Sehr charakteristisch für invasiv lobuläre Karzinome ist der vollständige Verlust der E-Cadherin-Expression in 80-100% aller Fälle [8-11]. Dieser Umstand könnte die geringe Kohärenz der Krebszellen erklären. Zahlreiche Studien haben die Prognose von ILC-Patienten mit jener von IDC-Patienten verglichen und sind zu widersprüchlichen Ergebnissen gelangt [2,3,5,12-17].

1.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms

1.2.1 Verbreitung

In Deutschland erkranken jährlich über 55000 Frauen an Brustkrebs, davon etwa 23200 im Alter von unter 60 Jahren. Damit ist Brustkrebs für 26,8% aller Krebs-Neuerkrankungsfälle bei Frauen und für 40% aller Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren verantwortlich. Das durchschnittliche Lebenszeitrisko von Frauen, an Brustkrebs zu erkranken, beträgt somit 9,2%. Im Laufe ihres Lebens erkrankt also jede 11. deutsche Frau an Brustkrebs [18]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei knapp über 62 Jahren.

Abbildung 1: Altersspezifische Inzidenz beim Mammakarzinom



Eine Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland aus dem Jahr 2002. Auf der y-Achse wird die Anzahl der Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner dargestellt. Auf der x-Achse wird die Bevölkerung in Altersgruppen eingeteilt. Die Inzidenzraten des Mammakarzinoms steigen zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr stark an, um nach der Menopause abzuflachen. Quelle: „Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends.“ Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut.

1.2.2 Inzidenz und Mortalität

Das Erkrankungsrisiko nimmt mit fortschreitendem Alter zu. Der altersabhängige Anstieg der Inzidenzraten ist bei Frauen zwischen 30 und 50 Jahren besonders stark ausgeprägt (Abb. 1).

1.2.3 Trends

In Deutschland ist die Brustkrebsinzidenz seit 1970 angestiegen, während die Mortalität sein Mitte 1990 leicht gesunken ist. Ungeklärt ist, welchen Anteil an diesem Trend der verbesserten Früherkennung zuzuschreiben ist. Dank einer frühzeitigen Diagnose gelingt es immer häufiger, Mammakarzinome in einem weniger fortgeschrittenen Stadium zu entdecken, die anschließend mit erheblich besseren Heilungsaussichten behandelt werden können.

1.3 Aetiologie des Mammakarzinoms

An der Entstehung des Mammakarzinoms können viele Faktoren beteiligt sein. Man schätzt, dass 5 – 10% Prozent aller Erkrankungen auf eine genetische Disposition zurückzuführen sind [19,20]. Die überwiegende Mehrzahl aller Brustkrebserkrankungen tritt jedoch sporadisch auf. In diesen Fällen konnte die Krebsforschung die Bedeutung von Umwelt- und Lebensstilfaktoren, sowie den Einfluss von weiblichen Sexualhormonen für die Aetiologie des Mammakarzinoms nachweisen [21-29].

1.3.1 Genetische Disposition für das Mammakarzinom

Einen Hinweis für die Existenz genetischer Dispositionen liefert die Beobachtung, dass das Risiko einer Brustkrebs-Erkrankung höher ist, wenn bei Verwandten ersten oder zweiten Grades Mammakarzinome aufgetreten sind [30,31]. Die zwei bedeutendsten Gene, die mit der Entstehung des Mammakarzinoms in Zusammenhang gebracht werden konnten, sind die Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2*. Mutationen dieser Gene erhöhen das Erkrankungsrisiko um das Sechsbis Achtfache [32,33] und führen zu einer besonders häufigen Manifestation in der Prämenopause [34]. Bei Trägern einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation wird angenommen, dass eine verringerte Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden die Anfälligkeit für maligne Erkrankungen der Brust und der Eierstöcke erhöht [35-41].

1.3.2 Umwelt- und Lebensstilfaktoren

Epidemiologische Untersuchungen führen zu der Vermutung, dass Lebensstil-Faktoren an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt sind. Die höchsten Inzidenzraten für Brustkrebs treten in Westeuropa, den USA und Australien auf [42]. Bei Zuwanderern aus Regionen mit geringem Brustkrebs-Risiko erhöhen sich die Inzidenzraten nach ein bis zwei Generationen auf das Niveau der Einheimischen [43-45]. Obwohl die Bedeutung von Umwelt- und Lebensstil-Faktoren für die Aetiologie des Mammakarzinoms als gesichert gilt, ist nicht klar, welche Faktoren konkret die Entstehung des Brustkrebs fördern. Vielfach wurde eine positive Korrelation zwischen Übergewicht und Brustkrebs-Risiko beobachtet [21-23]. Darüber hinaus wurde publiziert, dass starker Alkoholkonsum [24], übermäßiger Verzehr tierischer Fette [25] und Bewegungsmangel [26] das Risiko erhöhen, ein Mammakarzinom zu entwickeln. Auch Faktoren wie das Alter der Frau bei der Geburt der Kinder [27] sowie die Dauer des Stillens [28,29] wurden mit dem Brustkrebs-Risiko in Zusammenhang gebracht. Zusammenfassend muss man jedoch feststellen, dass die wissenschaftliche Literatur widersprüchlich ist und man derzeit nicht mit Sicherheit sagen kann, welche Umwelt- und Lebensstil-Faktoren konkret die Entstehung des Mammakarzinoms begünstigen.

1.3.3 Sexualhormone und Brustkrebs

Vor mehr als 100 Jahren wurde erstmals beobachtet, dass die Funktion der Ovarien das Wachstum des Mammakarzinoms fördert und die Überlebenschance des

Patienten steigt, wenn diese entfernt werden [46]. Seitdem zeigten zahlreiche epidemiologische Studien, dass die Exposition mit Östrogenen das Brustkrebs-Risiko erhöht [20,47-52]. Frauen mit früher Menarche und spätem Eintritt in die Menopause entwickelten besonders oft Mammakarzinome [47], ebenso Frauen, die im Rahmen einer Hormontherapie mehrere Jahre lang Östrogene, Östrogen-Gestagen-Kombinationen oder Tibolon einnahmen [20,48]. Zellkulturexperimente zeigten, dass normales Brustgewebe in Brustkrebsgewebe transformiert werden konnte, wenn Östrogene zugegeben wurden [53]. Das Wachstum bereits bestehender Mammakarzinome wurde durch Östrogene ebenfalls gefördert, sofern diese östrogenrezeptorpositiv waren [54-58]. Daher ist die endokrine Therapie bei der Behandlung von Mammakarzinomen, die den Östrogenrezeptor exprimieren, von großer Bedeutung.

1.4 Prognosefaktoren

Prognosefaktoren sollen dem behandelnden Arzt ermöglichen, das Rückfallsrisiko des Patienten nach Entfernung des Mammakarzinoms abzuschätzen, um eine angemessene adjuvante oder neoadjuvante Therapie planen zu können. Klinisch relevante und etablierte Prognosefaktoren sind das Tumor-Staging, das histologische Grading, der Hormonrezeptorstatus und die histologische Klassifikation des Mammakarzinoms. Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus dient allerdings nicht nur der Prognose, sondern liefert zusätzlich die wichtige Information, ob eine endokrine Therapie sinnvoll ist oder nicht. Seit Entwicklung des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin) ist zusätzlich die Bestimmung einer eventuell vorliegenden Amplifikation des Protoonkogens *ErbB2* üblich geworden. Wie beim Hormonrezeptorstatus zielt dieses Vorgehen nicht nur auf den Gewinn prognostischer Information, sondern dient als wichtige Entscheidungshilfe für den behandelnden Arzt: Patienten mit Amplifikation des *ErbB2*-Gens können mit Trastuzumab behandelt werden, während diese Therapie bei nicht vorliegender *ErbB2*-Amplifikation kontraindiziert ist.

1.4.1 TNM-Klassifikation und Tumor Staging

Das Tumor Staging berücksichtigt drei Faktoren, die anzeigen wie fortgeschritten eine Krebserkrankung ist: Die Größe des Primärtumors zum Diagnosezeitpunkt, die

Ausbreitung des Tumorgewebes in die Lymphknoten der Brust oder der Achselhöhlen und das Vorliegen von Fernmetastasen. Je fortgeschrittener die Krankheit ist, desto geringer ist die Überlebenschance des Patienten. Die drei Faktoren werden mithilfe der TNM-Klassifikation (Tabelle 1) normiert, welche von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) entwickelt wurde. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten ist dabei der wichtigste Prognosefaktor: Bei negativem Lymphknotenstatus lag das Fünf- bzw. Zehnjahresüberleben bei 94,8 bzw. 86,4%, während im selben Zeitraum nur 48,1% bzw. 27,3% der Patienten mit zehn oder mehr befallenen Lymphknoten überlebten [59]. Der Lymphknotenstatus ist mit der Tumorgöße positiv korreliert, da ein größerer Tumor mit höherer Wahrscheinlichkeit einen axillären Lymphknotenbefall verursacht als ein kleinerer Tumor [60].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Tumor nachweisbar
Tis	Intraduktales Karzinom oder lobuläres Karzinom in situ oder Morbus Paget ohne Tumor
T1	Tumor bis 2 cm (größter Durchmesser)
T1mic	Mikroinvasion kleiner als 0,1 cm
T1a	Tumor bis 0,5 cm
T1b	Tumor mit 0,5 bis 1 cm
T1c	Tumor mit 1,1 bis 2 cm
T2	Tumor mit 2,1 bis 5 cm
T3	Tumor größer als 5 cm
T4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Brusthaut
T4a	Tumor mit Ausdehnung auf die Brustwand
T4b	Tumor mit Ödem (inklusive Apfelsinenhaut), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen in der Haut der gleichen Brust
T4c	T4a + T4b
T4d	inflammatorisches Karzinom
N – Regionale Lymphknoten	
NX	regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionalen Lymphknoten befallen
N1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
N1a	nur Mikrometastasen, keine größer als 0,2 cm
N1b	Metastasen
N2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
N3	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten an der Mammaria interna
M – Fernmetastasen	
MX	Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (einschließlich supraklavikuläre Lymphknoten)

Um aus diesen drei Faktoren sinnvolle Patientengruppen bilden zu können, die sich hinsichtlich der Prognose unterscheiden, wird das sogenannte Tumor Staging [61,62] durchgeführt, welches von der UICC und dem AJCC (American Joint Committee on Cancer) normiert wird (Tabelle 2). Je höher das Tumor Staging ausgefallen ist, desto schlechter ist die Prognose. In einer Studie, die 240 000 Brustkrebspatienten erfasste, wurden folgende 10-Jahres-Überlebensraten beobachtet: Stage 0: 95 %, Stage I: 88%, Stage II: 66%, Stage III: 36% und Stage IV: 7% [63].

Tabelle 2: Tumor Staging des Mammakarzinoms

gemäß den Normen der UICC und des AJCC

Tumor Stage	TNM Status
Stage 0:	Tis,N0,M0
Stage I:	T1*,N0,M0
Stage IIA:	T0,N1,M0 oder T1*,N1,M0 oder T2,N0,M0
Stage IIB:	T2,N1,M0 oder T3,N0,M0
Stage IIIA:	T0,N2,M0 oder T1*N2,M0 oder T2,N2,M0 oder T3,N1,M0 oder T3,N2,M0
Stage IIIB:	T4,N0,M0 oder T4,N1,M0 oder T4,N2,M0
Stage IIIC:	beliebige Tumorgröße, N3, M0
Stage IV:	beliebige Tumorgröße, beliebiger Lymphknotenbefall, M1

T1*: T1 oder T1mic.

1.4.2 Histologisches Grading

Das Histologische Grading [64,65] wird von Pathologen durchgeführt und beurteilt das Aussehen eines malignen Gewebes unter dem Mikroskop. Dabei wird auf morphologische Abweichungen, Anomalien der Anordnung im Zellverband und erhöhte Zellteilungsrate geachtet. Karzinome, die in ihrem Erscheinungsbild gesundem Gewebe ähnlich sind, werden als gut differenziert bezeichnet. Krebsgewebe mit stark abweichender Morphologie, Kernpolymorphie, irregulärer Anordnug im Zellverband und erhöhter Teilungsaktivität nennt man schlecht oder gering differenziert. Um die Beurteilung des Krebsgewebes zu objektivieren, werden die relevanten Merkmale von diversen Grading-Systemen standardisiert. Beim Mammakarzinom wird üblicherweise das Grading nach dem Bloom-Richardson-System [64] durchgeführt, das Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate erfasst und zur Einteilung in eine von drei Grading-Gruppen führt (Tabelle 3). Bedeutung erhält dieses Vorgehen aufgrund der prognostischen Information, die das Histologische Grading liefert: Patienten mit gut differenziertem Brustkrebs haben eine bessere Prognose als jene mit schlecht differenziertem Mammakarzinom [3,65-67].

Tabelle 3: Histologisches Grading des Mammakarzinoms

Merkmale		Kriterien	Scorewerte
Tubulusausbildung:		> 75 %	1
		10-75 %	2
		< 10 %	3
Kernpolymorphie:		Gering	1
		Mittelgradig	2
		Stark	3
Mitoserate*:		0-5/ 10 HPF	1
		6-11/ 10 HPF	2
		≥ 12/ 10 HPF	3
Summenscore			3-9
Summenscore	Malignitätsgrad	Grading-Gruppe	Definition
3,4,5	gering	G1	gut differenziert
6,7	mäßig	G2	mäßig differenziert
8,9	hoch	G3	schlecht differenziert

*HPF = high power field

1.4.3 Hormonrezeptorstatus

Starke Expression der Hormonrezeptoren für Östrogen und/oder Progesteron indiziert Brustkrebspatienten für eine endokrine Therapie und korreliert außerdem mit einer höheren Überlebens-Wahrscheinlichkeit [68,69]. Dabei haben Patienten, die beide Hormonrezeptoren exprimieren, eine etwas bessere Prognose als jene, die östrogenrezeptorpositiv sind, aber keinen Progesteronrezeptor exprimieren [70]. Diese Beobachtung wird oft damit erklärt, dass ein positiver Progesteronrezeptorstatus auf einen funktionell aktiven Östrogenrezeptor hindeutet. Das Gen für den Progesteronrezeptor wird nämlich von einem aktiven Östrogenrezeptor zur Expression gebracht. Daher wäre es bei positivem Status beider Hormonrezeptoren besonders wahrscheinlich, dass die Krebszellen durch Östrogene zum Wachstum stimuliert werden. Eine endokrine Therapie, welche die wachstumsstimulierende und krebsfördernde Wirkung des Östrogens auf die Mammakarzinom-Zellen inhibiert, müsste unter diesen Umständen besonders effektiv sein. Zu diesem Zweck wird entweder die Aktivität des Östrogenrezeptors durch Gabe von z.B. Tamoxifen verringert oder man reduziert die Produktion der Östrogene mittels Aromatase-Inhibitoren, z.B. Letrozol oder Anastrozol [71-77]. Ebenfalls möglich ist die chirurgische Entfernung oder Inaktivierung der Eierstöcke, welche im weiblichen Körper den Hauptanteil der Östrogene produzieren.

1.4.4 Histologische Klassifikation als Prognosefaktor

Einige der selten vorkommenden Formen des Brustkrebs zeigen eine bessere Prognose als das invasiv duktales oder invasiv lobuläres Mammakarzinom. Dazu zählen das tubuläre Karzinom [3,78-83], das invasiv kribiforme Karzinom [3,84,85], das muzinöse Karzinom [86-90], das invasiv papilläre Karzinom [91-93], das sekretorische Karzinom [94,95], und das adenoid-cystische Karzinom [96-98]. Eine schlechtere Prognose als beim invasiv duktalem oder invasiv lobulärem Karzinom wurde für das glykogenreiche Karzinom [99-101] und für das entzündliche Karzinom [102-107] berichtet.

1.4.5 Amplifikation des Protoonkogens ErbB2

Amplifikation mit damit verbundener Überexpression des Protoonkogens *ErbB2* (auch bekannt unter den Bezeichnungen *HER-2*, *NEU*, *HER-2/neu* oder *c-erbB-2*) führt zu einer schlechteren Prognose der Brustkrebs-Patienten [68,108-113]. Die Amplifikation des *ErbB2*-Gens wird entweder durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) oder immunhistochemisch mithilfe des sogenannten HercepTests bestimmt. Die Behandlung mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin), der die extrazelluläre Domäne des ErbB2-Proteins bindet, verbessert die Prognose von Patienten, die eine Amplifikation dieses Protoonkogens aufweisen [114-118].

1.5 Genexpressionsanalysen im Hochdurchsatzverfahren

Mit den Erfolgen bei der Sequenzierung prokaryotischer und eukaryotischer Genome [119-127] ergab sich die Möglichkeit, die Expression bzw. Expressionsunterschiede tausender Gene gleichzeitig messen zu können [128]. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche Hochdurchsatzverfahren entwickelt. Beispiele dafür sind das Differential Display [129], SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) [130], SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) [131] und DNA-Mikroarrays [132-134], welche die weiteste Verbreitung erlangt haben.

1.5.1 DNA-Mikroarrays

DNA-Mikroarrays können als eine Weiterentwicklung des Southern-Blottings [135] aufgefasst werden: Immobilisierte einzelsträngige DNA bindet bei Vorliegen von

Basenkomplementarität gelöste Nukleinsäuren. Per Definition werden dabei die immobilisierten Nukleinsäuren Proben genannt, während die gelösten Nukleinsäuren als Sonden bezeichnet werden.

Anders als beim Southern Blotting werden die Proben bei DNA-Mikroarrays auf ein festes Trägermaterial aufgetragen. Dieses ermöglicht eine deutlich höhere Packungsdichte mit DNA-Proben und erleichtert die praktische Durchführung des Hybridisierens und Waschens. In den meisten Fällen wird Glas [136] als Trägermaterial benutzt, weil dieses besonders günstige Eigenschaften besitzt. Zum Beispiel deformiert Glas weder bei Kontakt mit Flüssigkeit noch während des Trocknens. Dadurch wird sowohl die Handhabung der cDNA-Mikroarrays als auch die abschließende Auswertung über softwaregestützte Bildauswertung erheblich vereinfacht. Dank dieser Fortschritte konnte der Durchmesser für die DNA-Proben gesenkt werden und liegt typischerweise zwischen 20 und 200 μm , sodass mehrere Tausend DNA-Spots auf der Fläche eines Objektträgers Platz finden. Dabei können die Proben durch mechanisches Spotten [132], mittels Tintenstrahl-*in situ*-Synthese [137] oder durch eine lichtgesteuerte Synthese auf das Trägermaterial gebracht werden. Bei der lichtgesteuerten Synthese werden entweder photolithographische Methoden [134] oder Mikrospiegel [138] verwendet. Als Proben können synthetische Oligonukleotide oder cDNA-Klone (bzw. PCR-Produkte der cDNA-Klone) eingesetzt werden: Erstere werden für Oligonukleotid-Mikroarrays benutzt, Letztere verwendet man für cDNA-Mikroarrays.

Die Markierung von Sonden erfolgt in den meisten Fällen mit fluoreszierenden Farbstoffen. Für Zweifarbenexperimente mit cDNA-Mikroarrays werden am häufigsten Cyanin 3 und Cyanin 5 eingesetzt, während bei den Oligonukleotid-Mikroarrays von Affymetrix eine Fluoreszenz-Antikörperfärbung mit Phycoerythrin erfolgt. DNA-Mikroarrays werden üblicherweise zur Messung der Genexpression eingesetzt. Dazu wird zunächst die Total-RNA des zu untersuchenden Gewebes bzw. der zu untersuchenden Zellkultur isoliert. Anschließend wird die mRNA-Population der Total-RNA mithilfe einer Reversen Transkription unter Verwendung eines oligo(dT)-Primers in cDNA umgeschrieben und dabei gleichzeitig markiert. Bei Bedarf können Amplifikationsschritte eingefügt werden, um die Menge verfügbarer Sonden zu erhöhen. Die meisten Amplifikationsmethoden führen eine *in vitro*-Transkription mithilfe der T7-Polymerase durch [139-142]. Markierte Sonden werden in einem geeigneten Puffer aufgenommen und während der Hybridisierung mit den

immobilisierten Sonden in Kontakt gebracht. Aufgrund der Basenkomplementarität kommt es zu Interaktionen, bei denen man drei Ziele verfolgt: Einerseits soll das Verhältnis aus Signal zu Hintergrundrauschen möglichst groß sein. Andererseits muss eine Kreuzhybridisierung aufgrund partieller Homologien zwischen markierten Sonden und immobilisierten Proben vermieden werden. Außerdem sollte die Signalstärke der Konzentration an markierter Sonde proportional sein. Um diese Eigenschaften zu erhalten, müssen die experimentellen Parameter angepasst werden: Puffer mit hoher Ionenstärke werden eingesetzt, um die elektrostatische Abstoßung zwischen Nukleinsäuren zu minimieren, wodurch die Anlagerung komplementärer Stränge erleichtert wird. Hintergrundrauschen wird durch die Zugabe von Detergenzien oder sogenannter blockierender Reagenzien verringert. Die Hybridisierung erfolgt unter stringenten Bedingungen, um Kreuzhybridisierung zu vermeiden. Während der Hybridisierung liegt die immobilisierte DNA-Probe in mindestens zehnfachem Überschuss vor. Dadurch erreicht man, dass die Interaktion zwischen Sonde und Probe über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg einer Kinetik erster Ordnung folgt. Wird die Menge immobilisierter DNA limitierend, dann schränkt sich der dynamische Bereich ein und die Messung differentiell exprimierter Gene wird komprimiert [143]. Nach der Hybridisierung werden ungebundene Sonden durch Waschen entfernt. Die Fluoreszenz der DNA-Proben, die an Sonden gebunden sind, kann mithilfe eines Scanners detektiert und anschließend quantifiziert werden. Die Intensität dieses Signals hängt von der Menge fluoreszenzmarkierter Sonden-Moleküle ab, die zur jeweiligen DNA-Probe Basenkomplementarität aufgewiesen haben. Man misst also die Menge an mRNA, die von einem bestimmten Gen transkribiert wurde. In Genexpressionsanalysen mithilfe der DNA-Mikroarray-Technologie wird die Intensität der mRNA-Transkription als Maß für die Aktivität eines Gens angesehen. Die Art der anschließenden Datenanalyse hängt sowohl von der benutzten Mikroarray-Plattform als auch von der jeweiligen Fragestellung ab [144,145]. Im ersten Schritt erfolgt üblicherweise eine Normalisierung, die systematische Variationen beseitigt, die auf methodische und nicht auf biologische Ursachen zurückführbar sind. Zum Beispiel müssen bei Zweifarben-Experimenten mit cDNAs die Fluoreszenz-Intensitäten der beiden Farbstoffe ausgeglichen werden [146]. Bei Oligonukleotid-Mikroarrays wiederum müssen die Gesamtintensitäten der einzelnen Mikroarrays abgeglichen werden, um einen sinnvollen Vergleich mehrerer Experimente durchführen zu können.

1.5.1.1 Oligonukleotid-Mikroarrays

Oligonukleotid-Mikroarrays bestehen aus synthetisch hergestellten Oligonukleotiden und werden für Einfarben-Experimente eingesetzt. Der bekannteste Hersteller von Oligonukleotid-Mikroarrays ist Affymetrix. Bei dieser Mikroarray-Technologie wird Total-RNA des zu untersuchenden Gewebes in biotinylierte cRNA umgeschrieben, die während der Hybridisierungsreaktion an komplementäre Sequenzen der Oligonukleotid-Proben bindet. Ungebundene cRNA wird durch Waschen entfernt, während Interaktionen zwischen cRNA-Sonden und Oligonukleotid-Proben durch Fluoreszenz-Antikörperfärbung sichtbar gemacht und mithilfe eines Scanners quantifiziert werden. Affymetrix verwendet redundante Proben, d.h.: Mehrere Oligonukleotide sind zu unterschiedlichen Sequenzen desselben Gens komplementär. Dadurch soll die Spezifität der Mikroarrays erhöht werden: Einerseits werden die Meßwerte zuverlässiger, wenn sie aus einer durchschnittlichen Fluoreszenz-Intensität mehrerer Proben berechnet werden. Andererseits können Ausreißer leichter erkannt und entfernt werden. Außerdem benutzt Affymetrix sogenannte Mismatch-Proben, die eine Fehlpaarung in der Mitte des sonst perfekt komplementären Oligonukleotids besitzen. Diese dienen zur Kontrolle und zur Korrektur von Signalen, die durch Hintergrundfluoreszenz und/oder Kreuzhybridisierung entstanden sind.

1.5.1.2 cDNA-Mikroarrays

Bei diesen DNA-Mikroarrays werden cDNA-Klone zur Herstellung genspezifischer DNA-Proben verwendet. Die Klone können entweder aus cDNA-Bibliotheken ausgewählt oder als cDNA-Klonkollektion erworben werden. In dieser Arbeit wurden cDNA-Mikroarrays mithilfe der Klonkollektion „Human Unigene Set RZPD 3.1“ des RZPD hergestellt (Abb. 2). Diese Kollektion basiert auf dem NCBI Unigene Clustering und besteht aus rund 38 000 Klonen, die das gesamte menschliche „Transkriptom“ abbilden. Die DNA-Fragmente sind zwischen 500 und 1200 Basenpaare lang und zum größten Teil nichtredundant. Mithilfe eines Spotters werden cDNA-Klone oder PCR-Produkte der cDNA-Klone auf das Trägermaterial überführt. cDNA-Mikroarrays werden üblicherweise für Zweifarben-Experimente verwendet, d.h.: Es wird sowohl die Total-RNA eines Zielgewebes als auch jene eines Referenzgewebes mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und dann gemeinsam auf einen cDNA Mikroarray hybridisiert. Die beiden RNA-Populationen

werden mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert, üblicherweise werden Cyanin 3 und Cyanin 5 benutzt. Die Markierung der Total-RNA ist meist mit einer Reversen Transkription und bei Bedarf mit einem oder mehreren Amplifikationsschritten gekoppelt. Als Alternative zur Total-RNA eines Referenzgewebes kann auch eine kommerziell erhältliche RNA verwendet werden. In dieser Arbeit wurde die „Universal Human Reference RNA“ von Stratagene als Referenz-RNA benutzt. Nach der Hybridisierung werden ungebundene Nukleinsäuren durch Waschen entfernt. Ein Scanner ermittelt die Fluoreszenzintensitäten von Cyanin 3 und Cyanin 5, die sich aufgrund der unterschiedlichen Absorptions- und Emissionswellenlängen getrennt detektieren lassen. Durch softwaregestützte Bildauswertung werden die Intensitätswerte für jeden DNA-Spot des Mikroarrays ermittelt und der Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten von Cy5/Cy3 berechnet. Dieser Quotient entspricht dem molaren Verhältnis der Total-RNA aus dem Zielgewebe zur Total-RNA des Referenzgewebes und ist die entscheidende Größe bei der anschließenden Datenanalyse. Der Vorteil eines Zweifarbenexperimentes besteht darin, dass der Quotient aus Cy5/Cy3 unabhängig von der Menge an gespotteter DNA ist. Daher lassen sich die Ergebnisse von Experimenten mit cDNA Mikroarrays sehr gut miteinander vergleichen, sofern dieselbe Referenz benutzt wird.

1.5.2 Genexpressionsanalysen mithilfe der DNA-Mikroarray-Technologie

Die ersten Genexpressionsanalysen mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie wurden an der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, deren Genom sehr früh sequenziert und annotiert vorlag [147]. In der Krebsforschung wurden Genexpressionsstudien mit DNA-Mikroarrays zunächst für eine molekulare Klassifikation der Tumortypen eingesetzt: In einer Studie, die 218 Proben menschlicher Tumore und 90 normale Gewebe umfasste, wurden mithilfe eines Oligonukleotid-Mikroarrays die Expressionswerte von 16063 Genen gemessen und Klassifikatoren ermittelt, die eine Einteilung der Tumortypen ermöglichte: Aufgrund der Genexpression konnten 78% aller Tumore der richtigen histologischen Kategorie zugeordnet werden [148]. In einer ähnlichen Arbeit, die ebenfalls Oligonukleotid-Mikroarrays benutzte [149], wurden Gene gefunden, deren Expression charakteristisch für Tumoren der folgenden Organe war: Brust, Prostata, Lungen, Eierstöcke, Darm, Nieren, Leber, Bauchspeicheldrüse, Blase und Mund/Rachen. In einem Test mit 175 Tumorproben konnten mittels dieser Klassifikatoren 90% aller

Tumore dem richtigen Entstehungsort zugeordnet werden. Andere Studien konnten in Hautkrebs [150], Brustkrebs [151,152] und Non-Hodgkin-Lymphome [153] neue Untergruppen identifizieren, die sich in den beiden letztgenannten Fällen auch hinsichtlich des klinischen Verhaltens unterschieden. Später konnten Signaturen auf Basis der Genexpressionswerte identifiziert werden, die prognostische Aussagen bezüglich des Krankheitsverlaufs oder des Ansprechens auf Therapien ermöglichen. Eine 17-Gen-Signatur, die zwischen primären und metastasierendem Adenokarziom unterschiedlich exprimiert wurde, war auch in der Lage, in 279 Tumoren aus verschiedenen Entstehungsorten jeweils zwei Patientengruppen definieren zu können, die sich hinsichtlich ihres Metastasierungspotential und der Überlebenszeit signifikant unterschieden [154]. Und in B-Zell-Lymphomen konnte ein Prediktor aus 17 Genen definiert werden, der die Überlebenschancen von Patienten vorhersagen konnte, die Chemotherapie erhalten hatten [155].

1.5.3 Genexpressionsanalysen mithilfe der Mikroarray-Technologie beim Mammakarzinom

Brustkrebsgewebe präsentieren sich nicht nur histopathologisch sondern auch auf Ebene der Genexpression als heterogene Gruppe [151]. Durch Verwendung von cDNA-Mikroarrays konnte eine Klassifikation des Mammakarzinoms auf Grundlage der Genexpression erstellt werden [152,156] Die stärksten Expressionsunterschiede wurden zwischen östrogenrezeptorpositiven Brustkrebsgeweben und jenen mit negativem Status des Östrogenrezeptors beschrieben [156]. Die Beobachtung, dass der Status des Östrogenrezeptors den stärksten Einfluss auf die Expressionsprofile der Mammakarzinome hatte, wurde auch in anderen Studien wiederholt gemacht [157-160]. Innerhalb dieser beiden Gruppen konnten weitere Unterklassen identifiziert werden: Bei den östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen konnte man zwei Gruppen unterscheiden, die „Luminal-A“ und „Luminal-B“ genannt wurden. Diese unterschieden sich sowohl in der Genexpression als auch im klinischen Verhalten voneinander: Mammakarzinome des Luminal-A-Typs waren besser differenziert und gingen mit einer günstigeren Prognose für den Patienten einher als Krebsgewebe des Luminal-B-Typs. Östrogenrezeptornegative Mammakarzinome ließen sich in drei Kategorien einteilen: Eine Gruppe, deren Expression normalem Brustgewebe ähnelte, ein Kollektiv an Mammakarzinomen, die als „basaler Typ“ bezeichnet wurden, und eine ErbB2-exprimierende Gruppe. Dabei hatten Patienten

des erstgenannten Typs die beste Prognose. Brustkrebs vom basalen Typ hingegen trat besonders oft bei Trägern von Mutationen der Gene *BRCA1* und *TP53* auf und führte zu einer sehr ungünstigen Prognose. Ähnlich schlecht war die Prognose für Patienten der ErbB2-exprimierenden Gruppe. In dieser Gruppe waren, ebenso wie bei Patienten des basalen Typs, 40-80% Träger einer Mutation im Gen *TP53*. Für Mammakarzinom-Patienten wurden mithilfe der DNA-Mikroarray-Technologie Gene gefunden, die als prognostische Marker verwendet werden konnten: Mithilfe eines Trainingssets aus 115 Mammakarzinomen wurde eine 76-Gen-Signatur zur Vorhersage des Auftretens von Fernmetastasen gewonnen, die in einem anschließenden Test mit 171 Patienten 93% Sensitivität und 48% Spezifität erreichen konnte [161]. In einer weiteren Studie ist es gelungen, Expressionsprofile als Metagene zu definieren, die mit dem Lymphknotenstadium und dem Wiederauftreten der Krebserkrankungen assoziiert waren und die Prognose des Patienten mit 90% Genauigkeit vorhersagen konnten [162]. Der bekannteste prognostische Marker ist die 70-Gen-Signatur von Van't Veer [157]. Grundlage dieser Signatur waren Mikroarraydaten von 117 Primärtumoren des Mammakarzinoms und die Überlebenszeiten der Patienten. Mit diesen Informationen wurden 70 Gene identifiziert, deren Expression in Patienten ohne Lymphknotenbefall ein frühes Rezidiv des Mammakarzinoms vorhersagen konnten. Die prognostische Kraft dieser 70-Gen-Signatur konnte in einer Studie mit 295 Brustkrebspatienten bestätigt werden [163].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie Genexpressionsänderungen in Brustkrebsgeweben gemessen werden (Abb.2). Die vier wichtigsten klinischen Parametern auf dem Gebiet der Brustkrebsbehandlung waren hinsichtlich der Genexpressionsänderungen zu untersuchen. Differenziell exprimierte Gene bezüglich des Östrogenrezeptorstatus sollten identifiziert werden, um zu einem besseren Verständnis des östrogeninduzierten Wachstums von Brustkrebsgeweben zu gelangen. Um die Möglichkeit zu untersuchen, mithilfe der Expressionswerte von Genen, welche die Differenzierung des Mammakarzinoms charakterisieren, prognostische Information zu erhalten, sollten Gene ermittelt werden, die mit dem Histologischen Grading des Mammakarzinoms assoziiert sind. Hinsichtlich des TNM-Status sollte untersucht werden, ob dieser molekulare

Veränderungen der Tumorprogression zu erfassen vermag. Transkriptionellen Änderungen bei *ErbB2*-Überexpression sollten bestimmt werden, um Einblick in die Veränderungen zu gewinnen, die bei Überexpression des *ErbB2*-Gens in Brustkrebsgeweben auftreten.

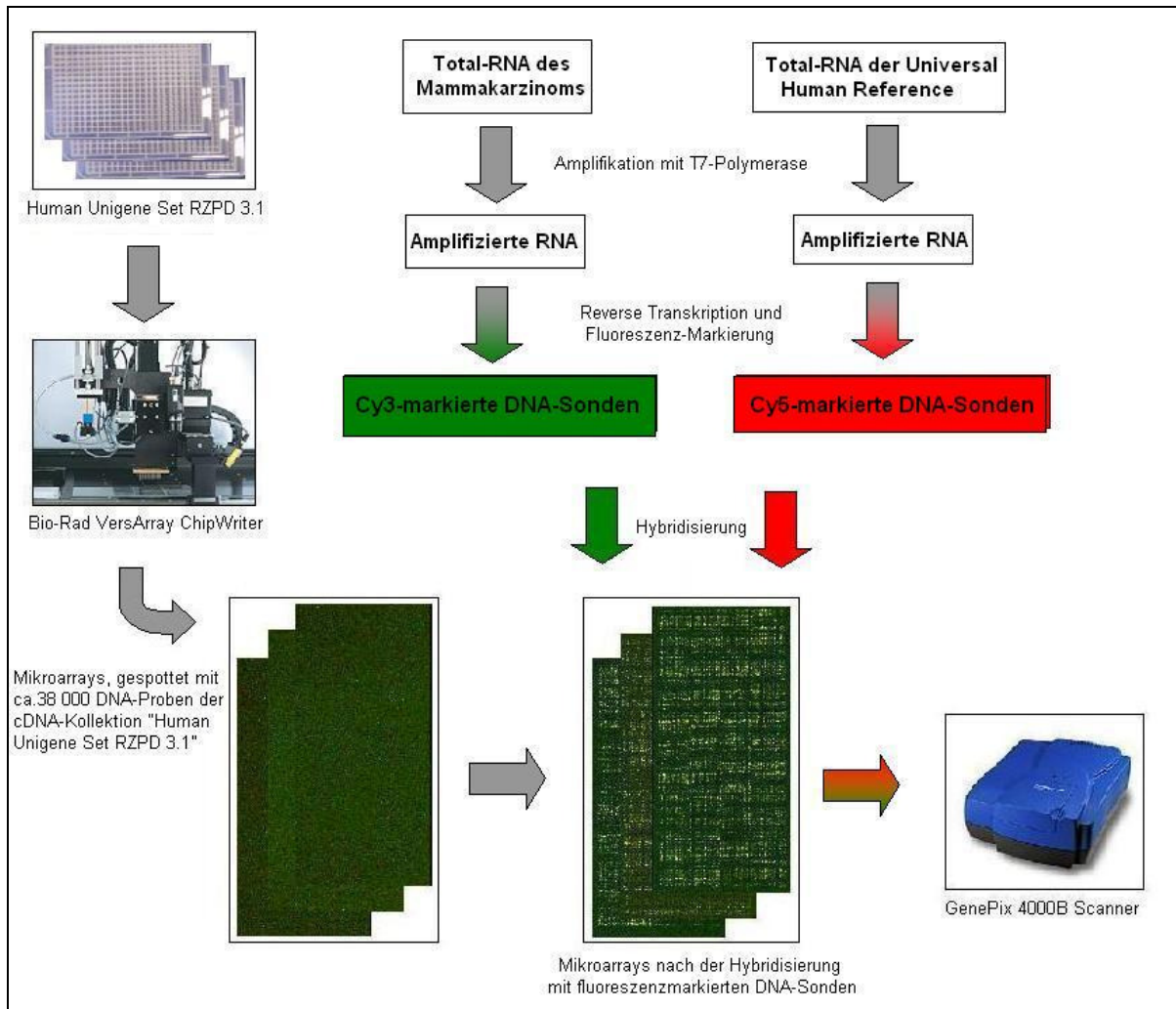


Abbildung 2: Durchführung der cDNA-Mikroarray-Experimente in dieser Arbeit

Die cDNA-Klonkollektion Human Unigene Set RZPD 3.1 wurde mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt und in 384well Platten überführt. Danach konnten die DNA-Proben mit dem Spotter VersArray ChipWriterPro auf epoxysilanbeschichtete Objektträger der Firma Quantifoil übertragen werden. Mit diesen Mikroarrays wurden Genexpressionsstudien durchgeführt. Dazu ist die Total-RNA von 126 Brustkrebspatienten isoliert, amplifiziert und mit Cy3 fluoreszenzmarkiert worden. Die Universal Human Reference RNA von Stratagene wurde ebenfalls amplifiziert und anschließend mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy5 markiert. Die markierten Sonden wurden vereinigt und für die Hybridisierung der Mikroarrays eingesetzt. Ungebundene DNA-Sonden wurde nach der Hybridisierung durch Waschen entfernt. Anschließend konnten mithilfe des GenePix 4000B Scanners die Fluoreszenz-Intensitäten jedes Spots bei 635 nm (für Cyanin3) und bei 532 nm (für Cyanin5) Wellenlänge quantifiziert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Gewebe

126 Mammakarzinomproben wurden in der Abteilung von Prof. Kurt Zatloukal (Pathologie, Medizinische Universität Graz) und Prof. Hellmut Samonigg (Onkologie, Medizinische Universität Graz) präpariert. Die Proben stammten aus der Sammlung der Pathologie Graz und wurden als gefrorene Gewebespäne, meist in RNAlater[®] aufgenommen, geliefert. Zusammen mit den Gewebeproben wurden Daten bezüglich Alter, ER- und PR-Status, TNM-Status, Grading, ErbB2-Überexpression, lymphozytischer Infiltration und Überlebenszeit der Patienten mitgeliefert. Eine Auflistung der Patientendaten findet sich in den Tabellen 20, 21 und 22 des tabellarischen Anhangs.

2.1.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Biozyme Diagnostik (Hess Oldendorf), Gibco BRL (Eggestein), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben.

2-Propanol	Fluka
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure 100%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt, Standard Grade, low salt	GERNU Biotechnik GmbH
Formaldehydlösung mind.37%	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	e.a. Thomas Chemikalien Vertriebs GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid	J.T.Baker, Deventer (Holland)
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ NaO ₇)	Fluka
Natriumhypochloritlösung	Neolab, Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.3 Puffer, Medien und Lösungen

2x Hybridisierungspuffer	2x DIG-Easy; 10x Denhardts Reagenz; Cot-1-DNA (2 ng/μl)
2x TaqMan Universal PCR Mastermix	ABgene
5 x Erststrang-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
20 x SSC	300 mM NaCl ; 30 mM Natriumcitrat; pH 7
50 x Denhardts Reagenz	Ficoll (Typ 400, Serva), Polyvinylpyrrolid von Merck), BSA (Fraktion V; Roche)
DIG-Easy	Roche Diagnostics, Mannheim
DTT 0,1 M	Invitrogen, Karlsruhe
HMF-Medium	1,8%(w/v) Trypton; 0,9%(w/v) Hefeextrakt; 1,8%(w/v) NaCl; 0,01125%(w/v) MgSO ₄ ; 0,5625%(w/v) C ₆ H ₅ NaO ₇ ; 0,1125% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 5,5% (v/v) Glycerin
LB-Medium	2% (w/v) Trypton, 1%(w/v) Hefeextrakt, 2%(w/v) NaCl
Spottingpuffer	3x SSC / 1,5 M Betain

2.1.4 Enzyme

Rnasin	40 U/μl Promega, Mannheim
Superscript III	5 U/μl Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Kits

cDNA Synthesis System	Roche Diagnostics, Mannheim
Rneasy [®] Midi Kit	Qiagen, Hilden
MessageAmp [™] aRNA Kit	Ambion, Austin, Texas
RevertAid [™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1632	Fermentas Life Sciences
RNA 6000 Nano Lab Chip Kit	Agilent Technologies

2.1.6 „Assays on Demand“ für Taqman qRT-PCR-Analysen

Alle Assays für die Taqman Analysen wurden von der Firma Applied Biosystems, Darmstadt bezogen.

AssayID	Gensymbol	Genname
Hs00369197_m1	PERLD1	CAB2 protein
Hs00170433_m1	ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leucemia homolog 2

Material und Methoden

Hs00180450_m1	GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7
Hs00275383_s1	ORMDL3	ORM-1 like 3 (S.cerevisiae)
Hs00207863_m1	THRAP4	Thyroid hormone receptor associated protein 4
Hs00199052_m1	STARD3	START domain containing 3
Hs00540639_m1	C20orf35	Dysbindin domain-containing protein 2

2.1.7 Nukleinsäure und Nukleotide

Cy3-dCTP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Cy5-dCTP	Amersham Pharmacia, Freiburg
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Peqlab Biotechnologie
Human Cot-1-DNA	Invitrogen, Karlsruhe
M13R Primer	MWG-Biotech, Ebersberg; Sequenz: 5' TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC 3'
M13U Primer	MWG-Biotech, Ebersberg; Sequenz: 5' CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'
Random Hexamere	Amersham Pharmacia Biotech
RNA 6000 Ladder	Ambion, Austin,
Universal Human Reference RNA	Stratagene, USA

2.1.8 Software

Agilent Bio Sizing V A.02.12	Agilent Technologies
Endnote 7.0	ISI ResearchSoft
Excel 2000	Microsoft Corporation
GenePix Pro 4.1	Axon Instruments Inc.
GeneSpring 6.2.	Silicon Genetics
R 1.8.1	www.r-project.org
SAM 1.21	http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/
SDS-2.1 Software	Applied Biosystems
VersArrayChipWriter™Pro 2.1.1.	Bio-Rad
Word 2000	Microsoft Corporation

2.1.9 Geräte

ABI PRISM 7900HT Sequence Detection Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Agilent Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
GenePix 4000B Scanner	Axon Instruments Inc., USA
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau

Material und Methoden

Mikro-Dismembrator S	B. Braun Biotech Int., Melsungen
MultiCycler PTC 225 Tetrad	MJ Research, Biozym
Multikanalpipette	Thermo Labsystems, Finnland
Nano-Drop	NanoDrop Technologies Inc., USA
Personal Cycler	Biometra, Göttingen
Pipettierroboter Biomek 2000	Beckman Coulter, Krefeld
QMT Epoxysilan Objektträger	Quantifoil, Jena
Ready-To-Run satellite unit	Amersham Pharmacia, Freiburg
Speedvac, Vacuum Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Spottingnadeln SMP3-Pins	TeleChem, USA
Spottingnadeln	Genetix, München-Dornach
Teflongefäße	Sartorius AG, Göttingen
Thermocycler	MJ Research, Biozym
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5810R, Eppendorf
Tissue Lyser	Retscg GmbH & Co. KG
UniGene RZPD 3.1-Klonsatz	RZPD, Berlin
VersArray ChipWriter™ Pro arrayer	Bio-Rad, München
Vortex Genie 2	neoLab, Heidelberg
Wasserbad ShakeTemp SW22	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau

2.1.10 Sonstige Materialien

384-well und	Steinbrenner, Heidelberg
96-well Mikrotiterplatten	
Adhesive PCR Film	Abgene, Hamburg
Hybridisierungskammern	Corning, USA
TSK-SUPRA Einmal-Kanülen	Ehrhardt Söhne GmbH, Geislingen
MilliQ-H ₂ O	steril filtriertes (0,22 µm Millipore Filteranlage) deionisiertes Wasser
Microcon YM-30	Millipore, Eschborn
Nuclease-free Water	Ambion, Austin, Texas
Ready-To-Run Gel, 96 wells	Amersham Pharmacia, Freiburg
RNase AWAY	Molecular BioProducts
SAFESKIN® SATIN PLUS®	Kimberly-Clark
Stainless Steel Beads, 5mm	Quiagen, Hilden
TERUMO SYRINGE 5 ml Spritze	Terumo
Wolframkugeln	neoLab, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren zu fällen, wurden die wässrigen Lösungen mit jeweils 0,6 Vol 5M NH₄OAc und 2,5 Vol Ethanol versetzt und anschließend über Nacht bei –20°C inkubiert. Durch Zentrifugation (Biofuge fresco, 16000g, 4°C, 20 min) wurden die Nukleinsäuren sedimentiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (Biofuge fresco, 16000g, 4°C, 10min). Der Überstand wurde abgehoben und das Nukleinsäure-Sediment 30 min luftgetrocknet. Die Aufnahme der Nukleinsäuren erfolgte in einem geeigneten Volumen Nuklease-freien Wassers.

2.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Für die Reinigung der DNA wurde 1 Vol Phenol eingesetzt, das mit TE, pH 7,5-8, gesättigt war. Nach gründlichem Mischen von wässriger und organischer Phase wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation beschleunigt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Nach Zentrifugation und Überführen der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde eine weitere Extraktion mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt, um Phenolreste aus der Lösung zu entfernen.

2.2.1.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Erststrangsynthese komplementärer DNA erfolgte mithilfe des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1632 von Fermentas. Die cDNA-Synthese erfolgte gemäß der Herstellerangaben, allerdings unter Verwendung des halben Reaktionsvolumens (10 µl statt 20 µl). Dazu wurden zunächst 1 µg total-RNA mit jeweils 250 ng oligo(dT)₁₈-Primer in einem Volumen von 6µl gemischt und 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und mit jeweils 4 µl Mastermix-Lösung (2 µl 5x Reaktionspuffer; 0,5 µl 20U/µl Ribonuklease Inhibitor; 1 µl 10mM dNTP-Mix; 0,5 µl 200U/µl RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase) versetzt. Die Synthese des Erststranges wurde eine Stunde lang bei 42°C durchgeführt. Danach wurde das Enzym durch 10 Minuten Inkubation bei 70°C

deaktiviert. Ribonukleinsäuren wurden mittels einer alkalischen Hydrolyse hydrolysiert: Dazu wurde die Lösung mit Natronlauge auf eine Endkonzentration von 0,3Mol/l gebracht und 30 min bei 70°C inkubiert. Nach der alkalischen Hydrolyse wurde die Lösung mit Essigsäure neutralisiert, mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und einer Ethanol-Präzipitation unterzogen.

2.2.2 Herstellung der Sonden

2.2.2.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde der RNeasy Midi Kit (Qiagen) eingesetzt. Die Gewebe wurden mithilfe eines Dismembrators zerkleinert und in 2 ml guanidinisothiocyanathaltigem RLT-Puffer, der RNasen inaktiviert, lysiert. Zum Homogenisieren wurde das Lysat 10 mal durch eine 0,9 x 120 mm große Kanüle gezogen. Zum Entfernen der Zellüberreste wurde 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand in neue 15 ml Falcontubes überführt. Anschließend wurde ein Volumen 70% Ethanol zugesetzt und die Probe auf die RNeasy Mini-Säule pipettiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (4000 rpm, 5 min) band die Gesamt-RNA an die Matrix der silicagelbasierten Säule, während die übrigen Substanzen abgetrennt wurden. Durch die darauf folgenden Wasch- und Zentrifugationsschritte mit RW1-Waschpuffer und RPE-Puffer wurde die RNA aufgereinigt. Abschließend wurde die RNA mit 200 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (4000 rpm, 3min) aus der Säule eluiert und bei -80°C eingefroren.

Bei der RNeasy Methode wurden RNA-Moleküle, die aus über 200 Nukleotiden bestehen, isoliert. Da RNA-Arten mit weniger als 200 Nukleotiden (z. B. 5S rRNA, 5,8S rRNA und tRNAs, die gemeinsam ungefähr 15-20% der Gesamt-RNA ausmachen) durch das Verfahren selektiv abgetrennt wurden, erfolgte eine Anreicherung von 18S rRNA; 28S rRNA und mRNA.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe des NanoDrop ND-100 Spektrophotometers (Nanodrop Technologies). Dabei wurde die Absorption der Lösung bei verschiedenen Wellenlängen gemessen: Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Liegt RNA vor, so

entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 einer Konzentration von 40 µg/ml (DNA: 50 µg/ml). Proteine hingegen besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Die Reinheit der Nukleinsäure wurde über den Quotienten von 260 nm zu 280 nm Wert bestimmt, wobei der Quotient bei reinen Nukleinsäurelösungen einen Wert von mehr als 1,8 erreichen sollte.

Beim NanoDrop Spektrophotometer konnten Konzentrationen von 2-3000 ng/µl in einem Probenvolumen von nur 1 µl gemessen werden. Die Nukleinsäurelösungen wurden dazu direkt auf die Messoberfläche pipettiert und der Schwingarm des Gerätes darauf heruntergelassen. Durch die Oberflächenspannung der Probe wurde eine Flüssigkeitssäule zwischen den Enden der optischen Fasern der Messoberfläche und des Schwingarms aufgebaut, die den Messpfad etablierte. Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und Konzentrationen wurden anschließend auf einem Computerbildschirm dargestellt.

2.2.2.3 Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Qualitätsbestimmung der RNA erfolgte durch den Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies). Die Funktionsweise des Agilent RNA 6000 Nano Assays beruhte auf der gelelektrophoretischen Auftrennung von Ribonukleinsäuren in einem RNA Nano Assay Chip. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern dabei in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Die Wanderungsgeschwindigkeit wurde dabei durch die Größe und räumliche Struktur der Nukleinsäuren und die Porengröße des Gels beeinflusst. Anders als in konventionellen Agarosegelen diente hier ein mit Gel gefülltes Mikrokanalsystem als Trägersystem. Innerhalb dieses Kanalsystems detektierte eine Photosonde die Zeit, die jede Nukleinsäure benötigte, um eine Strecke definierter Länge zurückzulegen. Zum Beladen der Kammer wurde zunächst die Gel-Farbstoff-Matrix aus 130 µl RNA-Gel-Matrix und 2 µl RNA-Farbstoff hergestellt. 9 µl dieser Gel-Farbstoff-Matrix pipettierte man in die dafür vorgesehene Vertiefung auf dem RNA-Chip und stellte diesen in die Chip-Priming-Station. Durch das Anlegen eines Drucks für 30 sec, mittels einer in der Station integrierten Spritze, wurde die Gel-Farbstoff-Matrix über das Mikrokanalsystem verteilt. Als Reserve wurde anschließend in zwei weitere Öffnungen des RNA-Chips 9 µl der Gel-Farbstoff-Matrix pipettiert. In die restlichen 13 Vertiefungen wurden je 5 µl RNA-Nano-Marker gegeben. Als Längenstandard wurde der RNA 6000 Längenstandard (Ambion) verwendet, der vor der Benutzung für 5 min bei 70°C denaturiert wurde.

Anschließend wurden jeweils 1 µl des Längenstandards und der maximal 12 zu untersuchenden RNAs in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert. Der fertig beladene RNA-Chip wurde für 1 min gevortext und anschließend zur Analyse in den Bioanalyzer gestellt. Zur Messung wurden die vorgegebenen Einstellungen für eukaryotische Gesamt-RNA verwendet.

2.2.2.4 Lineare RNA-Amplifikation

Die Amplifikation der isolierten mRNA erfolgte mit Hilfe des MessageAmpTM aRNA Kits (Ambion), das auf dem von Van Gelder et al. [139] entwickelten Amplifikationsprotokoll basierte. Dabei wurde zunächst eine Reverse Transkription mit einem oligo(dT) Primer, an dem die Sequenz des T7 Promotors gekoppelt war, durchgeführt. Die resultierende doppelsträngige cDNA fungierte anschließend als Matrize für eine *in vitro*-Transkription mithilfe der RNA Polymerase des Bakteriophagen T7. Die *in vitro*-Transkription amplifizierte die cDNA linear und führte zu einer Vervielfältigung der Ausgangs-mRNA um einen Faktor von ca. 100 - 400. Die dabei entstehende RNA besaß eine zur Ausgangs-RNA komplementäre Sequenz und wurde amplifizierte RNA (aRNA) genannt. Die Qualität der aRNA wurde schließlich mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 überprüft. Für Hybridisierungen wurde nur qualitativ hochwertige aRNA verwendet.

2.2.2.5 Fluoreszenz-Markierung von Nukleinsäuren

Vor der Hybridisierung wurde die amplifizierte RNA in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben und gleichzeitig mit Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP fluoreszenzmarkiert: aRNA-Proben der invasiv duktaalen Karzinome aus der Pathologie Graz wurden mit Cy3-dCTP, amplifizierte Referenz-RNA (Universal Human Reference RNA, Stratagene USA) hingegen wurde mit Cy5-dCTP markiert. Die Katalyse erfolgte mittels SuperScriptTM III (Invitrogen), einer gentechnisch veränderten Variante der MMLV-Reversen Transkriptase. Für jede Markierungsreaktion wurden jeweils 2 µg aRNA eingesetzt, die zusammen mit 500 ng Random Hexamer Primer in einem Volumen von 6,25 µl gelöst wurden. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Danach wurde jeder Reaktionsansatz mit folgenden Substanzen ergänzt: 2,5 µl 5x RT-Erststrangpuffer, 1,25 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl RNasin (20 U), 0,5 µl Superscript III Reverse Transkriptase (100 U), 1 µl Nukleotid-Mix (dGTP, dATP und dTTP: jeweils 5 mM; dCTP: 3 mM).

Außerdem wurden entweder 0,5 µl Cy3-dCTP oder 0,5µl Cy5-dCTP zugesetzt. Der komplette Ansatz umfasste 12,5 µl und wurde für 1 h bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,25 µl 50 mM EDTA (pH 8) abgestoppt. Der Abbau der aRNA fand durch alkalische Hydrolyse statt: Der Ansatz wurde mit 5 µl 1 M NaOH versetzt und anschließend für 10 min bei 65°C inkubiert. Zum Neutralisieren des Reaktionsansatzes wurde abschließend 1 µl 5 M Essigsäure zugegeben. Die Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten einzelsträngigen cDNA erfolgte mittels YM-30 Säulchen (Millipore). Die Proben wurden mit jeweils 12,5 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei –20°C gelagert.

2.2.3 Herstellung Unigene 3.1.-gespotteter cDNA-Mikroarrays

2.2.3.1 Kultivierung der Unigene 3.1. Klone

Der menschliche Unigene RZPD 3.1.-Klonsatz wurde im 384-well Plattenformat geliefert und umfasste 101 Klonplatten. Alle Klone wurden zunächst in 384-well Platten, die mit jeweils 60 µl HMFM-Medium gefüllt waren, übergeimpft und übernacht bei 37°C inkubiert. Die Klonplatten wurden bei –80°C aufbewahrt und dienten als Ausgangspunkt für alle weiteren Kultivierungen. Dazu wurden die Klone erneut in 384-well Platten übergeimpft, die mit jeweils 60 µl LB-Ampicillin-Medium gefüllt waren, und übernacht bei 37°C inkubiert. Diese Klonplatten wurden bei –80°C aufbewahrt und dienten als Ausgangspunkt für die Hochdurchsatz-Amplifikation der Unigene 3.1.-Klone.

2.2.3.2 Hochdurchsatz PCR-Amplifikation der Unigene 3.1. Klone

Die Amplifikation der DNA-Sequenzen aus dem Unigene 3.1.-Klonsatz erfolgte durch Polymerasekettenreaktion mit den Primern M13U und M13R, die von der Taq-Polymerase katalysiert wurde. Dazu wurde für jede 384-well Klonplatte ein 400-facher PCR-Mix (Tabelle 4) angesetzt. Jeweils 100 µl des PCR-Mix wurden in 4 x 96 well Platten vorgelegt. In jedes well wurde anschließend 2,5 µl Bakterienkultur pipettiert. Die Zellen wurden durch Triton X-100 aufgeschlossen und die Plasmide mit der zu amplifizierenden DNA-Matrize freigesetzt. Die Durchführung des Temperaturprogrammes erfolgte in einer Tetraden-PCR-Maschine (MultiCycler PTC 225 Tetrad). Zur Überprüfung der PCR-Effizienz wurde aus jedem zweiten well 5µl des Reaktionsansatzes in einem 1,6%igen Agarosegel gelelektrophoretisch

aufgetrennt und photographisch dokumentiert. Wenn die Qualität der Kolonie-PCR in Ordnung war, wurden nicht inkorporierte Nukleotide, Primer, Enzyme und Salze durch Isopropanol-Fällung aus dem Ansatz entfernt. Anschließend wurde die gefällte DNA in jeweils 15 µl Spottingpuffer aufgenommen. Die Polymerasekettenreaktion inklusive Aufreinigung wurde für jeden Klon zweimal durchgeführt. Danach wurden die in Spottingpuffer gelösten PCR-Produkte zu einem Gesamtvolumen von 30 µl vereinigt und in spezielle Spottingplatten pipettiert. Abschließend wurde die Qualität der zum Spotting verwendeten PCR-Produkte nochmals mittels Ready-To-Run-Gelen (Amersham Pharmacia) überprüft.

Tabelle 4: Kolonie-PCR Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Schritt: Denaturierung	94 °C	3 min
2. Schritt: Denaturierung*	94 °C	30 s
3. Schritt: Anlagerung*	57 °C	30 s
4. Schritt: Polymerisation*	72 °C	2 min
5. Schritt: Finale Polymerisation	72 °C	5 min
6. Schritt: Ende	4 °C	∞

* Die Schritte 2 bis 4 wurden in 35 Zyklen wiederholt

Tabelle 5: einfacher Kolonie-PCR Ansatz

Menge	Reagenzien	Endkonzentrationen
10,0 µl	10 x PCR-Puffer*	1x
6,0 µl	MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM
0,2 µl	dNTP-Mix (25 mM each)	0,05 mM
1,0 µl	Triton-X-100	1%
0,5 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)	2,5 U
0,2 µl	M13U Primer (100µM)	0,2 µM
0,2 µl	M13R Primer (100 µM)	0,2 µM
81,9 µl	MilliQ Wasser	
Σ = 100 µl		

*10x PCR-Puffer: Endkonzentration: 100 mM Tris-HCl, 500mM KCl →pH 9

2.2.3.3 Spotting der PCR-Produkte auf Glasobjektträger

Die in 3x SSC/1,5 M Betain resuspendierten PCR-Produkte wurden mithilfe des VersArray ChipWriter™ Pro arrayer (Bio-Rad) in einem geordneten Muster auf die mit Epoxysilan beschichtete Oberfläche von Glasobjektträgern (Quantifoil) transferiert. Zum Übertragen der PCR-Produkte wurden 48 Spottingnadeln (TeleChem SMP3 oder Genetix) verwendet, die ein Aufnahmevolumen von 0,25 µl besaßen. Pro Oberflächenkontakt wurden von den Nadeln jeweils 2 bis 5 nl des PCR-Produktes abgegeben, wodurch cDNA-Spots mit einem Durchmesser von 100

bis 150 µm entstanden. Jede der 48 Nadeln produzierte dabei einen Block aus 28x29 Spots, sodass sich maximal 38976 PCR-Produkte auf einen Mikroarray übertragen ließen. Nach dem Transfer des PCR-Produktes wurden die Nadeln in 2 Zyklen jeweils 2 Sekunden in einer Waschstation mit voll entsalztem Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Nach jedem Spottingplattenwechsel wurde zusätzlich zu dem Waschschrift ein Sonifizierschritt zum Reinigen der Nadeln durchgeführt. Die gesamte Spottingprozedur wurde unter einer Abdeckung durchgeführt, um Staubkontaminationen zu vermeiden. Außerdem wurde die Luftfeuchtigkeit zwischen 40 - 60% gehalten. Pro Spottinglauf wurden so 108 cDNA-Mikroarrays hergestellt.

2.2.3.4 Nachbehandlung der gespotteten cDNA-Mikroarrays

Bevor die cDNA-Mikroarrays zur Hybridisierung verwendet werden konnten, mussten sie nachbehandelt werden. Die Nachbehandlung wurde ca. eine Woche nach dem Spotting durchgeführt, da ansonsten die feuchten Spots ineinander gelaufen wären. Während dieser Woche wurden die gespotteten cDNA-Mikroarrays zum Trocknen bei Raumtemperatur in einer Objektträgerbox aufbewahrt. Zu Beginn der Nachbehandlung wurden die Mikroarrays mit Wasserdampf ca. 30 s rehydriert. Anschließend wurden sie für 10 s auf einer 95°C warmen Heizplatte getrocknet. Gewaschen wurden die Mikroarrays in einer Färbekammer (Tabelle 6). Nach dem Isopropanol-Schritt wurden die Mikroarrays mit Druckluft trocken geblasen und bis zur Hybridisierung in einer Objektträgerbox trocken gelagert.

Tabelle 6: Waschschrte nach dem Spotting

Puffer	Zeit	Volumen
0,2% SDS	10 s	250 ml
70% Ethanol	10 s	250 ml
95% Ethanol	10 s	250 ml
Isopropanol	bis zum Abblasen	250 ml

2.2.4 Hybridisierung und Spot Quantifizierung

2.2.4.1 Hybridisierung auf cDNA-Mikroarrays

Die fluoreszenzmarkierten DNA-Proben wurden auf Glasobjektträger hybridisiert, die mit Epoxysilan beschichtet waren. Für die Hybridisierungen sind jeweils 12,5 µl der Cy3-markierten cDNA, die aus der mRNA von invasiv duktafen Karzinomen hergestellt wurde, und 12,5 µl Cy5-markierte cDNA, die aus amplifizierter Referenz-

RNA gewonnen wurde, vereinigt worden. Anschließend wurden die gemischten Proben mit dem gleichen Volumen 2x Hybridisierungspuffer versetzt und bei 65 °C für 2 min im Heizblock denaturiert. Die im Hybridisierungspuffer enthaltene Cot-1-DNA diente der Unterdrückung unspezifischer Hybridisierungen und der Absättigung repetitiver Sequenzen. Anschließend wurden 50 µl des Hybridisierungsansatzes auf das untere Drittel der gespotteten Seite des Mikroarrays pipettiert. Durch Auflage eines Deckglases wurde die Hybridisierungslösung luftblasenfrei zwischen Mikroarray und Deckglas verteilt. Zur Fixierung des Deckglases wurde in der Mitte der beiden schmalen Seiten ein kleiner Punkt Klebstoff (Fixogum) aufgetragen. Während des Antrocknens des Klebers wurde der Mikroarray für wenige Minuten dunkel gelagert. Anschließend kam er in eine Hybridisierungskammer (Corning), in deren Aussparungen je 10 µl 1x DigEasy (Roche) pipettiert wurden. Die Hybridisierung erfolgte bei 37 °C in einem langsam schüttelnden Wasserbad für 13 bis 16 h. Zum Waschen der Mikroarrays wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Waschschriffe durchgeführt. Durch die mit steigender Stringenz durchgeführten Waschvorgänge wurde nicht ausreichend gebundene DNA von der Trägermatrix entfernt. Es galt zu beachten, dass nach dem ersten Waschschriff alle Deckgläser von den Mikroarrays gelöst wurden. Außerdem wurden nach dem dritten Waschschriff die sich noch auf dem Mikroarray befindlichen Kleberreste abgelöst, da diese den Scanvorgang der Objektträger beeinflussen konnten.

Tabelle 7: Waschschriffe nach der Fluoreszenz-Hybridisierung

Puffer	Zeit	Temperatur	Ort
1x SSC/0,1% SDS	15 min	25 °C	H ₂ O-Bad
1x SSC/0,1% SDS	10 min	25 °C	H ₂ O-Bad
1x SSC/0,1% SDS	10 min	25 °C	H ₂ O-Bad
0,1x SSC/0,1% SDS	10 min	25 °C	H ₂ O-Bad
70% EtOH	5 s	Raumtemperatur	Laborbank
95% EtOH	5 s	Raumtemperatur	Laborbank
Isopropanol	max. 10 min	Raumtemperatur	Laborbank

2.2.4.2 Spot Quantifizierung

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mithilfe des GenePix 4000B Scanners (Axon Instruments). Dieser benutzte zwei Laser zur Anregung von Cy5 bzw. Cy3, sowie zwei Photoverstärker-Röhren zur Detektion des emittierten Lichtes. Die Verstärkung der Signale war von der Spannung zwischen Anode und Photokathode abhängig und sollte laut Herstellerangaben in einem Bereich zwischen 500 und 900 Volt liegen, um ein gutes Verhältnis zwischen Signalintensität und

Rauschen zu gewährleisten. Außerdem musste beachtet werden, dass die Fluoreszenzintensitäten von Cy3 und Cy5 ungefähr gleich waren und der dynamische Bereich des GenePix Scanners möglichst gut ausgenutzt wurde. Die Einstellung der Photoverstärker-Röhren wurde für jeden Mikroarray so gewählt, dass diese Vorgaben bestmöglich erfüllt wurden. Dazu wurden zum Scannen der in dieser Arbeit vorgelegten Mikroarrays Spannungen zwischen 570 und 720 Volt angelegt. Die Mikroarrays wurden mit einer Auflösung von 10 μm pro Pixel gescannt und im 16-Bit Tiff-Format gespeichert. Zur Bildauswertung wurde die GenePix Pro 5.0 Software (Axon Instruments) verwendet. Die Visualisierung erfolgte durch virtuelle Überlagerung der Bilder von beiden Kanälen und Anzeige in einer Falschfarben-Darstellung. Anschließend wurde die GAL(Gene Allocation List)-Datei benutzt, um ein geometrisches Raster zur Spoterkennung und Spotanalyse über das angezeigte Falschfarbenbild zu legen. Die Spots wurden quantifiziert, indem die Mediane der Fluoreszenzintensitäten aller im Spot enthaltenen Pixel berechnet und in einer GPR(GenePix Results)-Datei abgespeichert wurden.

2.2.5 Analyse der cDNA-Mikroarrays

2.2.5.1 Präprozessierung und Normalisierung

Bevor mit den Medianen der Fluoreszenzintensitäten eine Datenanalyse durchführbar war, mussten einige vorbereitende Schritte durchgeführt werden: Zunächst wurden Klone von der weiteren Analyse ausgeschlossen, deren Fluoreszenzintensität nicht in 80% der Experimente den Mindestwert von 60 erreichten. Auf diese Weise wurden Klone entfernt, die entweder unzureichend exprimiert wurden und/oder deren Sonden nicht verfügbar waren. Zuletzt wurden die Expressionswerte mittels LOWESS normalisiert, um Unterschiede in den Gesamt-Intensitäten von Cy3 und Cy5 sowie intensitätsabhängige Abweichungen im Verhältnis von Cy3/Cy5 auszugleichen [146]. Dazu wurde eine lokal gewichtete lineare Regression als Funktion des dekadischen Logarithmus der Fluoreszenzintensitäten durchgeführt und zur Anpassung der Cy3/Cy5-Verhältnisse benutzt. Als Endergebnis wurden Daten erhalten, die sich über den gesamten Intensitätsbereich hinweg annähernd symmetrisch um ein Cy3/Cy5-Verhältnis von 1 verteilten.

2.2.5.2 Selektieren differentiell exprimierter Gene mittels t-Test

Eine Vielzahl an Methoden wurde vorgeschlagen, um aus Mikroarraydaten differentiell exprimierte Gene selektieren zu können. Einige Verfahren wiesen Schwächen auf (z.B. Fold change method, Unusual ratio method), während andere Methoden für die Anwendung im realen Forschungsbetrieb impraktikabel waren (z.B. Noise sampling, Model based maximum likelihood estimation). Die Verwendung des t-Tests oder t-Test-ähnlicher Verfahren (z.B. SAM) zur Analyse von Mikroarraydaten wurde daher zu einer weit verbreiteten und effizienten Vorgehensweise. Der t-Test liefert eine Entscheidungshilfe darüber, ob ein gefundener Mittelwertsunterschied zufällig entstanden ist oder ob bedeutsame Unterschiede zwischen den zwei untersuchten Gruppen existieren [164]. Dazu wurde für jedes untersuchte Gen auf Grundlage der Expressionswerte die Wahrscheinlichkeit (p-Wert) berechnet, dass die beobachteten Mittelwertsunterschiede zwischen klinisch unterschiedlichen Gruppen auf einen Stichprobenfehler rückführbar waren und es daher keinen echten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gab. In dieser Arbeit wurden p-Werte unter der Annahme errechnet, dass die Varianz der Messwerte in beiden Gruppen identisch war. Nach Berechnung der p-Werte wird eine Entscheidungsgrenze gezogen, ab der man die Annahme einer zufälligen Mittelwertsdifferenz (=Nullhypothese) ablehnt und stattdessen von der Existenz eines realen Unterschieds zwischen den beiden untersuchten Gruppen ausgeht. Diese Entscheidungsgrenze wird Signifikanzniveau α genannt und liegt per Konvention meistens bei $\alpha = 0,05$; einige Untersuchungen verwenden auch Signifikanzniveaus von 0,01 oder 0,1. Bei der Anwendung des t-Tests musste zusätzlich berücksichtigt werden, dass in Mikroarrayexperimenten mehrere Tausend Gene gleichzeitig getestet wurden. Eine Korrektur für Multiples Testen wurde daher mit dem t-Test gekoppelt.

2.2.5.3 Korrektur für Multiples Testen

Wendet man einen t-Test auf Mikroarraydaten an, so wird der p-Wert für jedes Gen einzeln berechnet und die Entscheidung, die Nullhypothese für ein gegebenes Signifikanzniveau zu verwerfen, unabhängig von der Anzahl der im Gesamtexperiment durchgeführten Tests getroffen. Mit der Anzahl der durchgeführten Tests erhöht sich allerdings die Gesamtwahrscheinlichkeit, Gene als differentiell exprimiert zu definieren, sodass z.B. der t-Test von 20000 Genen bei

einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ auch dann 200 Gene als differentiell exprimiert angegeben wird, wenn die Nullhypothese tatsächlich für alle Gene zutreffend war. Daher wurden alle in dieser Arbeit durchgeführten t-Tests mit der Benjamini und Hochberg False Discovery Rate korrigiert [165]. Bei diesem Verfahren wurden zunächst die p-Werte von alle Genen in aufsteigender Reihenfolge geordnet und die Gene in Abhängigkeit ihrer Position in dieser Liste mit dem Index k versehen ($k = 1$ für das Gen mit dem größten p-Wert; $k = 2$ für das Gen mit dem zweitgrößten p-Wert ...; $k = R$ für das Gen mit dem kleinsten p-Wert). Der größte p-Wert wurde unverändert gelassen, der zweitgrößte p-Wert wurde mit der Gesamtanzahl der durchgeführten Tests R multipliziert und durch 2 (Index k) dividiert, der drittgrößte p-Wert wurde ebenfalls mit R multipliziert und durch 3 dividiert u.s.w. Die Nullhypothese wurde abgelehnt, wenn der korrigierte p-Wert kleiner als das vom Benutzer vorgegeben Signifikanzniveau α_e war:

$$\alpha_e > \frac{R \cdot p_k}{k}$$

α_e ...vom Benutzer vorgegebenes Signifikanzniveau
 R...Anzahl der getesteten Gene
 p_k ...p-Wert des Gens an Position k
 k... Index k; nummeriert die Gen nach der Größe des p-Wertes
 $k = 1,2,\dots,R$

Bei Durchführung dieses Verfahrens änderte sich die Interpretation des vom Benutzer vorzugebenden Signifikanzniveaus α_e : Dieses ist als Fehlerrate zu interpretieren, d.h. als Wahrscheinlichkeit des Auftretens von falsch Positiven in der als statistisch signifikant definierten Gruppe von Genen. Übliche Fehlerraten α_e liegen bei 0,05 (5% der Gene sind falsch positiv) oder 0,02 (2% der Gene sind falsch positiv).

2.2.5.4 Significance Analysis of Microarrays (SAM)

Signifikante Gene wurden mithilfe der statistischen Methode „SAM“ (Significance Analysis of Microarrays) gefunden [166]. SAM berechnet für jedes Gen i den sogenannten „SAM score“ d_i nach der Formel:

$$d_i = \frac{r_i}{s_i + s_0}$$

d_i ...SAM score
 r_i ...abhängig von der Art des durchgeführten Tests
 s_i ... abhängig von der Art des durchgeführten Tests
 s_0 ...Faktor, der ein zu groß werden von d_i verhindert
 i Index i; nummeriert die Gene; $i = 1,2,\dots,p$
 p Anzahl der untersuchten Gene

Der Faktor s_0 soll verhindern, dass der SAM score zu groß wird, falls die Standardabweichung s_i nahe Null liegt. Die Definition der Variablen r_i und s_i ist von der Art des durchgeführten Tests abhängig: Wurde SAM benutzt, um differentielle Gene zwischen zwei ungepaarte Gruppen von Mikroarrayexperimenten zu definieren („Two class, unpaired data“), wurde r_i mit der Mittelwertsdifferenz der Genexpressionswerte gleichgesetzt, sodass sich ergab:

$$d_i = \frac{\bar{X}_{i1} - \bar{X}_{i2}}{s_i + s_0}$$

d_i ...SAM score
 \bar{X}_{i1} ...Mittelwert des Gens i in der ersten Gruppe
 \bar{X}_{i2} ...Mittelwert des Gens i in der zweiten Gruppe
 s_i ...Schätzung der Standardabweichung der Messwerte
 s_0 ... Faktor, der ein zu groß werden von d_i verhindert
 i ...Index i ; nummeriert die Gene; $i = 1, 2, \dots, p$
 p Anzahl der untersuchten Gene

Die Grundidee war in diesem Fall mit jener eines t-Tests identisch: Eine Mittelwertsdifferenz zwischen den zu untersuchenden Gruppen wurde durch eine Schätzung der Standardabweichung der Messwerte dividiert. Dabei ging SAM von der Annahme aus, dass die Messwerte in den beiden untersuchten Gruppen die gleiche Varianz aufweisen. Daraus folgte für die Variable s_i :

$$s_i = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

s_i ...Schätzung der Standardabweichung der Messwerte
 n_1 ...Anzahl der Gene in Gruppe 1
 n_2 ...Anzahl der Gene in Gruppe 2
 s_1^2 ...Varianz des Gens i innerhalb der ersten Gruppe
 s_2^2 ...Varianz des Gens i innerhalb der zweiten Gruppe

Bemerkenswerterweise ist diese Gleichung mit jener identisch, die von einem t-Test (bei Annahme gleicher Varianz in den untersuchten Gruppen) zur Berechnung der Standardabweichung benutzt wird. Das Problem des Multiplen Testens bestand auch bei der Anwendung von SAM, da Tausende Genexpressionswerte gleichzeitig getestet wurden. Anders als beim t-Test wurde keine Korrektur für Multiples Testen verwendet, sondern ein Permutationsverfahren eingesetzt. Um die Anzahl der falsch positiven Gene abzuschätzen, wurden in dieser Arbeit 1000 Permutationen durchgeführt. Für jede Permutation i wurde der Wert einer Teststatistik t_i berechnet,

der sich aus der Formel zur Berechnung des SAM scores ergab. Damit entsprach jede Teststatistik t_i einer Beobachtung, bei der die Nullhypothese zutrif. Diese Werte wurden benutzt, um eine empirische Verteilung der Teststatistik t_i zu berechnen und im sogenannten SAM-Plot jener von d_i gegenüberzustellen. Auf diese Weise wurde ein optischer Eindruck erhalten, ob die vom Benutzer getroffene Gruppeneinteilung zu größeren Werten der von SAM berechneten Statistik führt als eine zufällig getroffene Einteilung. Zusätzlich wurde eine Abschätzung der zu erwartenden falsch positiven Gene durchgeführt, um eine Entscheidungshilfe bei der Selektion der signifikanten Gene zu erhalten. Optional konnte auch ein minimale Mittelwertsdifferenz angegeben werden, ab der Gene als signifikant interpretiert wurden.

Dasselbe statistische Verfahren ließ sich einsetzen, um Gene zu identifizieren, deren Expression mit einem quantitativen Faktor korrelierten („Quantitative Response“): In diesem Fall wurde r_i mit dem linearen Regressionskoeffizienten und s_i mit dem Standardfehler von r_i gleichgesetzt.

Bei der SAM Survival Analyse wurden die notwendigen Parameter wie folgt definiert: $y_j = (t_j, \Delta_j)$. t_j war dabei die Überlebenszeit, $\Delta_j = 1$, wenn der Tod des Patienten eingetreten war und 0, wenn die Überlebenszeit zensiert war.

d war der Index für k Todeszeitpunkte z_1, z_2, \dots, z_k und R_1, R_2, \dots, R_k waren die Indizes für das Risiko zu den Todeszeitpunkten, also war $R_k = \{i: t_i \geq z_k\}$. Und d_k war die Anzahl der Toten zum Zeitpunkt z_k .

Die zur Berechnung des SAM-Scores notwendigen Größen r_i und s_i wurden dann folgendermaßen berechnet:

$$r_i = \sum_{k=1}^K \left[\sum_{t_j=z_k} X_{ij} - d_k \sum_{j \in R_k} \frac{X_{ij}}{m_k} \right]$$

Die Standardabweichung der Messwerte wurde über folgende Formel geschätzt:

$$s_i = \left[\sum_{k=1}^K \left(\frac{d_k}{m_k} \right) \sum_{j \in R_k} (X_{ij} - \bar{X}_{ik})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

2.2.5.5 Varianzanalyse (ANOVA)

Die Varianzanalyse, welche in der englischsprachigen Literatur und in Computerprogrammen oft auch als ANOVA (Analysis of variance) bezeichnet wird, ist ein Auswertungsverfahren, mit dem die Wirkung eines Faktors oder mehrerer Faktoren auf intervallskalierte Variablen analysiert werden kann. Dabei wird angenommen, dass die Messwerte sowohl systematischen als auch unsystematischen Einflüssen ausgesetzt sind. Systematische Einflüsse sind auf experimentelle Manipulationen oder biologische Prozesse zurückzuführen, während unsystematische Einflüsse weder intendiert noch durch das Experiment systematisch erfasst werden können, dazu zählen Stichprobenfehler oder/und zufällige Messfehler. Beide Einflüsse erzeugen Abweichungen der Daten vom Gesamtmittelwert: Systematische Einflüsse führen zur sogenannten systematischen Varianz, während unsystematische Einflüsse die Residualvarianz bewirken. Die Varianzanalyse führt eine Schätzung der beiden Varianzen durch und bildet einen Quotienten, der als F-Bruch bezeichnet wird. Der Schätzer für die systematische Varianz plus der Residualvarianz wird als „Varianz zwischen“ bezeichnet, während der Schätzer für die Residualvarianz „Varianz innerhalb“ genannt wird. Der F-Bruch ist der Quotient aus Varianz zwischen dividiert durch die Varianz innerhalb.

$$F = \frac{\hat{\sigma}_{\text{zwischen}}^2}{\hat{\sigma}_{\text{innerhalb}}^2}$$

F...F-Wert

$\hat{\sigma}_{\text{zwischen}}^2$...Varianz zwischen; erwartungstreuer Schätzer der systematischen Varianz plus der Residualvarianz

$\hat{\sigma}_{\text{innerhalb}}^2$...Varianz innerhalb; erwartungstreuer Schätzer der Residualvarianz

Diese Division liefert den Kennwert für die Varianzanalyse, den sogenannten F-Wert. Die Aussagekraft des F-Wertes wird offensichtlich, wenn man die folgenden zwei Möglichkeiten betrachtet:

1) Einem Datensatz liegen keine systematischen Einflüsse zugrunde, d.h. die experimentelle Manipulation oder der beobachtete biologische Prozess hatten keinerlei Wirkung. In diesem Fall existiert keine systematische Varianz und die Schätzung derselben fluktuiert um den Wert 0. Der F-Bruch ist dann der Quotient aus einem Wert, der um 0 fluktuiert, plus geschätzter Residualvarianz dividiert durch die

geschätzte Residualvarianz. Der resultierende F-Wert wird also nahe dem Wert 1 liegen.

2) Es gibt einen systematischen Einfluss durch die experimentelle Manipulation oder den beobachteten biologischen Prozess. Unter diesen Umständen wird eine systematische Varianz auftreten und die Schätzung derselben einen Wert größer 0 annehmen. Der F-Bruch besteht dann aus geschätzter systematischer Varianz plus geschätzter Residualvarianz dividiert durch die geschätzte Residualvarianz und führt zu einem F-Wert größer als 1. Die Frage ist, ab welcher Größe des F-Wertes die Existenz eines systematischen Einflusses angenommen werden kann. Dazu wird unter Annahme der Nullhypothese eine Verteilung der F-Werte erstellt, die man als F-Verteilung bezeichnet. Anhand dieser Verteilung lässt sich erkennen, wie wahrscheinlich das Auftreten eines empirisch ermittelten F-Wertes unter der Nullhypothese ist. Unterschreitet die Wahrscheinlichkeit des beobachteten F-Wertes eine festgelegte Signifikanzgrenze, so erfolgt die Ablehnung der Nullhypothese und das Vorhandensein eines systematischen Einflusses wird angenommen. Per Konvention liegt die Signifikanzgrenze meist bei 5%.

2.2.6 Der Exakte Test von Fischer (Fischers Exakt-Test)

Der Exakte Test von Fischer wird für Kreuztabellen angewandt, die absolute Häufigkeiten bestimmter Merkmalsausprägungen enthalten. Im Fall einer KEGG-Pathway-Analyse oder einer GO-Analyse waren das die Häufigkeiten, mit der Gene einer Liste einem bestimmten KEGG-Pathway oder einer bestimmten Begriff der Gen-Ontologie zugeordnet wurden. Aus den Zellen dieser Tabelle bildete der Exakte Test von Fischer Zellhäufigkeiten, die bei festen Zeilen- und Spaltensummen entstehen konnten und berechnete die bedingte Wahrscheinlichkeit für diese Zellhäufigkeiten. Bei Zutreffen der Nullhypothese folgen diese Wahrscheinlichkeiten einer hypergeometrischen Verteilung. Die Ablehnung der Nullhypothese erfolgte, sobald eine Kombination von Zellhäufigkeiten das kritische Signifikanzniveau von 0.01 unterschritt.

2.2.7 KEGG-Pathway-Analyse

Analysen von Mikroarray-Experimenten generieren Listen von Genen, die aufgrund biologischer Prozesse differentiell exprimiert wurden. Die KEGG-Pathway-Analyse erlaubte Aussagen darüber, ob in derartigen Listen überproportional oft Gene

enthalten waren, die einem KEGG Pathway angehörten. Diese Pathways waren in der KEGG Pathway Datenbank enthalten, die von den Bioinformatikzentren der Kyoto Universität und dem Human Genome Center der Universität Tokyo zusammengestellt und im Internet unter dem URL <http://www.genome.jp/kegg/> verfügbar gemacht wurden [167,168]. Der Signifikanztest erfolgte mit Hilfe des Exakten Tests von Fischer (Siehe 3.1.6).

2.2.8 GO-Analyse

Die GO-Analyse testete, ob in Genlisten, die in Mikroarray-Experimenten differentiell exprimiert wurden, bestimmte Begriffe der Gen-Ontologie-Kategorien überrepräsentiert waren. Diese Ontologien wurden vom Gene Ontology Consortium [169-171] entwickelt und führten zu einem standardisierten und strukturierten Vokabular, um Eigenschaften und Funktionen von Genen zu beschreiben. Bei Durchführung dieser Arbeit existierten drei Gen-Ontologien: Die „biologischen Prozesse“, in welche Gene involviert waren, „zelluläre Komponenten“, in denen die Genprodukte zu finden waren und die „molekularen Funktionen“, welche von den Genprodukten ausgeübt wurden. In der vorliegenden Arbeit war die Gen-Ontologie für biologische Prozesse von größtem Interesse. Um zu ermitteln, ob eine Liste mehr Gene enthalten hatte, die einem bestimmten biologischen Prozess zuzuordnen waren, als durch Zufall zu erwarten war, wurde der exakte Test von Fischer durchgeführt (Siehe 3.1.6).

2.2.9 Überlebenszeitanalyse

Mit Hilfe der Überlebenszeitanalyse lässt sich die Wahrscheinlichkeit angeben, mit der ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt. In der Onkologie sind die Überlebenszeit des Patienten und die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs die entscheidenden Parameter. Bei der Überlebenszeitanalyse muss am Ende des Beobachtungszeitraumes das Ereignis nicht eingetreten sein; dann wird von einer zensierten Beobachtung gesprochen. Zensierung kann dadurch entstehen, dass der Patient in der Beobachtung verloren geht, also „lost to follow-up“ ist. Eine Zensierung ist auch durch das Eintreten eines konkurrierenden Risikos möglich, wenn z.B. der Patient durch einen Verkehrsunfall verstirbt und nicht an seinem Tumor.

2.2.9.1 Kaplan-Meier Methode

Die Kaplan-Meier Methode wird verwendet, um für jedes Zeitintervall die Wahrscheinlichkeit für das Überleben bzw. die Wahrscheinlichkeit für das rezidivfreie Überleben zu berechnen. Dabei ist entscheidende Idee, dass die Ereignisse die Beobachtungsintervalle definieren, und nicht, dass die Beobachtungsintervalle fest vorgeschrieben sind. Ein neues Zeitintervall wird dadurch definiert, dass ein Patient tumorbedingt verstirbt bzw. dass das Rezidiv auftritt. Für jedes Zeitintervall wird die bedingte Wahrscheinlichkeit berechnet, dass der Patient das Zeitintervall überlebt bzw. rezidivfrei überlebt, falls er schon bis zum Beginn des neuen Zeitintervalls überlebt hat bzw. rezidivfrei überlebt hat. Die Gesamtwahrscheinlichkeit dafür, einen bestimmten Zeitpunkt zu überleben bzw. rezidivfrei zu überleben, lässt sich dann als Produkt der entsprechenden bedingten Wahrscheinlichkeiten darstellen. Über diesen Kaplan-Meier-Plot hinaus werden weitere statistische Verfahren benötigt, um signifikante Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit feststellen zu können.

2.2.9.2 Der Log-Rang-Test

Der Log-Rang-Test ist das Standardverfahren für Gruppenvergleiche in der Überlebenszeitanalyse. Die Idee des Tests ist folgende: Falls die Nullhypothese richtig ist, treten die Ereignisse in zufälliger Reihenfolge unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auf. Ist eine der beiden Gruppen in ihrer Überlebenszeit bzw. in ihrem rezidivfreiem Überleben der anderen überlegen, so werden die Todesfälle bzw. das Auftreten des Rezidivs bei den Patienten dieser Gruppe später erfolgen. Es ergibt sich dabei eine Abweichung zwischen den Todes- bzw. Krankheitsfällen, die tatsächlich beobachtet werden, und jenen, die man bei zufälliger Reihenfolge der Todes- bzw. Krankheitsfälle erwarten kann. Um die Beobachtung mit der Erwartung vergleichen zu können, wird zunächst die Summe der beobachteten Todesfälle bzw. Krankheitsfälle zu den einzelnen Zeitpunkten O_1 und O_2 in den beiden Gruppen 1 und 2 berechnet und anschließend in gleicher Weise die erwartete Anzahl der Ereignisse in den Gruppen 1 bzw. 2, das sind E_1 bzw. E_2 . Zum Abschluss vergleicht man den Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Anzahl der Todes- bzw. Krankheitsfälle gemäß der Log-Rang-Teststatistik:

$$LR = (O_1 - E_1)^{\frac{2}{E_1}} + (O_2 - E_2)^{\frac{2}{E_2}}$$

Diese Größe ist bei hinreichend großer Zahl der Ereignisse annähernd χ^2 verteilt mit 1 Freiheitsgrad. Über die χ^2 -Verteilung lässt sich die Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen der Nullhypothese in Form eines p-Wertes angeben. Diese wird üblicherweise bei einem Signifikanzniveau von 5% verworfen.

2.2.10 Quantitative Real-Time PCR mithilfe des Taqman-Systems

Die Ergebnisse der cDNA-Mikroarray-Experimente wurden durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mithilfe des Taqman-Systems validiert [172]. Dabei erfolgte eine Polymerasekettenreaktion, bei der die Synthese des PCR-Produktes über ein fluoreszenzsignalübermittelndes System detektiert wurde. [173]. Zum Einsatz kamen vom Hersteller vorgefertigte „Assay on Demands“ (Applied Biosystems). Jeder Assay bestand aus einem 2x Mastermix, der zwei bereits getestete Primer für die Amplifikation eines genspezifischen Sequenzabschnittes enthielt. Zusätzlich war im Mastermix eine TaqMan-Fluoreszenzsonde enthalten, die mit FAM-Farbstoff (Reporter) und dem entsprechenden Quencher markiert war. Im ersten Schritt der PCR wurden die spezifischen Primer und die Fluoreszenzsonde an den Matrizenstrang hybridisiert. Die Sonde war am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff markiert. Die Fluoreszenz des Reporters wurde aufgrund der räumlichen Nähe zu einem am 3'-Ende sitzenden Quencher-Farbstoff unterdrückt. Während der DNA-Synthese wurde die Sonde durch die Taq-Polymerase verdrängt und durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität hydrolysiert. Dadurch wurde der Reporter-Farbstoff abgetrennt, die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben und somit ein Fluoreszenzsignal erzeugt.

Die Amplifikationsreaktionen erfolgten in speziellen, für Fluoreszenzmessungen optimierten 384er PCR-Platten. Pro Amplifikationsreaktion wurden 0,5 μ l des jeweiligen Assays mit 5,5 μ l TaqMan Universal PCR Mastermix (ABgene) und 5 μ l der zu untersuchenden cDNA mit einer Konzentration von 0,1 ng/ μ l, eingesetzt. Die cDNA wurde aus derselben Gesamt-RNA hergestellt, die auch für die Mikroarray Hybridisierungen verwendet wurde. Die PCR-Reaktion wurde in einem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection Cyler (Applied Biosystems) durchgeführt. Das benutzte PCR-Programm ist in Tabelle 8 dargestellt. Die freigesetzte Fluoreszenz war der Menge amplifizierter DNA proportional und wurde während der laufenden PCR-Reaktion von einer CCD-Kamera kontinuierlich aufgezeichnet. Von allen Ansätzen wurden jeweils Triplikate durchgeführt, um den Einfluss zufälliger Fehler zu

minimieren. Außerdem wurde für alle Versuche ein Mastermix aus dem TaqMan Universal PCR Mastermix und dem entsprechenden „Assay on Demand“ hergestellt, um für die PCR-Reaktionen möglichst einheitliche Bedingungen zu schaffen. Die cDNA wurde mithilfe eines Pipettierroboters (Biomek) in einer 384er Masterplatte vorgelegt und auf die einzelnen 384er Reaktionsplatten verteilt. Dadurch wurde gewährleistet, dass bei allen Versuchen die gleiche Ausgangskonzentration an cDNA vorlag und somit die Ergebnisse der einzelnen 384er PCR-Platten untereinander vergleichbar waren. Die Ausgangsproben konnten anschließend über den logarithmisch dargestellten Verlauf der PCR miteinander verglichen und das Expressionsniveau der untersuchten Gene bestimmt werden.

Tabelle 8: qRT-PCR Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Schritt:	50 °C	2 min
2. Schritt: Enzymaktivierung	95 °C	15 min
3. Schritt: Denaturierung*	95 °C	15 s
4. Schritt: Anlagerung/DNA-Synthese*	60 °C	1 min

*Die Schritte 3 und 4 wurden in 40 Zyklen wiederholt.

2.2.10.1 Erstellung von Eichgeraden für die qRT-PCR

Der erste Schritt bei der Durchführung der Taqman-PCR bestand darin, Eichgeraden für die benutzten Assay-on-Demands zu erstellen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe (20; 10; 5; 2,5; 1,25 ng cDNA/Reaktion) mit cDNA, die aus Universal Human Reference RNA (Stratagene) synthetisiert worden war, hergestellt und als Matrize für TaqMan-PCRs mit den Assay-on-demands benutzt. Aus dem Verlauf der Polymerasekettenreaktion konnten mittels der SDS-2.1 Software die C_T -Werte ermittelt werden. Diese gaben für jede cDNA-Probe an, bei welcher Zykluszahl ein vorher definiertes Fluoreszenzsignal (Basislinie) erreicht wurde. Die C_T -Werte, welche für die Verdünnungen ermittelt worden waren, wurden gegen die logarithmierte Masse der cDNA aufgetragen und die Regressionsgerade der Datenpunkte bestimmt. Diese stellte die Eichgerade dar, welche die Bestimmung der PCR-Effizienz ermöglichte.

2.2.10.2 Relative Quantifizierung der Genexpression ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Da die PCR-Effizienz der TaqMan-Reaktionen für die Zielgene vergleichbar war mit jener des Housekeeping-Gens GAPDH, konnte die Auswertung mithilfe der so

genannten $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt werden: Dabei wurde zunächst für jede Probe der C_T -Wert des Housekeeping-Gens vom C_T -Wert des zu untersuchenden C_T -Wertes subtrahiert, was den ΔC_T -Wert lieferte. Anschließend wurde das Experiment mit dem niedrigsten ΔC_T -Wert zum kalibrieren benutzt, indem die ΔC_T -Werte aller anderen Proben vom ΔC_T -Wert des Kalibrators abgezogen wurden, wodurch der $\Delta\Delta C_T$ -Wert erhalten wurde. Aus diesem ließ sich das Expressionsniveau relativ zum Kalibrator und normalisiert mit dem Housekeeping-Gen GAPDH berechnen: Dieses errechnete sich aus dem Term $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Ein Expressionsniveau von z.B. 5 bedeutet, dass das untersuchte Gen 5 mal stärker exprimiert wurde als im Kalibrator (also jener Probe, welche die niedrigste Expression dieses Gens zeigte).

3 ERGEBNISSE

Mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie wurden 126 Mammakarzinome analysiert. Dabei wurden cDNA Mikroarrays eingesetzt, die mit der 38 000 Klone umfassenden Kollektion „Human Unigene Set RZPD 3.1“ hergestellt wurden. Auf Grundlage der Qualität hinsichtlich repetitiver Elemente und der bei den Messungen erreichten Fluoreszenz-Intensität wurden 14065 Klone selektiert, mit denen alle nachfolgenden Analysen durchgeführt wurden. Klinische Parameter und Überlebenszeit der Patienten wurden von Pathologen der Medizinischen Universität Graz ermittelt (Tabellen 20, 21 und 22 im tabellarischen Anhang). Mit diesen Informationen konnten Genexpressionsänderungen analysiert werden, die in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus, dem Histologischen Grading des Tumors und der Überexpression des Protoonkogens *ErbB2* im Brustkrebsgewebe aufgetreten sind.

3.1 Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus

3.1.1 Bedeutung der Östrogene für die Brustkrebsforschung

Bei der Entstehung und der Progression des Mammakarzinoms haben Östrogene eine herausragende Bedeutung, da sie eine wachstumsstimulierende Wirkung auf das Drüsengewebe der Brust ausüben, sofern dieses den Östrogenrezeptor exprimiert. Daher ist bei östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen eine endokrine Therapie indiziert, welche die wachstumsstimulierende Wirkung der Östrogene unterbindet. Für die Brustkrebsforschung sind differentiell exprimierte Gene zwischen östrogenrezeptorpositiven und östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen relevant, weil man besser verstehen möchte, welche Gene diesen wachstumsstimulierenden Effekt bewirken.

3.1.2 Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus in der klinischen Praxis.

In der klinischen Praxis wird bei Diagnose eines Mammakarzinoms routinemäßig die Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren ermittelt. Die Bestimmung erfolgt heute fast ausschließlich immunhistologisch an Paraffinschnitten. Nur in Ausnahmefällen kommen andere Methoden wie Enzym-Immuno-Assays oder die biochemische Analyse mittels Radioliganden-Bindungs-Assay zur Anwendung. Die

Expression des Progesteronrezeptors wird gemessen, weil sich das Ansprechen auf eine endokrine Therapie um ca. 15 - 25 % genauer vorhersagen lässt, wenn sowohl der Östrogen- als auch der Progesteronrezeptorstatus bestimmt werden [174]. Für diese Beobachtung existieren zwei Erklärungen: Einerseits wird angenommen, dass der Progesteronrezeptor exprimiert wird, sofern der Östrogenrezeptor als Transkriptionsfaktor aktiv ist. Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptoraktivität würden also auf ein funktionell intaktes Rezeptor- und Aktivierungssystem hindeuten [175]. Andererseits könnte die Berücksichtigung beider Hormonrezeptoren eine genauere Diagnose ermöglichen, da die immunhistologische Bestimmung vom verwendeten Protokoll zur Färbung der Paraffinschnitte abhängt und in den meisten Fällen dazu tendiert, falsch negative Ergebnisse zu generieren [176]. Im diesem Fall könnte die Berücksichtigung beider Hormonrezeptoren die Anzahl der Fehldiagnosen verringern, wenn das Mammakarzinom bereits dann als hormonrezeptorpositiv betrachtet wird, sofern zumindest eine der beiden durchgeführten Untersuchungen ein positives Ergebnis erbrachte.

3.1.3 Definition des Hormonrezeptorstatus in dieser Arbeit

Von 121 Brustkrebspatienten war der Status des Östrogenrezeptors bekannt: Auf Grundlage der Immunhistochemie wurden 72 Patienten als östrogenrezeptorpositiv und 49 Patienten als östrogenrezeptornegativ definiert. Der Progesteronrezeptorstatus wurde ebenfalls immunhistochemisch bei 122 Patienten ermittelt: 67 Patienten waren progesteronrezeptorpositiv, während 55 Patienten keine Expression des Progesteronrezeptors zeigten. Die Übereinstimmung zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus lag bei 86%. Zunächst musste die Frage geklärt werden, ob die Daten zum Östrogenrezeptorstatus oder eine Kombination der Daten beider Hormonrezeptoren besser dazu geeignet waren, den Status des Östrogenrezeptors wiederzugeben. Dazu wurden t-Tests mit verschiedenen Gruppeneinteilungen durchgeführt und der p-Wert für das Östrogenrezeptorgen auf Grundlage der Mikroarraydaten ermittelt (Tabelle 9). Die niedrigsten p-Werte erhielt man bei einer Gruppeneinteilung, in der Patienten als hormonrezeptorpositiv aufgefasst wurden, sofern mindestens ein positives Testergebnis für die beiden untersuchten Rezeptoren erhalten wurde. Bereits in der Vergangenheit konnte beobachtet werden, dass die immunhistochemische Bestimmung, durchgeführt an der Medizinischen Universität Graz, eher die Tendenz zu falsch Negativen als zu

falsch Positiven hatte [177]. Daher wurde in dieser Arbeit der Status eines Patienten als hormonrezeptorpositiv aufgefasst, wenn entweder der Östrogenrezeptorstatus (12 Patienten) oder der Progesteronrezeptorstatus (6 Patienten) oder der Status beider Rezeptoren (60 Patienten) positiv war. Insgesamt war damit für 121 Patienten der Status des Hormonrezeptors bekannt: 78 Patienten waren hormonrezeptorpositiv und 43 Patienten hormonrezeptornegativ. Alle nachfolgenden Analysen wurden mit dieser Gruppeneinteilung durchgeführt.

Tabelle 9: Statistische Tests zum Status der Hormonrezeptoren

Gruppeneinteilung nach	ER p-Wert
Östrogenrezeptorstatus	0.000000046
Progesteronrezeptorstatus	0.000043
Hormonrezeptorstatus (positiv, wenn mindestens ein Rezeptor positiv ist)	0.0000000057
Hormonrezeptorstatus (positiv, wenn beide Rezeptoren positiv sind)	0.00033

3.1.4 Überlebenszeitanalyse Hormonrezeptoren

Neben der Indikation für eine endokrine Therapie liefert der Status des Östrogenrezeptors auch prognostische Information, da Patienten mit östrogenrezeptorpositivem Mammakarzinom eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, die Erkrankung zu überleben als Patienten, deren Brustkrebs keinen Östrogenrezeptor exprimiert [178,179]. Die schlechtere Prognose für Patienten mit östrogenrezeptornegativem Brustkrebs kann zumindest teilweise durch fehlende Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention erklärt werden. Abbildung 3 zeigt eine Überlebenszeitanalyse der Patienten dieser Arbeit abhängig vom Hormonrezeptorstatus. 78 Patienten mit positivem Hormonrezeptorstatus hatten eine höhere Wahrscheinlichkeit, den Brustkrebs zu überleben, als 43 Patienten ohne Hormonrezeptorexpression. Ein Log-Rank-Test zeigte, dass dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,012 signifikant war.

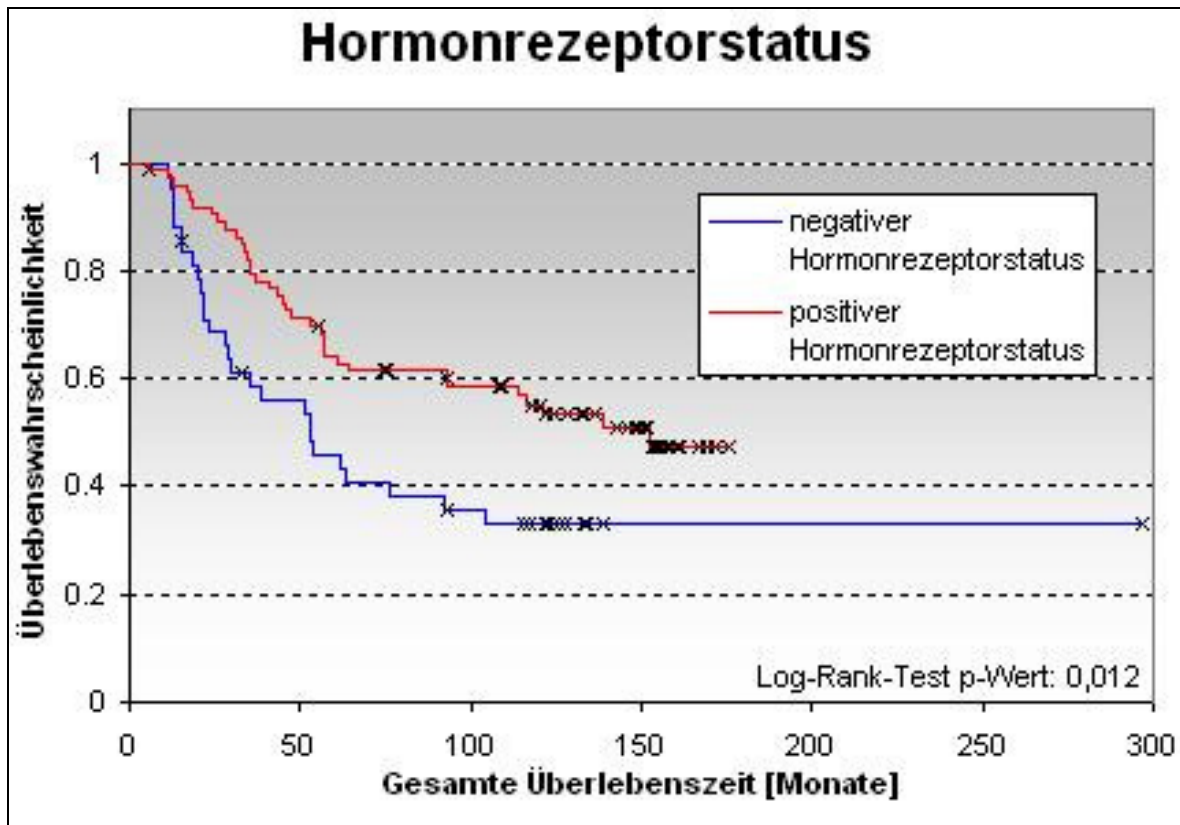


Abbildung.3: Kaplan-Meyer-Plot Status der Hormonrezeptoren

Der Kaplan-Meyer-Plot stellt die Wahrscheinlichkeit für das Überleben der Patienten abhängig vom Hormonrezeptorstatus dar. Die rote Linie zeigt 78 Patienten mit hormonrezeptorpositivem Brustkrebs, während die blaue Linie 43 Patienten darstellt, deren Mammakarzinome keine Hormonrezeptoren exprimierten. Zensierung der Daten wird durch Kreuze dargestellt. Man erkennt, dass Patienten mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom eine höhere Wahrscheinlichkeit hatten, die Erkrankung zu überleben als Patienten deren Brustkrebs keine Hormonrezeptoren exprimierten. Dieser Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit war mit einem p-Wert von 0,012 bei Durchführung eines Log-Rank-Tests statistisch signifikant.

3.1.5 SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus

Um Gene zu finden, die zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen differentiell exprimiert waren, wurde mit dem Programm SAM (Significance Analysis of Microarrays) ein statistischer Test durchgeführt (Abb.4). SAM ist ein modifizierter t-Test für Mikroarrays, der eine etwas robustere Teststatistik als der konventionelle t-Test benutzt und die Verteilung der Teststatistik bei Zutreffen der Nullhypothese durch Permutationen ermittelt. Beim üblichen Signifikanzniveau von 5% falsch Positiven wurden 1273 differentiell exprimierte Gene gefunden. Davon wurden 666 Gene stärker in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen exprimiert, während 607 Gene stärkere Expression in hormonrezeptornegativem Brustkrebs zeigten.

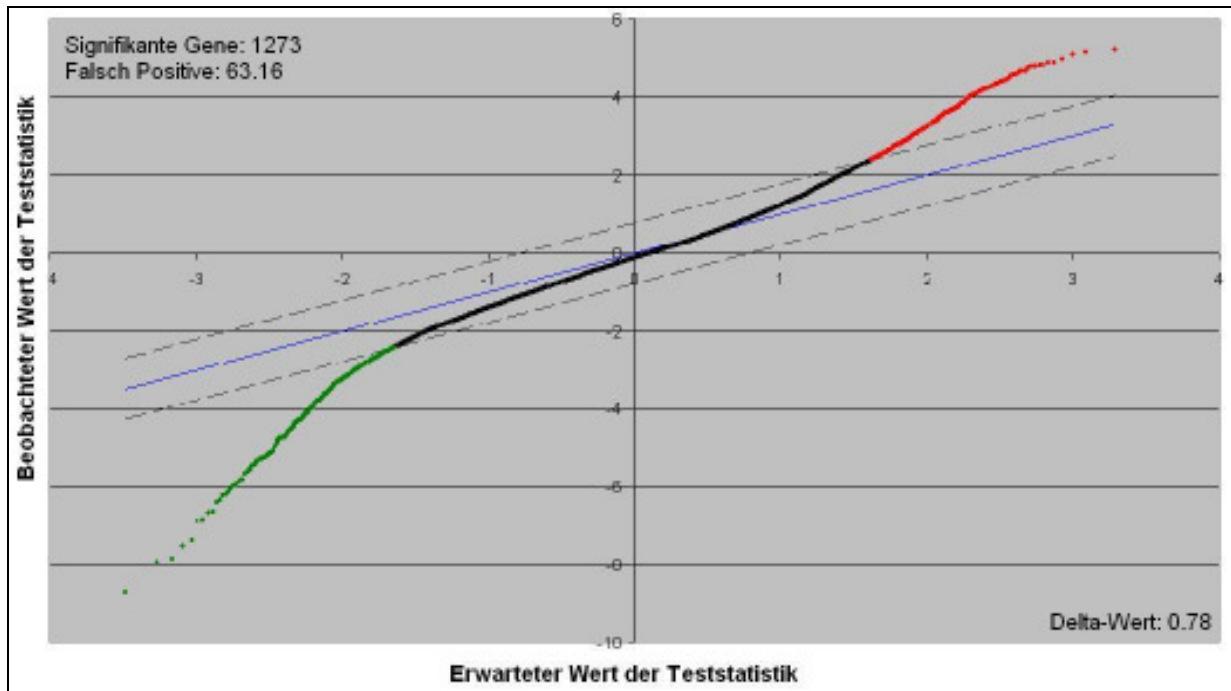


Abbildung 4: SAM-Plot der Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus

Die Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus identifizierte Gene, die zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen differenziell exprimiert wurden. Auf der y-Achse sind SAM-Scores jener Teststatistik aufgetragen, mit der Genexpressionsunterschiede zwischen 78 hormonrezeptorpositiven und 43 hormonrezeptornegativen Brustkrebsgeweben untersucht wurden. Die x-Achse enthält SAM-Scores, welche nach 1000 Permutationen erhalten wurden. Eine Gegenüberstellung zeigt, dass die Teststatistik, welche hormonrezeptorpositive mit hormonrezeptornegative Mammakarzinome verglichen hat, zu deutlich größeren SAM-Scores führte als bei Zutreffen der Nullhypothese zu erwarten war. Bei einem Signifikanzniveau, das 5% falsch Positive toleriert, waren 1273 Gene differenziell exprimiert. 666 Gene, die in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen stärker exprimiert wurden, sind grün markiert, während 607 Gene, die in hormonrezeptornegativen Brustkrebsgewebe stärker exprimiert waren, rot dargestellt sind.

In Tabelle 10 sind die 20 signifikantesten Gene der SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus aufgelistet. Bei oberflächlicher Betrachtung scheint mit dem Ergebnis der Analyse alles zu stimmen: Z.B. ist das Gen für den Östrogenrezeptor selbst am signifikantesten mit dem Hormonrezeptorstatus assoziiert. Außerdem wurde NAT1 auch in anderen Studien als differenziell exprimiert bezüglich des Hormonrezeptorstatus beschrieben [152,159]. Dennoch bestanden Zweifel an der Richtigkeit des Ergebnis. Eine genauere Analyse zeigte nämlich, dass zahlreiche Gene in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen stärker exprimiert waren, die charakteristisch für Zellen des Immunsystems sind, z.B. *CD48*, *NK4*, die T-

Zellrezeptorgene *TCRA*, *TCRD*, die Immunglobulingene *IgLL1*, *IGHG3*, *IGLC2* und der B-Zell-Marker *Oct2*.

Tabelle 10: Differenziell exprimierte Gene bezüglich des Hormonrezeptorstatus

RZPD-ID	Unigene-ID	Gen-Symbol	SAM-Score	q-Wert (%)
Gene, die in hormonrezeptorpositivem Brustkrebs stärker exprimiert wurden:				
IMAGp998C181779	Hs.208124	ESR1	-8.72	0.23
IMAGp998O19218	Hs.480819	KIAA0882	-7.93	0.23
IMAGp998N105395	Hs.100686	BCMP11	-7.84	0.23
IMAGp998H22372	Hs.155956	NAT1	-7.53	0.23
IMAGp998K07310	Hs.336768	ABAT	-7.37	0.23
IMAGp998N0172	Hs.182215	ARL3	-6.68	0.23
IMAGp998P02236	Hs.532082	IL6ST	-6.63	0.23
IMAGp998E241205	Hs.32405	n.a.	-6.35	0.23
IMAGp998M13965	Hs.373952	CAMTA2	-6.23	0.23
IMAGp998J09416	Hs.482976	LOC90355	-6.18	0.23
Gene, die in hormonrezeptorpositivem Brustkrebs schwächer exprimiert wurden:				
IMAGp998D11523	Hs.160786	ASS	5.19	0.23
IMAGp998K245775	Hs.304533	k.A.	5.15	0.23
IMAGp998F20823	Hs.438064	FN5	4.96	0.23
RZPDp1096C128D	Hs.46578	DOCK10	4.89	0.23
IMAGp998E14244	Hs.517622	UNC84B	4.87	0.23
RZPDp202E097D	Hs.502	TAP2	4.81	0.23
RZPDp202B062D	Hs.115099	APOL4	4.80	0.23
RZPDp202C086D	Hs.192103	TRIM44	4.78	0.23
RZPDp202F011D	Hs.401745	TNFRSF10A	4.77	0.23
IMAGp998F03206	Hs.471405	TTL4	4.66	0.23

3.1.6 Hormonrezeptorstatus und Infiltration

Einige Brustkrebsstudien zeigten, dass die Infiltration mit Lymphozyten bei östrogenrezeptornegativen Patienten häufiger auftrat als bei Patienten mit positivem Östrogenrezeptorstatus [180-182]. Die starke Expression von T- und B-zellspezifischen Genen, welche nach Durchführung der SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus beobachtet wurde, deutete darauf hin, dass auch bei den Patienten dieser Arbeit ein bevorzugtes Auftreten der lymphozytären Infiltration in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen aufgetreten sein könnte. Für die Anwendung eines statistischen Tests konnte dieser Umstand Probleme bereiten: Ein gehäuftes Auftreten der lymphozytären Infiltration in der östrogenrezeptornegativen Gruppe würde zu einer systematischen Messabweichung führen, welche die Ergebnisse verfälscht. Daher musste überprüft werden, ob eine derartige systematische Messabweichung vorlag.

3.1.6.1 Systematische Messabweichung aufgrund lymphozytärer Infiltration

Zunächst wurden jene Gene ermittelt, die mit der lymphozytären Infiltration assoziiert waren. Dieser Ansatz war möglich, weil Pathologen der Medizinischen Universität

Graz das Ausmaß der Infiltration in 70 Brustkrebsgeweben bestimmt und mithilfe einer Werteskala von 0 (keine Infiltration) bis 3 (starke Infiltration) quantifiziert hatten. Mithilfe einer SAM-Analyse für stetige Werte („Quantitative Response“) wurden 788 Gene gefunden, die mit dem Ausmaß der Infiltration korrelierten (Abb.5a). Um zu überprüfen, ob die SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus von Abb.4 durch das Auftreten der lymphozytischen Infiltration beeinflusst war, wurde die Schnittmenge aus den Genlisten beider Tests hergestellt und mithilfe eines Venn-Diagramms dargestellt (Abb.5b). Die Schnittmenge war mit 348 Genen sehr groß. Daher war es wahrscheinlich, dass die SAM-Analyse bezüglich lymphozytärer Infiltration durch das bevorzugte Auftreten einer lymphozytären Infiltration in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen beeinflusst wurde.

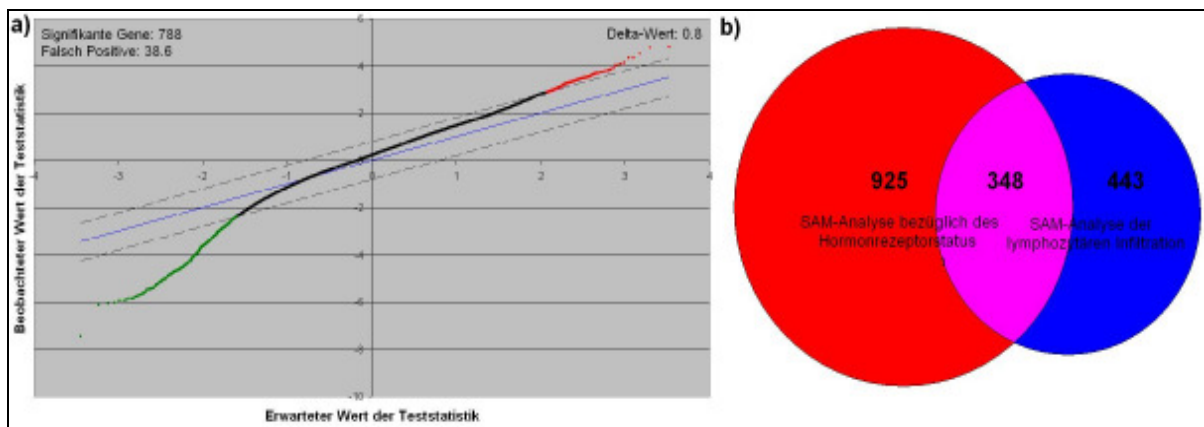


Abbildung 5: SAM-Plot der Analyse bezüglich lymphozytärer Infiltration

a) Pathologen haben das Ausmaß der Infiltration in 70 Brustkrebsgeweben bestimmt und mithilfe einer Werteskala von 0 (keine lymphozytäre Infiltration) bis 3 (starke lymphozytäre Infiltration) quantifiziert. Die Teststatistik wurde auf der Ordinate aufgetragen und errechnete den linearen Regressionskoeffizienten dieser Werte dividiert durch den Standardfehler des Koeffizienten. Diese wurde auf der x-Achse einer empirischen Verteilung der Teststatistik gegenübergestellt, die durch 1000 Permutationen ermittelt wurde. Bei einem Signifikanzniveau, das 5% falsch Positive zulässt, war die Expression von 788 Genen mit der lymphozytären Infiltration assoziiert: 625 Gene (grün markiert) wurden bei Auftreten einer lymphozytären Infiltration stärker exprimiert, während die Expression von 163 Genen (rot markiert) schwächer wurde, wenn eine lymphozytäre Infiltration vorlag. b) Venn-Diagramm, das die Schnittmenge der Ergebnisse aus der SAM-Analysen bezüglich Hormonrezeptorstatus und bezüglich lymphozytärer Infiltration zeigt. Die Fläche der Kreise entspricht im Größenverhältnis der Anzahl differentiell exprimierter Gene: 1273 Gene bezüglich Hormonrezeptorstatus und 788 Gene bezüglich lymphozytärer Infiltration. Die Schnittmenge besteht aus 348 Genen.

3.1.6.2 Das Ausmaß der lymphozytären Infiltration

Da die Möglichkeit bestand, dass die SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus von einer systematischen Messabweichung betroffen war,

wurde das Auftreten der lymphozytären Infiltration genauer untersucht. Dazu wurden einerseits die pathologischen Daten, welche für 70 Brustkrebsproben vorlagen, berücksichtigt (Abb.6a). Andererseits wurde die Expression von Markergenen herangezogen: Die Expression des T-Zell-Rezeptors wurde als Marker für die Anwesenheit von T-Zellen benutzt (Abb.6b), während die Expression des Immunglobulin Lambda als Gradmesser für die Anwesenheit von B-Zellen diente (Abb.6c).

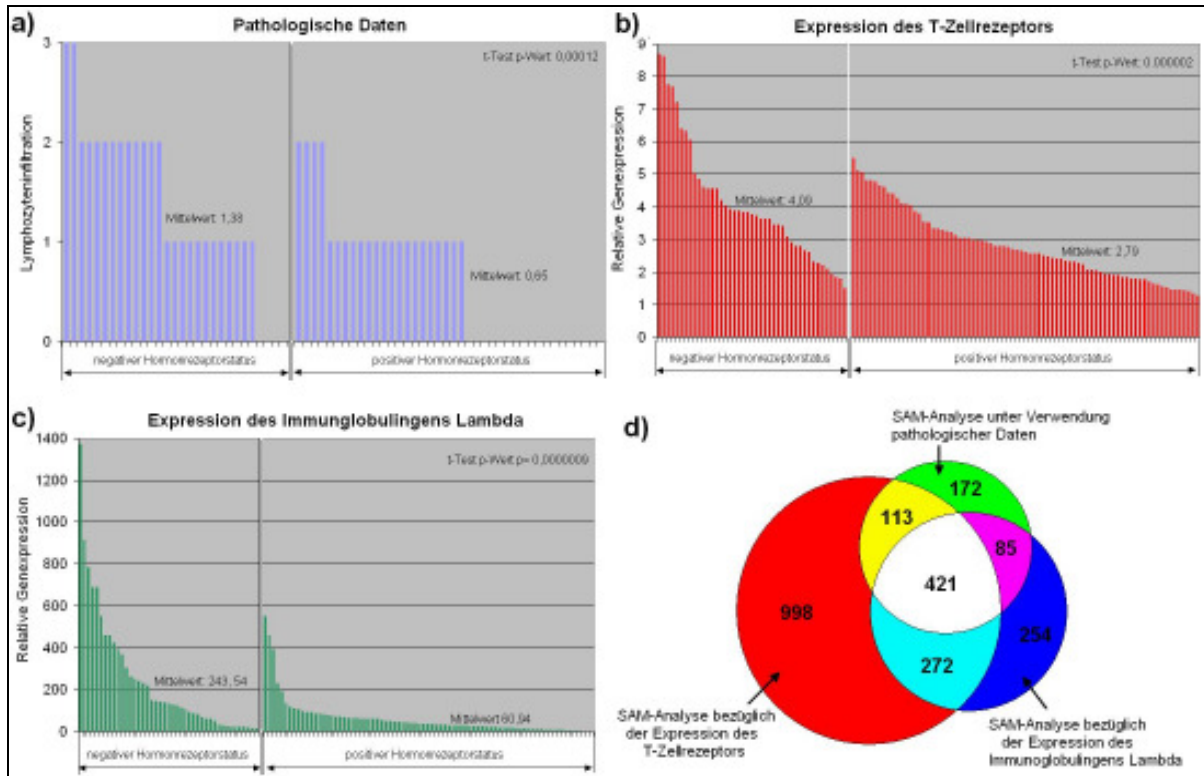


Abbildung 6: Auftreten der lymphozytären Infiltration in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus

6a) Die Abbildung zeigt auf Grundlage pathologischer Daten die Infiltrationswerte für 29 Mammakarzinome mit negativem und 40 Brustkrebsgewebe mit positivem Hormonrezeptorstatus. Die lymphozytische Infiltration war in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen stärker ausgeprägt als in hormonrezeptorpositivem Brustkrebs. 6b) Relative Genexpression des T-Zell-Rezeptors als Indikator für die Anwesenheit von T-Zellen in 43 hormonrezeptornegativen und 78 hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen. T-Zellen waren häufiger in Mammakarzinomen anwesend, die keinen Hormonrezeptor exprimierten. 6c) Relative Genexpression des Immunglobulins Lambda als Indikator für die Anwesenheit von B-Zellen in 43 hormonrezeptornegativen und 78 hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen. Auch in diesem Fall war deutlich zu erkennen, dass B-Zellen überwiegend in Geweben hormonrezeptornegativer Mammakarzinome auftraten. 6d) Drei SAM-Analysen für stetige Werte („Quantitative Response“) wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: Expression des Immunglobulins Lambda, Expression des T-Zell-Rezeptors und mit den von Pathologen ermittelten Werten für die lymphozytäre Infiltration. Die drei Genlisten überschneiden sich stark. Daraus konnte man schließen, dass die Expression des T-Zell-Rezeptors und des B-Zellrezeptors gute Indikatoren für die Anwesenheit von T-Zellen oder B-Zellen darstellten.

Alle drei Indikatoren zeigten, dass die lymphozytäre Infiltration in Patienten mit negativem Hormonrezeptorstatus häufiger und auch stärker auftrat als in hormonrezeptorpositiven Patienten.

Dass die Expressionswerte für den T-Zell-Rezeptor und das Immunglobulin Lambda die Anwesenheit von T- und B-Zellen anzeigen, wird in Abb.6d gezeigt. Eine SAM-Analyse für stetige Werte („Quantitative Response“) fand 1804 Gene, die mit der Expression des T-Zell-Rezeptors und 1032 Gene, die mit der Expression des Immunglobulins Lambda assoziiert waren. Diese Gene überschneiden sich stark mit jenen 791 Genen, die von der SAM-Analyse unter Verwendung der pathologischen Daten gefunden wurden. Diese beruhte auf einer Quantifizierung des lymphozytären Infiltrates durch Pathologen, während die SAM-Analysen bezüglich Expression des T-Zell-Rezeptors und des Immunglobulins Lambda die Bestandteile des Infiltrates, also T- und B-Zellen anzeigen. Die Überschneidung der Testergebnisse zeigte also, dass bei Durchführung einer SAM-Analyse ähnliche Ergebnisse erhalten wurden, wenn Beobachtungen der Pathologen herangezogen wurden oder Markergene, welche die Anwesenheit des lymphozytischen Infiltrates anzeigen.

3.1.7 Dreifaktorielle Varianzanalyse

3.1.7.1 Einführung in die dreifaktorielle Varianzanalyse

Die Ergebnisse des Kapitels 4.1.6 zeigten, dass die lymphozytäre Infiltration bevorzugt in hormonrezeptornegativen Brustkrebsgeweben auftrat. Eine systematische Messabweichung war die Folge. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass man die Anwesenheit von T- und B-Zellen mithilfe der Expressionswerte für T-Zell-Rezeptor- und Immunglobulin Lambda-Gene messen kann. Mit dieser Information wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, die Hormonrezeptorstatus, Anwesenheit von T-Zellen und Anwesenheit von B-Zellen berücksichtigte und so den Einfluss ermittelte, denn diese drei Faktoren auf die Expressionswerte hatte.

3.1.7.2 Ergebnis der dreifaktoriellen Varianzanalyse

Eine Varianzanalyse mit folgenden Faktoren wurde durchgeführt: Hormonrezeptorstatus, Expression des T-Zell-Rezeptors und Expression des Immunglobulins Lambda. Nach Durchführung der Analyse wurden für jedes Gen und

für jeden Faktor p-Werte erhalten, welche die Wahrscheinlichkeit angaben, die gemessenen Expressionswerte bei Zutreffen der Nullhypothese zu erhalten. Die Korrektur für Multiples Testen erfolgte mithilfe des Algorithmus von Benjamini und Hochberg. Bei einem p-Wert kleiner als 0.01 wurden Gene als differentiell exprimiert angesehen. Waren die p-Werte bei mehr als einem Faktor signifikant, wurde das Gen jenem Faktor zugeordnet, der den niedrigsten p-Wert hatte. Auf diese Art und Weise wurden 49 Gene gefunden, die aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert waren (Tab.11). Die überwiegende Mehrzahl der Gene war jedoch auf die Anwesenheit von T-Zellen (2013 Gene) und B-Zellen (315 Gene) zurückzuführen (Tab.11).

Tabelle 11: Ergebnis der dreifaktoriellen Varianzanalyse

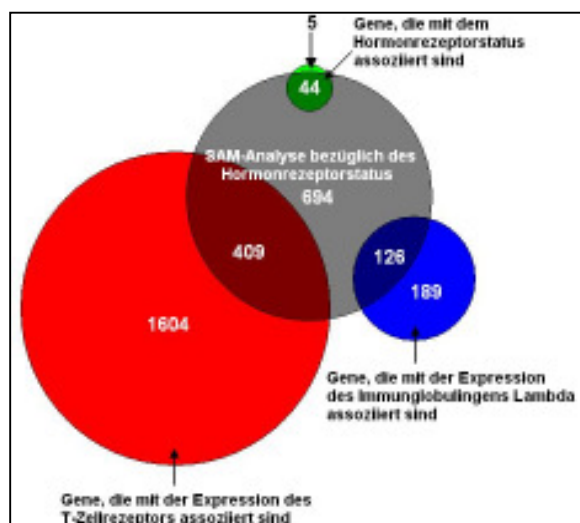
Faktor	Indikator für	Anzahl der Gene
Hormonrezeptorstatus	Hormonrezeptorstatus	49
Expression des T-Zell-Rezeptors	Anwesenheit von T-Zellen	2013
Expression des Immunglobulins Lambda	Anwesenheit von B-Zellen	315

3.1.7.3 Varianzanalyse und SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus

Das Ergebnis der dreifaktoriellen Varianzanalyse zeigte, dass die Anwesenheit von T- und B-Zellen einen massiven Einfluss auf die Genexpressionswerte ausübte, während die Anzahl der Gene, die nur aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert waren, vergleichsweise gering war. Es stellte sich also die Frage, ob der Großteil jener Gene, die bei einem direkten Vergleich zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Brustkrebsgeweben differentiell exprimiert erschienen, in Wirklichkeit nur lymphozitenspezifische Gene waren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden in einem Venn-Diagramm (Abb. 7) jene 1273 Gene gezeigt, die bei einem direkten Vergleich der beiden Gruppen differentiell exprimiert erschienen (SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus). Zusätzlich wird die Überschneidung mit den Listen der Gene dargestellt, die gemäß der Varianzanalyse mit dem Hormonrezeptorstatus, der Expression des T-Zell-Rezeptors und der Expression des Immunglobulins Lambda assoziiert waren. Von 49 Genen, welche die Varianzanalyse aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert fand, waren 44 auch in der SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus enthalten. Das entsprach der Erwartung: Wenn diese 49 Gene tatsächlich nur aufgrund des Hormonrezeptorstatus

differentiell exprimiert wurden, dann sollten alle oder zumindest die meisten dieser Gene auch in einer SAM-Analyse detektiert werden, die hormonrezeptorpositive und hormonrezeptornegative Mammakarzinome direkt miteinander verglich, unabhängig vom Vorliegen einer systematischen Messabweichung. Zusätzlich konnte man aber beobachten, dass mit der SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptors 409 bzw. 126 Gene überschritten, die gemäß der Varianzanalyse eher durch die Expression des T-Zell-Rezeptors- und des Immunglobulins Lambda erklärt werden konnten, also auf die Anwesenheit von T- und B-Zellen zurückzuführen waren. Daraus konnte man schließen, dass der größte Teil der Gene, die bei einem statistischen Test zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Tumoren als differentiell exprimiert erschienen, Produkte einer systematischen Messabweichung waren.

Abbildung 7: Überschneidungen zwischen dreifaktorieller Varianzanalyse und SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus.



Im Zentrum des Venn-Diagramms sind 1273 Gene dargestellt, die bei einem Vergleich zwischen hormonrezeptorpositiven und -negativen Mammakarzinomen differentiell exprimiert waren (SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus). Außerdem wird die Überschneidung mit den Listen jener Gene dargestellt, die gemäß der Varianzanalyse mit dem Hormonrezeptorstatus, der Expression des T-Zell-Rezeptors und der Expression des Immunglobulin Lambda assoziiert waren. Ein großer Teil jener Gene, die bei der SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert erschienen, waren auf die Anwesenheit von T- und B-Zellen zurückzuführen.

3.1.7.4 Differentiell exprimierte Gene bezüglich Hormonrezeptorstatus

Es sollten jene Gene gefunden werden, die zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen differentiell exprimiert waren. Um größtmögliche Sicherheit zu erlangen, wurden jene 44 Gene, die sowohl von der SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstus als auch von der dreifaktoriellen Varianzanalyse differentiell exprimiert gefunden wurden, als die gesuchten Gene betrachtet. Diese Gene erschienen einerseits bei einem direkten Vergleich zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen

differentiell exprimiert. Andererseits wurden diese auch in einer dreifaktoriellen Varianzanalyse, welche die systematische Messabweichung beseitigte, als differentiell exprimiert angesehen. Tabelle 12 listet die 44 differentiell exprimierten Gene bezüglich des Hormonrezeptorstaus auf, gemeinsam mit den p-Werten aus der dreifaktoriellen Varianzanalyse.

Tabelle 12: Differentiell exprimierte Gene bezüglich des Hormonrezeptorstatus

RZPD-ID	Unigene-ID	Gen-Symbol	p-Wert
Gene, die in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen stärker exprimiert wurden:			
IMAGp998C181779	Hs.208124	ESR1	0.0000002
IMAGp998F21211	Hs.437638	XBP1	0.000014
IMAGp998K07310	Hs.336768	ABAT	0.00019
IMAGp998N225802	Hs.163484	FOXA1	0.00024
IMAGp998C21193	Hs.448520	SLC7A2	0.00024
IMAGp998N105395	Hs.100686	BCMP11	0.00024
IMAGp998M06229	Hs.390738	FLJ20366	0.00049
IMAGp998O19218	Hs.480819	KIAA0882	0.00075
IMAGp998H22372	Hs.155956	NAT1	0.00079
IMAGp998M13965	Hs.373952, Hs.351461	CAMTA2, LOC90557	0.001
IMAGp998I125607	Hs.155956	NAT1	0.001
IMAGp998H22207	Hs.515258	GDF15	0.0021
IMAGp998G22394	Hs.267659	VAV3	0.0044
IMAGp998B11728	Hs.132660	KIAA1467	0.0051
IMAGp998D191818	Hs.8036	UNQ501	0.0052
IMAGp998F065325	Hs.210995	CA12	0.0053
IMAGp998A09154	Hs.519162	BTG2	0.0075
IMAGp998F155601	Hs.473695	CLIC6	0.0084
IMAGp998H04781	Hs.522665	MAGED2	0.0084
IMAGp998J02547	Hs.502730	SYT7	0.0084
IMAGp998D053503	Hs.158992	FLJ45983	0.0084
IMAGp998H224155	Hs.130239	C6orf97	0.0087
RZPDp201D026D	Hs.176227	FLJ11155	0.0097
Gene, die in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen stärker exprimiert wurden:			
IMAGp998F20823	Hs.438064	FN5	0.0005
IMAGp998L17531	Hs.473420	BTG3	0.00075
IMAGp998N10870	Hs.371060, Hs.128846	PTPNS1	0.00079
IMAGp998K06152	Hs.512451, Hs.473583	NSEP1	0.00082
IMAGp998E14244	Hs.517622	UNC84B	0.00084
IMAGp998O06532	Hs.406156	DOCK7	0.0009
IMAGp998I025671	Hs.26225	GABRP	0.001
RZPDp1096H1113D	Hs.26225	GABRP	0.001
IMAGp998N191113	Hs.26770	FABP7	0.001
IMAGp998C1773	Hs.507978	k.A.	0.0025
IMAGp998C0587	Hs.488293	EGFR	0.0036
IMAGp998N164494	Hs.458304	ROPN1	0.0041
IMAGp998L051781	Hs.408767	CRYAB	0.0043
IMAGp998A1988	Hs.492618	EXT1	0.0046
IMAGp998I04528	Hs.75514	NP	0.0051
IMAGp998I18591	Hs.527119	PDE7A	0.0068
IMAGp998D09564	Hs.288954	MGC33365	0.0075
IMAGp998C15664	Hs.490273	CREB3L2	0.0075
IMAGp998N02421	Hs.520259	OSBPL3	0.0075
RZPDp201G0823D	Hs.371889	ATP1A1	0.0087
IMAGp998M15175	Hs.520494	FLJ14525	0.0097

3.1.8 GO-Analyse

3.1.8.1 Fragestellung

Für die Brustkrebsforschung ist der Östrogenrezeptor interessant, da er eine wachstumsstimulierende Wirkung auf Brust- und Brustkrebsgewebe ausübt. Nun wurden 44 Gene gefunden, die zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen differentiell exprimiert wurden. Daher stellten sich zwei Fragen: Kann gezeigt werden, dass überdurchschnittlich viele Gene an der Regulation des Wachstums beteiligt sind? Und vor allem: Welche Gene sind an der Regulation des Wachstums beteiligt?

3.1.8.2 Einführung in die GO-Analyse

Mithilfe einer GO-Analyse wurden diese Fragen beantwortet. Dabei wurde untersucht, ob GO-Kategorien überrepräsentiert waren, die mit Wachstum und Zellteilung zu tun hatten. Dazu wurde die Liste differentiell exprimierter Gene mit all jenen Genen verglichen, mit denen die Genexpressionsmessungen durchgeführt wurden und die zusätzlich bekannte Gennamen und eindeutige Unigene-IDs hatten. Diese Bedingungen waren für 9030 Gene erfüllt, die für alle nachfolgenden GO- und KEGG-Analysen als Referenz benutzt wurden. Ob GO-Kategorien der untersuchten Genliste statistisch signifikant überrepräsentiert waren, wurde mithilfe des Fischers-Exakt-Test ermittelt. Bei einem p-Wert kleiner als 0,01 wurde die Nullhypothese verworfen und die GO-Kategorie als überrepräsentiert angesehen. Mittels sogenannter GO-Bäume wurden überrepräsentierte Kategorien in der Hierarchie der Gen-Ontologie dargestellt.

3.1.8.3 Ergebnis der GO-Analyse

In die GO-Analyse ging eine Genliste von 44 differentiell exprimierten Genen ein, die Referenz umfasste 9030 Gene. 11 GO-Kategorien mit vier Ästen am GO-Baum waren überrepräsentiert. (Abb.8, Tabelle 13).

Ergebnisse

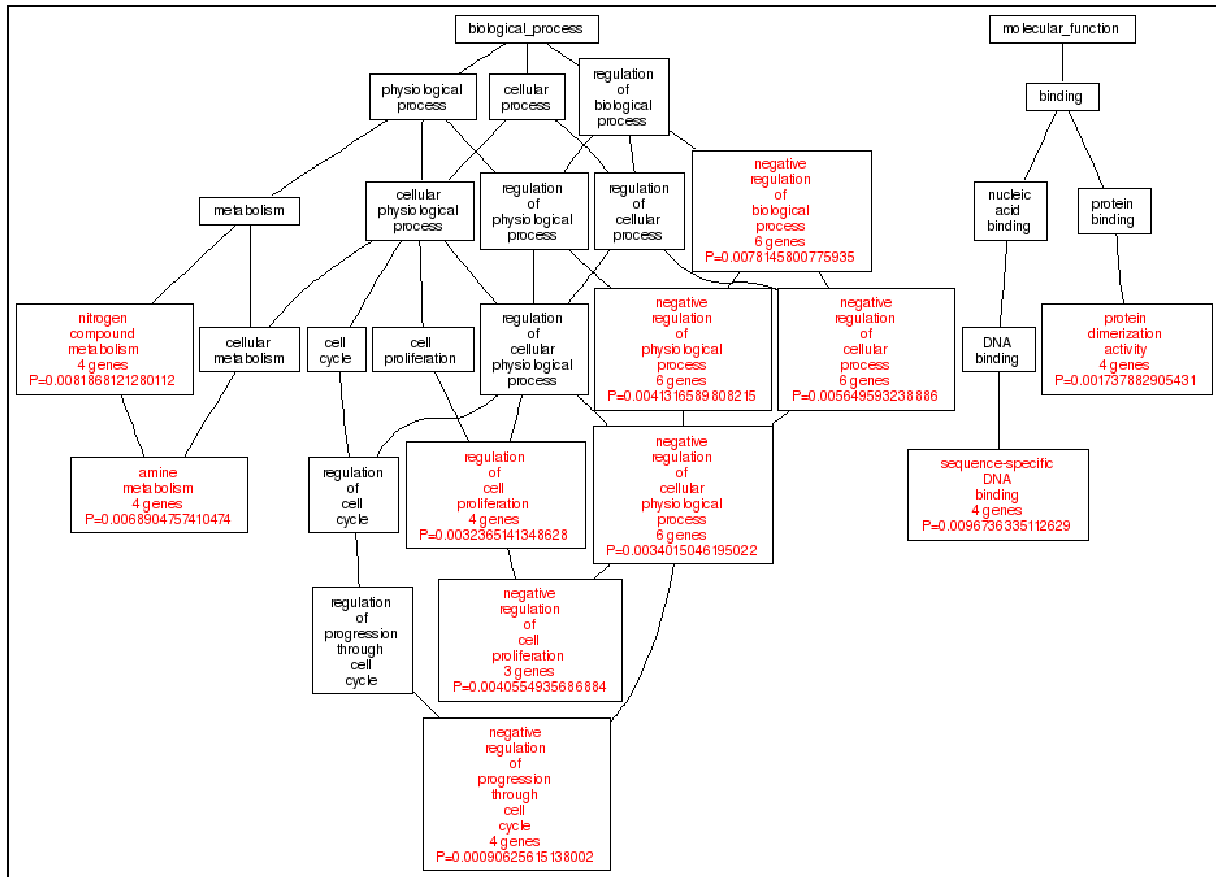


Abbildung 8: GO-Baum Hormonrezeptorstatus

44 Gene waren zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen differenziell exprimiert. Eine GO-Analyse dieser Gene ergab 11 überrepräsentierte GO-Kategorien. Erster Ast des GO-Baums: „Negative Regulation eines biologischen Prozesses“, „Negative Regulation eines zellulären Prozesses“, „Negative Regulation eines physiologischen Prozesses“, „Negative Regulation eines zellulären physiologischen Prozesses“, „Negative Regulation des Wachstums über den Zellzyklus“ (4 Gene: *BTG3*, *EGFR*, *ESR1* und *EXT1*). Zweiter Ast des GO-Baum: „Regulation der Zellproliferation“ (4 Gene: *BTG3*, *EGFR*, *FABP7* und *BTG2*), „Negative Regulation der Zellproliferation“ (3 Gene: *BTG3*, *FABP7*, *BTG2*). Dritter Ast des GO-Baums: „Metabolismus von Stickstoffverbindungen“, „Amin-Metabolismus“. Außerdem waren die GO-Kategorien „Sequenzspezifische DNA-Bindungsgene“ und „Protein-Dimerisierungsaktivität“ überrepräsentiert.

Das Auftreten der überrepräsentierten GO-Kategorien „Negative Regulation des Wachstums über den Zellzyklus“, „Regulation der Zellproliferation“ und „Negative Regulation der Zellproliferation“ mit den Genen *BTG3*, *BTG2*, *EGFR*, *ESR1*, *EXT1* und *FABP7* bestätigte die Annahme, dass unter den 44 differenziell exprimierten Genen zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen überdurchschnittlich viele Gene das Zellwachstums regulierten. Allerdings sind GO-Analysen vorsichtig zu bewerten, insbesondere da die Anzahl von 44 Genen für eine derartige Methode eher gering war.

Tabelle 13: GO-Analyse Hormonrezeptorstatus

GO Kategorie	Beobachtete Anzahl der Gene	p-Wert
Regulation der Zellproliferation	4	0.00574
BTG2 (Hs.519162)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
EGFR (Hs.488293)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
BTG3 (Hs.473420)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
FABP7 (Hs.26770)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
Negative Regulation der Zellproliferation	3	0.00531
BTG2 (Hs.519162)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
BTG3 (Hs.473420)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
FABP7 (Hs.26770)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
Negative Regulation des Wachstums über den Zellzyklus	4	0.00327
EGFR (Hs.488293)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
ESR1 (Hs.208124)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
BTG3 (Hs.473420)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
EXT1 (Hs.492618)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
Metabolismus von Stickstoffverbindungen	4	0.00819
Amin-Metabolismus	4	0.00689
Negative Regulation eines biologischen Prozesses	6	0.00781
Negative Regulation eines zellulären Prozesses	6	0.00565
Negative Regulation eines physiologischen Prozesses	6	0.00413
Negative Regulation eines zellulären physiologischen Prozesses	6	0.00340
Sequenzspezifische DNA-Bindungsgene	4	0.00967
Protein-Dimerisierungsaktivität	4	0.00174

3.1.8.4 GO-Analyse mit einer Genliste geringer Stringenz

Um die Anzahl der Gene zu erhöhen, die in die GO-Analyse eingehen konnten, wurde die dreifaktorielle Varianzanalyse von Kapitel 4.1.7. weniger stringent durchgeführt und ein p-Wert von 0.05 als Signifikanzniveau gewählt. Man erhielt 159 Gene, die aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert wurden. Auf diese Weise erhöhte sich die Aussagekraft der GO-Analyse, gleichzeitig aber auch die Wahrscheinlichkeit, eine höhere Anzahl falsch positiver Gene zu erhalten. Dieses Vorgehen war primär dafür geeignet, um die Frage zu beantworten, ob überdurchschnittlich viele Gene mit Wachstumskontrolle zu tun hatten. Bei der Betrachtung der Gene im Einzelnen musste man allerdings vorsichtig sein. Aufgrund der geringen Stringenz, die bei Durchführung der dreifaktorielle Varianzanalyse zur Anwendung kam, war die Wahrscheinlichkeit hoch, falsch Postive zu erhalten.

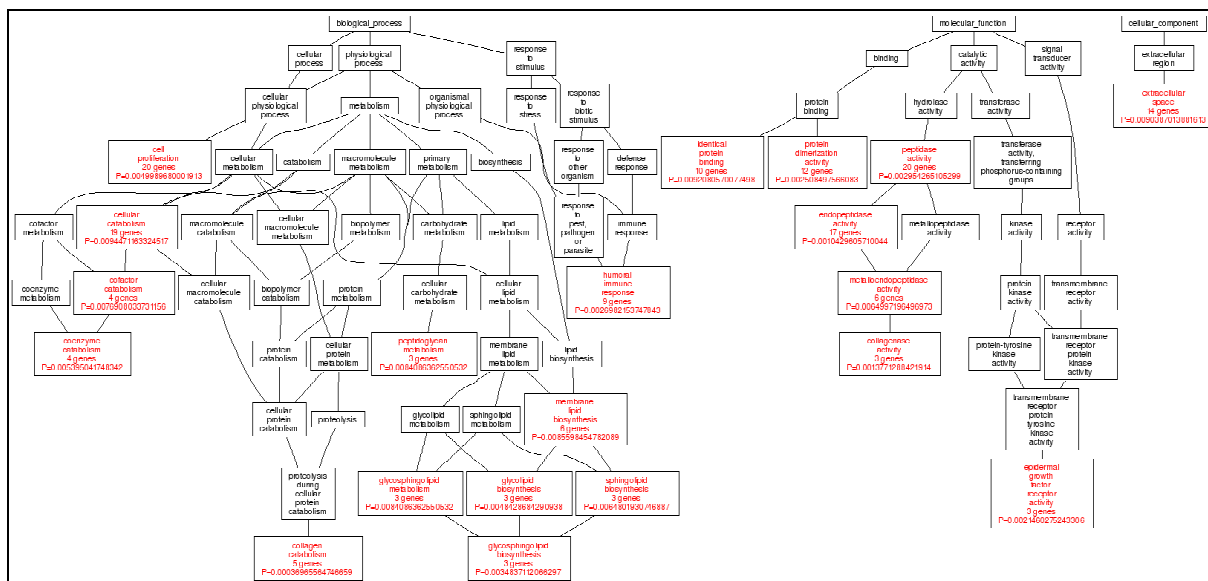


Abbildung 9: GO Baum Hormonrezeptorstatus mit Genliste geringer Stringenz

Die dreifaktorielle Varianzanalyse von Kapitel 4.1.7 wurde mit einem Signifikanzniveau von p=0.05 durchgeführt. Es wurden 159 Gene erhalten, die zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen differenziell exprimiert waren. Mit diesen 159 Genen wurde eine GO-Analyse durchgeführt, die 18 überrepräsentierte GO-Kategorien ergab, darunter auch die GO-Kategorie „Zellteilung“ mit 20 beobachteten Genen und einem p-Wert von 0.005 in einem Fischers-Exakt-Test.

Die GO-Analyse identifizierte 18 GO-Kategorien, die überrepräsentiert waren, darunter auch die GO Kategorie „Zellteilung“ mit 20 Genen und einem p-Wert von 0.005 nach Durchführung eines Fischer-Exakt-Tests (Abb.9). Eine Auflistung aller GO-Kategorien findet sich in Tabelle 14. Der Vollständigkeit halber wurden auch jene 20 Gene, die eine Funktion bei der Zellproliferation ausüben, angegeben. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit hoch, unter diesen 20 Genen einige falsch Positive zu finden. Aufgrund der hohen Anzahl gefundener Gene und der großen Signifikanz kann man dennoch die Schlussfolgerung ziehen, dass differenziell exprimierte Gene bezüglich des Hormonrezeptorstatus besonders of Funktionen ausübten, die mit Wachstum und Zellteilung zu tun hatten.

Tabelle 14: GO-Analyse Hormonrezeptorstatus weniger stringent

GO Kategorie	Beobachtete Anzahl der Gene	p-Wert
Zellproliferation	20	0.00500
CDK6 (Hs.119882):	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
ERBB4 (Hs.390729)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
FABP7 (Hs.26770)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
IGF1R (Hs.20573)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
IGFBP4 (Hs.462998)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
BTG2 (Hs.519162)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
AREG (Hs.270833)	starke Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	
GPNMB (Hs.190495):	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen	

Ergebnisse

BTG3 (Hs.473420)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
CSRP2 (Hs.530904)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
EGFR (Hs.488293):	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
ELF4 (Hs.271940)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
RHOG (Hs.501728)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
S100B (Hs.422181)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
SSR1 (Hs.114033)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
TGFA (Hs.170009)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
VEGF (Hs.73793)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
MIA (Hs.279651)	schwache Expression in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen		
TFDP1 (Hs.79353)	k.A.		
Zellulärer Katabolismus		19	0.00945
Kollagen-Katabolismus		5	0.00037
Kofaktor-Katabolismus		4	0.00769
Koenzym-Katabolismus		4	0.00540
Membran-Lipid-Biosynthese		6	0.00856
Glykolipid-Biosynthese		3	0.00484
Glykosphingolipid-Biosynthese		3	0.00348
Sphingolipid-Biosynthese		3	0.00648
Glykosphingolipid-Metabolismus		3	0.00841
Peptidoglycan-Metabolismus		3	0.00841
Humorale Immunantwort		9	0.00270
Identische Protein-Bindung		10	0.00921
Protein-Dimerisierungs-Aktivität		12	0.00251
Peptidase-Aktivität		20	0.00295
Endopeptidase-Aktivität		17	0.00104
Metalloendopeptidase-Aktivität		6	0.00650
Kollagenase-Aktivität		3	0.00138
Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-Aktivität		3	0.00215
Extrazellulärer Raum		14	0.00904

3.2 Gene assoziiert mit dem Histologischen Grading

Das Histologische Grading beurteilt histomorphologische Merkmale des Karzinoms, welche die Malignität des Krebsgewebes erfassen. Darunter fallen morphologische Abweichungen, Anomalien in der Anordnung des Zellverbandes und erhöhte Zellteilungsaktivität.

3.2.1 Histologisches Grading als Prognosefaktor beim Mammakarzinom

Beim Mammakarzinom wird das Histologische Grading nach dem Bloom-Richardson-System [64] durchgeführt, das Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate berücksichtigt. Die Prognose des Brustkrebspatienten ist umso besser, je niedriger das Grading des Mammakarzinoms ausgefallen ist. Abbildung 10 zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit von 116 Patienten dieser Arbeit in Abhängigkeit von der Grading-Gruppe des Mammakarzinoms. Patienten mit gut differenziertem Mammakarzinom hatten die höchste Wahrscheinlichkeit, die Erkrankung zu überleben, während Brustkrebs der Grading-Gruppe 3 die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit nach sich zog.

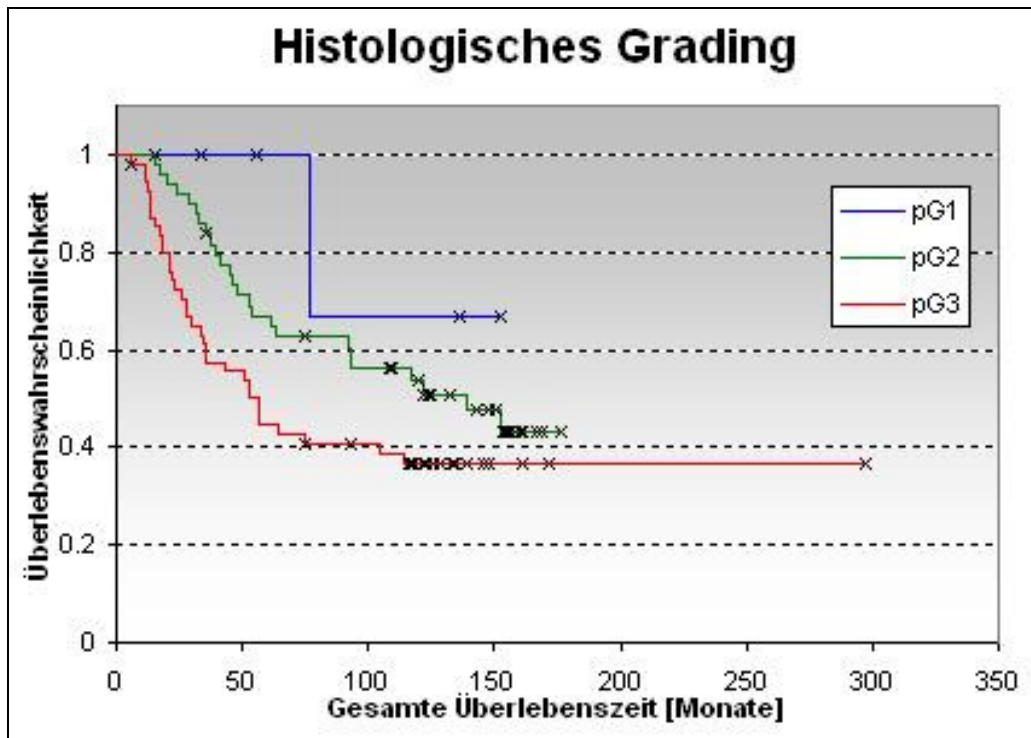


Abb.10: Kaplan-Meier-Plot Histologisches Grading.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit wird abhängig vom Histologischen Gradings des Mammakarzinoms dargestellt: Die 5 Patienten der ersten Grading-Gruppe (blaue Linie) hatten die beste Prognose, während 51 Patienten mit Mammakarzinomen des Gradings 2 (grüne Linie) eine mittlere und 60 Patienten der dritten Grading-Gruppe (rote Linie) die geringste Wahrscheinlichkeit hatten, die Krebserkrankung zu überleben.

3.2.2 SAM-Analyse bezüglich des Histologischen Gradings

Eine SAM-Analyse, die Mikroarraydaten von 118 Brustkrebspatienten umfasste, wurde durchgeführt, um jene Gene zu ermitteln, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren (Abb.11). Bei einem Signifikanzniveau von 5% falsch Positiven wurden 113 Gene gefunden (Tabelle 15). 78 Gene wurden in Mammakarzinomen mit hoher Grading-Gruppe stärker exprimiert als in gut differenziertem Brustkrebsgewebe, während 35 Gene eine starke Expression in Mammakarzinomen mit niedriger Grading-Gruppe zeigten als in schlecht differenziertem Brustkrebsgewebe. Wenn man Brustkrebs als progressive Erkrankung auffasst, bei der das Gewebe im Krankheitsverlauf zunehmend dedifferenziert, würde man dieses Ergebnis folgendermaßen interpretieren: Mit zunehmender Dedifferenzierung des Mammakarzinoms wurden 78 Gene stärker exprimiert, während die Expression von 35 Genen schwächer wurde.

Ergebnisse

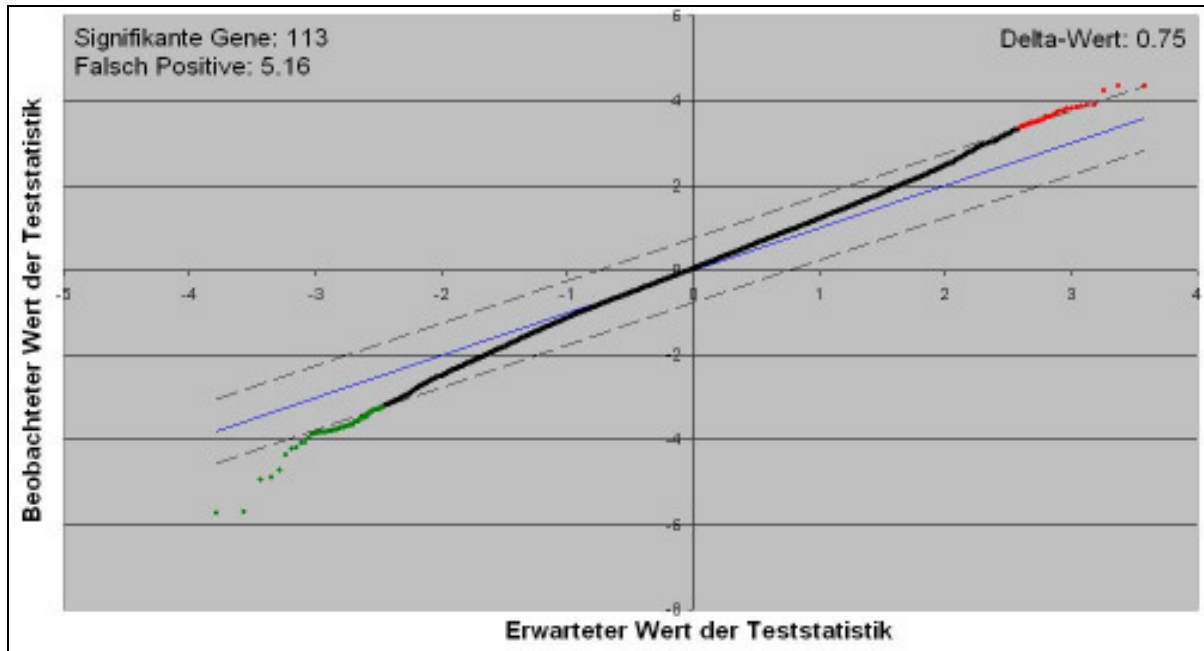


Abbildung 11: SAM-Plot der Analyse bezüglich des Histologischen Gradings

SAM-Plot der Analyse, die Gene identifiziert hat, deren Expression mit dem Histologischen Grading assoziiert war. Die Teststatistik benutzte eine lineare Regression, um in 118 Mammakarzinomen Gene zu finden, deren Expression mit dem Histologischen Grading des Mammakarzinoms korrelierte. Die Gegenüberstellung mit einer empirischen Verteilung der Teststatistik bei Zutreffen der Nullhypothese zeigt, dass die Expression von 113 Genen statistisch signifikant mit dem Histologischen Grading assoziiert war: 78 Gene wurden in Mammakarzinomen mit hoher Grading-Gruppe stärker exprimiert als in gut differenzierten Brustkrebsgeweben, während 35 Gene eine starke Expression in Mammakarzinomen mit niedriger Grading-Gruppe zeigten als in schlecht differenzierten Brustkrebsgeweben.

Tabelle 15: 113 Gene, deren Expression mit dem Histologischen Grading assoziiert war.

RZPD ID	Unigene ID	Gen-Symbol	SAM Score	q-Wert (%)	Rang Survival Analyse
Gene mit stärkerer Expression in schlecht differenziertem als in gut differenziertem Brustkrebsgewebe:					
IMAGp998A19654	Hs.84113	CDKN3	-5.72	1.87	979
IMAGp998J01977	Hs.226390	RRM2	-5.71	1.87	97
IMAGp998E104888	Hs.270845	KIF23	-4.93	1.87	225
RZPDp1096B1014D	Hs.433203	HSPC171	-4.89	1.87	527
IMAGp998F15679	Hs.333823	MRPL13	-4.71	1.87	101
RZPDp202E095D	Hs.23935	USP43	-4.36	1.87	797
IMAGp998J121904	Hs.521124	MRPS28	-4.22	1.87	323
IMAGp998J21134	Hs.533185	MAD2L1	-4.19	1.87	383
IMAGp998A161825	Hs.350966	PTTG1	-4.07	1.87	2373
IMAGp998J05329	Hs.15977	NDUF9	-4.07	1.87	2254
RZPDp1096C092D	Hs.156346	TOP2A	-3.95	1.87	3815
IMAGp998E011780	Hs.23960	CCNB1	-3.87	1.87	2290
IMAGp998O161170	Hs.459265, Hs.135270	ISG20, CRMP1	-3.86	1.87	1635
RZPDp201A0831D	Hs.516243	TSRC1	-3.84	1.87	388
RZPDp1096A063D	Hs.374378	CKS1B	-3.82	1.87	164
RZPDp201B0736D	Hs.516790	ARHGFE2	-3.82	1.87	181
IMAGp998A24229	Hs.510301	k.A.	-3.82	1.87	1361
IMAGp998H08529	Hs.5199	HSPC150	-3.81	1.87	11
IMAGp998E181824	Hs.371690	C18orf51	-3.79	1.87	6332
IMAGp998N203803	Hs.130690	CLYBL	-3.79	1.87	715
RZPDp1096D055D	Hs.491682	PRKDC	-3.78	1.87	1698
IMAGp998O15696	Hs.514934	CAPZA1	-3.78	1.87	5367
RZPDp202E097D	Hs.502	TAP2	-3.77	1.87	525

Ergebnisse

RZPDp202F087D	Hs.140944	FAM50B	-3.76	1.87	1860
IMAGp998L06694	Hs.310640	TIFA	-3.72	1.87	1533
RZPDp201C1013D	Hs.363558	NS3TP2	-3.72	1.87	1327
IMAGp998E24156	Hs.439662, Hs.522636	LOC90321_EBP	-3.72	1.87	358
IMAGp998P15671	Hs.90527	HSPC128	-3.7	1.87	779
IMAGp998D04695	Hs.374378	CKS1B	-3.69	1.87	31
IMAGp998M07276	Hs.546504, Hs.289123	MGC34646.DCTN2	-3.68	1.87	3536
IMAGp998K18564	Hs.156346	TOP2A	-3.68	1.87	212
RZPDp201B0829D	Hs.433419	COX4I1	-3.67	1.87	95
RZPDp1096A0316D	Hs.250899	HSBP1	-3.67	1.87	468
IMAGp998K20778	Hs.551767, Hs.535769	k.A.	-3.66	1.87	962
IMAGp998G04114	Hs.529475	HSPC111	-3.65	1.87	1371
IMAGp998K08282	Hs.515255	LSM4	-3.64	1.87	4006
IMAGp998M20378	Hs.13885	MGC5309	-3.64	1.87	2396
IMAGp998C21313	Hs.431668	COX6B1	-3.6	1.87	2097
IMAGp998H211852	Hs.449415	EIF2C2	-3.56	1.87	258
RZPDp202D102D	Hs.292078	LARP	-3.56	1.87	4656
IMAGp998N071907	Hs.381072	PPIF	-3.55	1.87	2595
RZPDp201B0918D	Hs.14770	BIN2	-3.55	1.87	3839
IMAGp998I13687	Hs.58471	SELK	-3.54	1.87	4715
IMAGp998F18651	Hs.472716	C20orf129	-3.53	3.13	320
IMAGp998G03196	Hs.122752	TAF2	-3.5	3.13	335
RZPDp201H0411D	Hs.283532	BM039	-3.48	3.13	472
IMAGp998D14670	Hs.511093	NUSAP1	-3.48	3.13	10
RZPDp201F0434D	Hs.513141	IDH2	-3.48	3.13	106
IMAGp998E214877	Hs.131133	k.A.	-3.47	3.13	2918
RZPDp201C0413D	Hs.119192	H2AFZ	-3.45	3.13	804
IMAGp998K07672	Hs.461722	HSPC176	-3.45	3.13	156
RZPDp201D046D	Hs.227817	BCL2A1	-3.45	3.13	23
IMAGp998K153902	Hs.275086	PRDM10	-3.43	4.15	595
IMAGp998K18795	Hs.257970	NFIX	-3.43	4.15	440
RZPDp202E096D	Hs.421576	MAGOH	-3.37	4.15	67
RZPDp201H022D	Hs.488282	SEC61G	-3.36	4.73	954
IMAGp998D22135	Hs.524947	CDC20	-3.35	4.73	127
IMAGp998A061864	Hs.388255	DC13	-3.34	4.73	1534
RZPDp202G105D	Hs.549233	TIRAP	-3.33	4.73	1271
IMAGp998D06182	Hs.435168, Hs.478150	GPR133.PDCD10	-3.32	4.73	2928
IMAGp998G011115	Hs.115242	DRG1	-3.32	4.73	713
IMAGp998B07584	Hs.217409	C10orf83	-3.31	4.73	122
RZPDp202F115D	Hs.499925	VPS26	-3.29	4.73	4414
IMAGp998I151117	Hs.284491	PDXK	-3.29	4.73	155
IMAGp998H08377	Hs.173705	LOC401152	-3.29	4.73	586
RZPDp202G096D	Hs.25601	CHD3	-3.29	4.73	1798
IMAGp998F061204	Hs.189987	k.A.	-3.28	4.73	6524
IMAGp998H154187	Hs.54416	SIX1	-3.28	4.73	1043
IMAGp998N171933	Hs.459362	PRC1	-3.28	4.73	29
IMAGp998G225802	Hs.272398	ETV7	-3.28	4.73	607
RZPDp201B1019D	Hs.418123	CTSL	-3.26	4.73	239
RZPDp201G034D	Hs.62661	GBP1	-3.26	4.73	495
IMAGp998K171748	Hs.411641	EIF4EBP1	-3.26	4.73	1097
RZPDp201B0120D	Hs.298716	GCN1L1	-3.26	4.73	12098
IMAGp998K081157	Hs.292882	RNF19	-3.25	4.73	589
RZPDp202D088D	Hs.460515	k.A.	-3.23	4.73	1746
IMAGp998H03152	Hs.292579	PTDSS1	-3.23	4.73	83
RZPDp202E126D	Hs.149195	PADI3	-3.22	4.73	4009
Gene mit stärkerer Expression in gut differenziertem als in schlecht differenziertem Brustkrebsgewebe:					
IMAGp998L02560	Hs.221941	CYBRD1	4.35	1.87	13962
IMAGp998A19621	Hs.14248	STN2	4.33	1.87	12260
IMAGp998K07310	Hs.336768	ABAT	4.23	1.87	14048
IMAGp998K07242	Hs.462998	IGFBP4	3.89	4.15	14019
IMAGp998P08271	Hs.177193	SYT9	3.89	4.15	14011
RZPDp202A056D	Hs.491582	PLAT	3.87	4.15	13484
IMAGp998C115404	Hs.99626	LOC256273	3.84	4.15	8217
IMAGp998F13121	Hs.446564	DDB2	3.81	4.15	12876
IMAGp998G145245	Hs.150749	BCL2	3.8	4.15	13891
IMAGp998E20251	Hs.439726	LAMB2	3.76	4.15	13909
IMAGp998C181779	Hs.208124	ESR1	3.76	4.15	13965
IMAGp998L19534	Hs.462379	TOM1L2	3.74	4.15	13541
IMAGp998L04114	Hs.438482	WDR19	3.67	4.15	14026
RZPDp201D0620D	Hs.188661	ADAT1	3.65	4.15	10349
IMAGp998E24564	Hs.28625	k.A.	3.63	4.15	11432
IMAGp998F18240	Hs.445414	k.A.	3.61	4.15	13325
IMAGp998G13179	Hs.24601	FBLN1	3.61	4.15	13543
IMAGp998B022675	Hs.467960	RAB10	3.57	4.15	13462
IMAGp998N096072	Hs.370168	CRLF3	3.54	4.15	12122

Ergebnisse

IMAGp998D155598	Hs.181696	k.A.	3.52	4.15	8481
IMAGp998K231863	Hs.21380	k.A.	3.51	4.15	13160
RZPDp201B0516D	Hs.483419	PHF15	3.51	4.15	13666
RZPDp201D0618D	Hs.293971	GCL	3.48	4.15	12754
RZPDp1096F096D	Hs.512677, Hs.1955	SAA4,SAA2	3.48	4.15	7067
IMAGp998J20593	Hs.434255	PSD3	3.47	4.15	11394
IMAGp998O19218	Hs.480819	KIAA0882	3.46	4.15	14034
IMAGp998H03270	Hs.482390	TGFBR3	3.46	4.15	12730
IMAGp998N084208	Hs.134650	k.A.	3.45	4.15	10603
IMAGp998E243845	Hs.156723	CAMK1D	3.42	4.73	12073
IMAGp998P01593	Hs.370267	TNKS	3.41	4.73	11925
IMAGp998H22372	Hs.155956	NAT1	3.41	4.73	13767
IMAGp998F14219	Hs.519057	NPY1R	3.38	4.73	13940
IMAGp998M13676	Hs.134544	SLC25A21	3.38	4.73	12391
IMAGp998M15110	Hs.82432	GPD1L	3.38	4.73	13567
IMAGp998F124758	Hs.156369	TNN	3.37	4.73	12424

3.2.3 KEGG Pathway- und GO-Analyse

Um einen Einblick zu erhalten, welche zellulären Prozesse sich während der Dedifferenzierung des Mammakarzinoms veränderten, wurden mit den 113 Genen, deren Expression mit dem Histologischen Grading assoziiert war, eine KEGG Pathway- sowie eine GO-Analyse durchgeführt. Bei einer KEGG Pathway-Analyse wird überprüft, ob in einer Genliste überproportional viele Gene vorkommen, die einem KEGG Pathway angehören, analog dem Vorgehen bei einer GO-Analyse (Siehe 4.1.8.2).

3.2.3.1 KEGG Pathway- und GO-Analyse bei einem Signifikanzniveau von 5% falsch Positiven

Gemäß der SAM-Analyse von Kapitel 4.2.2 waren 113 Gene mit dem Histologischen Grading assoziiert. Davon waren 96 Gene bekannt, hatten eine eindeutige Unigene-ID und konnten für die nachfolgenden Analysen benützt werden.

3.2.3.1.1 KEGG Pathway-Analyse

Die KEGG Pathway-Analyse fand einen Pathway, in denen die mit dem Grading assoziierten Gene überrepräsentiert waren: Der Pathway für den Zellzyklus (Abb.12a). Die vier darin vertretenen Gene waren: *PRKDC*, *CCNB1*, *PTTG1* und *CDC20*. Alle vier Gene wurden in schlecht differenzierten Mammakarzinomen stärker exprimiert als in gut differenzierten Brustkrebsgeweben.

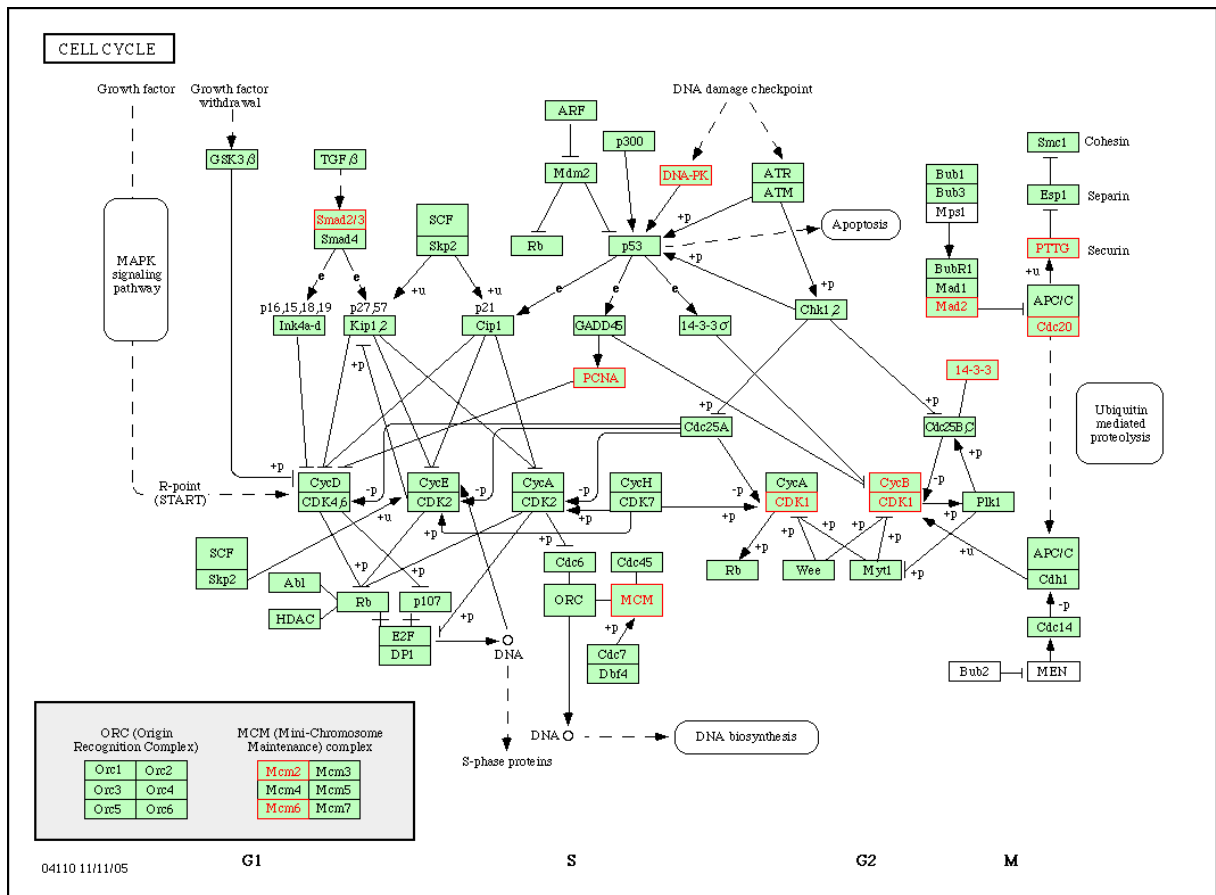


Abbildung 12: KEGG Pathway-Analyse Histologisches Grading

a) 96 Gene mit eindeutigen Unigene-Ids und bekannten Gennamen, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren, wurden für eine KEGG Pathway-Analyse eingesetzt. Vier Gene, die im KEGG Pathway Zellzyklus enthalten sind, waren statistisch signifikant überrepräsentiert (Fischers-Exakt-Test: $p = 0.0053$) und sind in roter Farbe dargestellt. Es waren die Gene *PRKDC*, *CCNB1*, *PTTG1* und *CDC20*. b) KEGG Pathway-Analyse mit einer Genliste, die 20% falsch Positive enthielt: 526 Gene mit bekannten Gennamen und eindeutigen Unigene-IDs gingen in die Analyse ein. 12 Gene, die im KEGG Pathway Zellzyklus enthalten sind, waren statistisch signifikant überrepräsentiert (Fischers-Exakt-Test: p -Wert = 0.0007). Neben den vier Genen der Abb.12a) waren dies *MAD2L2*, *SMAD3*, *MCM2*, *MCM6*, *PCNA*, *YWHAZ*, *CCNB2* und *CDC2*.

3.2.3.1.2 GO-Analyse

In die GO-Analyse gingen dieselben 96 Gene ein wie unter 3.2.3.1. Sieben GO-Kategorien waren überrepräsentiert, davon befanden sich drei auf einem Ast des GO-Baumes: Mitotischer Zellzyklus, M-Phase des mitotischen Zellzyklus und Mitose. Die Gene dieser drei GO-Kategorien waren identisch und konnten als Zellzyklusgene, die an der Mitose beteiligt sind, zusammengefasst werden. Die anderen vier überrepräsentierten GO-Kategorien waren „Zellorganisation und Biogenese“, „Mikrotubulus-Zytoskelett-Organisation“, „Negative Regulation des Proteinmetabolismus“ und „Mitochondrium“. Eine Zusammenfassung der Analyse

findet sich in Tabelle 16, in Abb.13 werden die Ergebnisse als GO-Baum dargestellt. Genauere Informationen über die beteiligten Gene und ihre Regulation finden sich in Tabelle 23 des tabellarischen Anhangs.

Tabelle 16: GO-Analyse Histologisches Grading 5% falsch Positive

GO Kategorie	Erwartete Anzahl der Gene	Beobachtete Anzahl der Gene	p-Wert
Mitotischer Zellzyklus	1.48	6	0.0041
M-Phase des mitotischen Zellzyklus	1.15	5	0.0065
Mitose	1.14	5	0.0065
Zellorganisation und Biogenese	9.29	18	0.0039
Mikrotubulus-Zytoskelett-Organisation	0.42	3	0.0098
Negative Regulation Proteinmetabolismus	0.35	3	0.0061
Mitochondrium	4.01	10	0.0067

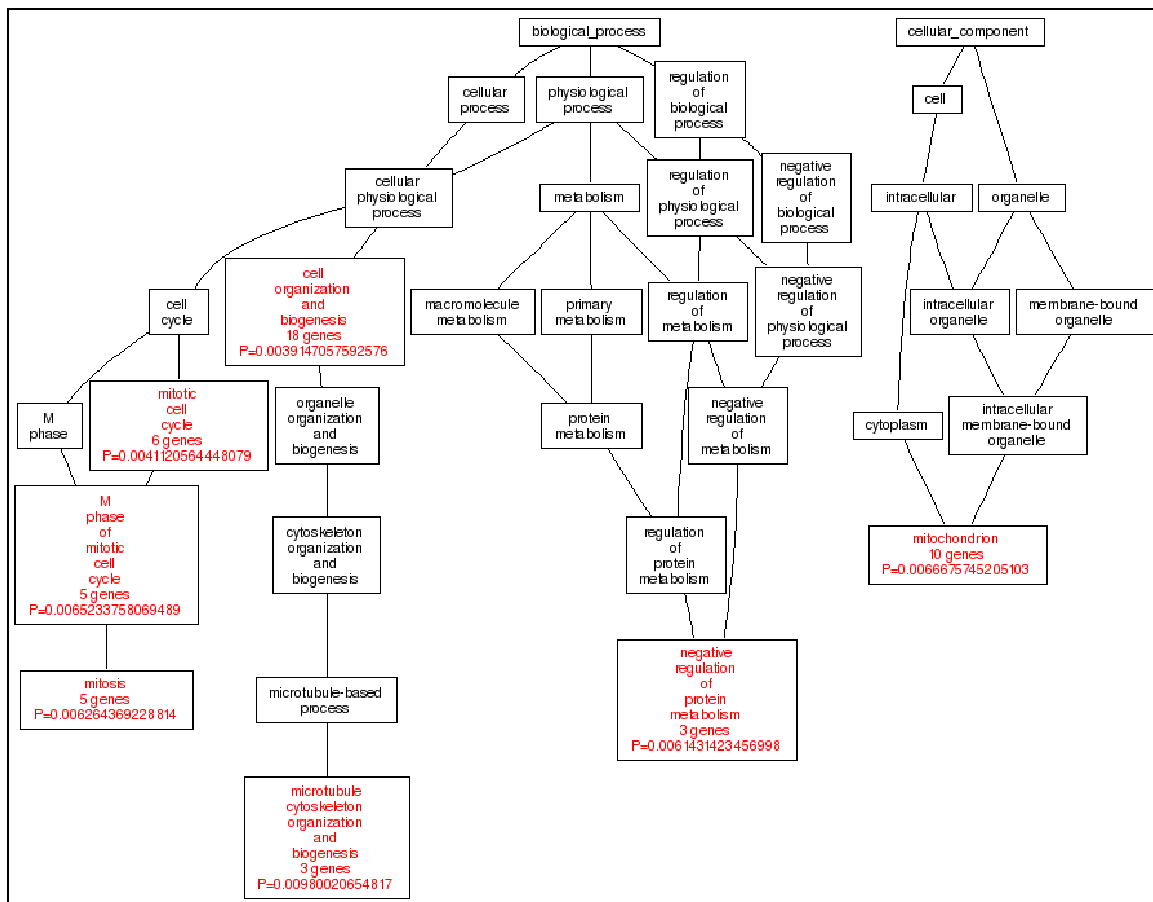


Abbildung 13: GO-Baum Histologisches Grading

Die SAM-Analyse bezüglich Histologischen Gradings identifizierte 113 Gene, deren Expression mit dem Histologischen Grading assoziiert war. Davon hatten 96 Gene einen bekannten Namen und eine eindeutige Unigene-ID. Mit diesen Genen wurde eine GO-Analyse durchgeführt, welche 7 GO-Kategorien gefunden hat, die überrepräsentiert waren. Diese wurden in roter Farbe dargestellt. Die Anzahl der Gene, sowie der p-Wert nach Durchführung eines Fischers Exakt-Tests sind ebenfalls angegeben.

3.2.3.2 KEGG Pathway- und GO-Analyse mit einer Genliste, die 20% falsch Positive enthält

Die Aussagekraft von KEGG Pathway- und GO-Analysen nimmt mit der Anzahl der Gene zu, die für eine derartige Analyse verwendet wird. Man konnte daher versuchen, das Signifikanzniveau jenes Tests zu senken, mit dem die zu analysierenden Gene gefunden wurden. Auf diese Weise lässt sich die Anzahl der Gene für die KEGG Pathway- und GO-Analyse erhöhen, allerdings erhöht sich dadurch auch die Anzahl der falsch positiven Gene, welche in die Analyse eingehen. Die Erfordernisse des statistischen Tests und der KEGG Pathway- bzw. GO-Analyse stehen sich in der Frage des Signifikanzniveaus also diametral gegenüber. Um die Robustheit der Ergebnisse zu überprüfen, die unter 3.2.3.1 gewonnen wurden, ist eine Genliste analysiert worden, die bei Anwendung der SAM Analyse bezüglich des Histologischen Gratings mit einem Signifikanzniveau von 20% falsch Positiven generiert wurde. Unter diesen Testbedingungen konnten 614 Gene identifiziert werden, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren. Davon hatten 526 Gene bekannte Gennamen und eindeutige Unigene-IDs. Mit diesen Genen wurden eine KEGG Pathway-Analyse und eine GO-Analyse durchgeführt.

3.2.3.2.1 KEGG Pathway-Analyse mit einer Genliste, die 20% falsch Positive enthält

Mit 526 Genen wurde eine KEGG Pathway-Analyse durchgeführt. Der einzige KEGG-Pathway, der eine signifikant überrepräsentierte Anzahl an Genen aufwies, war jener für den Zellzyklus (Abb.12b). 12 Gene waren in diesem Pathway enthalten: *MAD2L2*, *SMAD3*, *MCM2*, *MCM6*, *PCNA*, *PRKDC*, *YWHAZ*, *CCNB1*, *CCNB2*, *PTTG1*, *CDC2* und *CDC20*. Alle 12 Gene wurden in schlecht differenzierten Mammakarzinomen stärker exprimiert als in gut differenziertem Brustkrebsgewebe.

3.2.3.2.2 GO-Analyse mit einer Genliste, die 20% falsch Positive enthält

526 Gene, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren, gingen in die GO-Analyse ein. 28 GO-Kategorien waren signifikant überrepräsentiert (Abb.14). Eine Zusammenfassung des Ergebnis befindet sich in Tabelle 24 des tabellarischen Anhanges. Beim Vergleich mit der GO-Analyse von 3.2.3.1.2, bei der eine Genliste verwendet wurde, die beim konventionsgemäßen Signifikanzniveau von 5% falsch Positiven gewonnen wurde, zeigte sich, dass drei GO-Kategorien in beiden Fällen

überrepräsentiert waren: Mitotischer Zellzyklus, M-Phase des mitotischen Zellzyklus und Mitose. Diese drei GO-Kategorien waren also hinsichtlich der Testbedingungen am robustesten und konnten alle dem biologischen Prozess der Zellteilung durch Mitose zugeordnet werden.

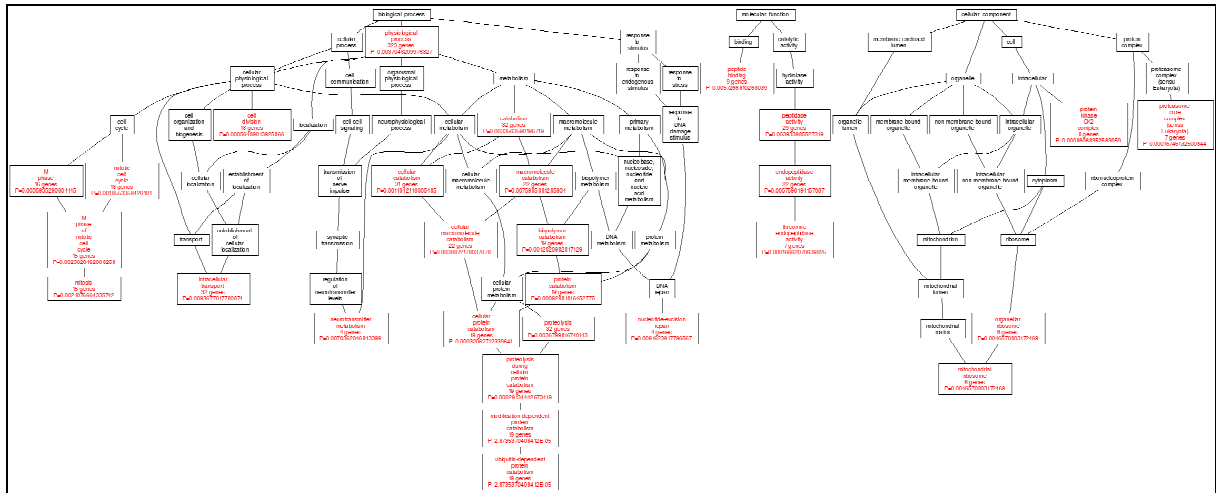


Abbildung 14: GO-Baum Histologisches Grading mit einer Genliste, die 20% falsch Positive enthält

Die SAM-Analyse bezüglich Histologisches Grading wurde bei einem Signifikanzniveau von 20% falsch Positiven durchgeführt und hat unter diesen Testbedingungen 614 Gene gefunden, deren Expression mit dem Histologischen Grading assoziiert war. Davon hatten 526 Gene einen bekannten Namen und eine eindeutige Unigene-ID. In einer GO-Analyse wurden 28 GO-Kategorien gefunden, die überrepräsentiert waren, darunter jene für „Mitotischer Zellzyklus“, „M-Phase des mitotischen Zellzyklus“ und „Mitose“.

3.2.3.3 Zusammenfassung der KEGG-Pathway- und GO-Analysen

Unabhängig vom Signifikanzniveau, das zur Definition der Gene benutzt wurde, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren, zeigte die KEGG Pathway-Analyse den Pathway für Zellzyklusgene als überrepräsentiert an. Die GO-Analysen wiederum zeigten, dass die GO-Kategorien für Zellteilung und Mitose am robustesten statistisch signifikant überrepräsentiert waren. Ein großer Teil der messbaren Genexpressionsänderungen war also auf eine stärkere Expression von Genen in schlecht differenzierten Mammakarzinomen zurückzuführen, die an Zellzyklus und mitotischer Zellteilung beteiligt waren.

3.2.4 Histologisches Grading und Überleben

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von 113 Genen vom Histologischen Grading des Mammakarzinoms abhängig war. Gleichzeitig gilt das Histologische

Grading als bedeutsamer prognostischer Faktor, der die Aggressivität des Krebsgewebes zu erfassen vermag. Es stellte sich daher die Frage, ob die Expression dieser 113 Gene ebenfalls mit dem Überleben der Brustkrebspatienten korrelierte.

3.2.4.1 SAM Survival Analyse

Zunächst wurde eine so genannte „SAM Survival Analyse“ durchgeführt. Diese Analyse erlaubte es, für alle verfügbaren Gene des Mikroarrays die Korrelation zwischen Genexpression und der Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen. Abb.15 zeigt das Ergebnis dieser Analyse, die mit 117 Brustkrebsproben durchgeführt wurde und die untersuchten 14065 Gene nach deren Korrelation mit der Überlebenswahrscheinlichkeit anordnete: Ein positiver Wert der beobachteten Teststatistik zeigt dabei an, dass die Expression des betreffenden Gens mit einer langen Überlebenszeit des Patienten korrelierte, während ein negativer Wert der Teststatistik Gene anzeigt, deren Expression mit einer schlechten Prognose einherging. Zusätzlich wurden in dieser Abbildung jene 113 Gene, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren, farblich angezeigt: 78 Gene, die bei hohem Grading-Grad stark exprimiert wurden, sind in grüner Farbe dargestellt, während 35 Gene rot eingezeichnet sind, die bei schlecht differenzierten Mammakarzinomen schwach exprimiert wurden,. Man kann eine klare Tendenz beobachten: Eine starke Expression von Genen, die auch bei hohem Grading stark exprimiert wurden, korrelierte mit kurzen Überlebenszeiten der Brustkrebspatienten. Umgekehrt ging eine schwache Expression jener Gene, die auch bei hohem Grading-Grad schwach exprimiert wurden, mit einer langen Überlebenszeit der Patienten Hand in Hand.

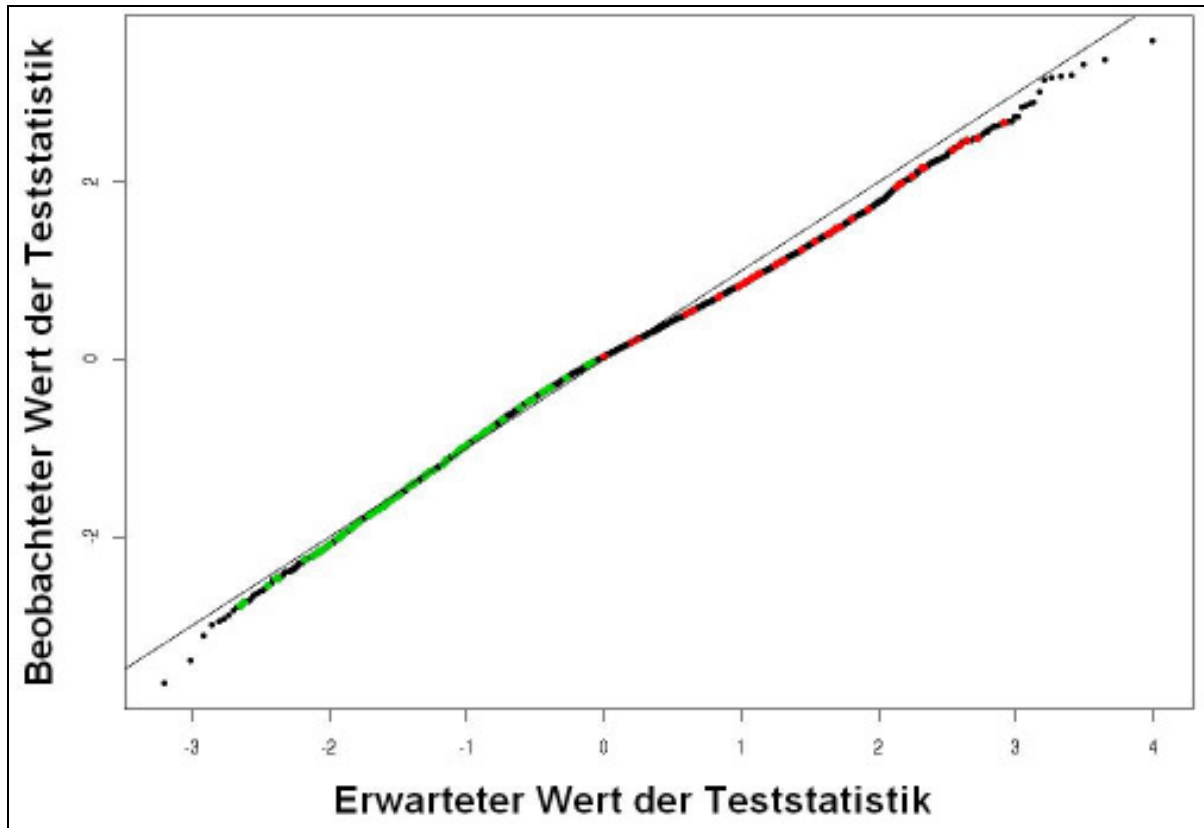


Abbildung 15: SAM Survival Analyse

Die Überlebenszeiten von 117 Brustkrebspatienten waren bekannt. Mithilfe der SAM Survival Analyse wurde die Korrelation zwischen Genexpression und Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Zeit berechnet. Der beobachtete Wert der Teststatistik liefert Information darüber, ob die Expression eines Gens mit langer Überlebenszeit (positive Werte) oder kurzer Überlebenszeit (negative Werte) einherging. Zusätzlich wurden die Gene, welche mit dem Histologischen Grading assoziiert waren, farbig eingezeichnet. In grüner Farbe sind Gene dargestellt, die in schlecht differenzierten Mammakarzinomen stärker exprimiert waren als in gut differenziertem Brustkrebsgewebe. Rot eingezeichnet wurden jene Gene, die in schlecht differenzierten Mammakarzinomen schwächer exprimiert waren als in gut differenziertem Brustkrebs.

3.2.4.2 Validierung mithilfe des Wilcoxon-Tests

Die 14065 Gene, welche einer SAM Survival Analyse unterzogen wurden, konnten abhängig von ihrer Korrelation mit der Überlebenswahrscheinlichkeit geordnet und den Rängen 1 (jenes Gen, dessen Expression am stärksten mit einer kurzen Überlebenszeit korrelierte) bis 14065 (jenes Gen, dessen Expression am stärksten mit einer langen Überlebenszeit korrelierte) zugeordnet werden. In Tabelle 15 wurde für jedes Gen, das mit dem Histologischen Grading assoziiert war, der Rang aus der der Survival Analyse eingetragen.

Für jene 78 Gene, die bei hohem Grading stark exprimiert wurden, ließ sich mithilfe eines Wilcoxon-Tests der p-Wert für die Wahrscheinlichkeit ermitteln, dass eine derartige Rangverteilung zufällig auftrat. Der p-Wert betrug $3.45 \cdot 10^{-33}$ und war somit

hochsignifikant. Für jene 35 Gene, welche bei hohen Grading schwach exprimiert wurden, hat der Wilcoxon-Test einen hochsignifikanten p-Wert von $3.33 \cdot 10^{-16}$ ermittelt. Das ist ein Hinweis darauf, dass durch Messung der Genexpression eine Prognose über die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Brustkrebspatienten möglich ist, sofern Gene herangezogen werden, deren Expressionsänderungen charakteristisch für die im Gewebe stattfindenden Veränderungen während der Dedifferenzierung des Mammakarzinoms sind.

3.3 Gene assoziiert mit dem Tumor Staging

Das Tumor Staging (Siehe Kapitel 1.4.1.1) unterteilt Mammakarzinompatienten in vier verschiedene Gruppen, die sich hinsichtlich ihrer Prognose unterscheiden. Dabei werden drei klinische Parameter erfasst: Die Größe des Primärtumors zum Diagnosezeitpunkt, das Vorliegen eines Lymphknotenbefalls und die Existenz von Fernmetastasen. Aus diesen Parametern wird mithilfe der Definitionen der UICC/AJCC die Zuordnung in vier Staging-Gruppen durchgeführt (Tabelle 2). In dieser Arbeit erlaubten es die zur Verfügung stehenden klinischen Daten das Tumor Staging für 109 Brustkrebspatienten zu ermitteln. Eine Darstellung im Kaplan-Meyer-Plot (Abb.16) zeigt, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten sank, je höher das Tumor Staging war.

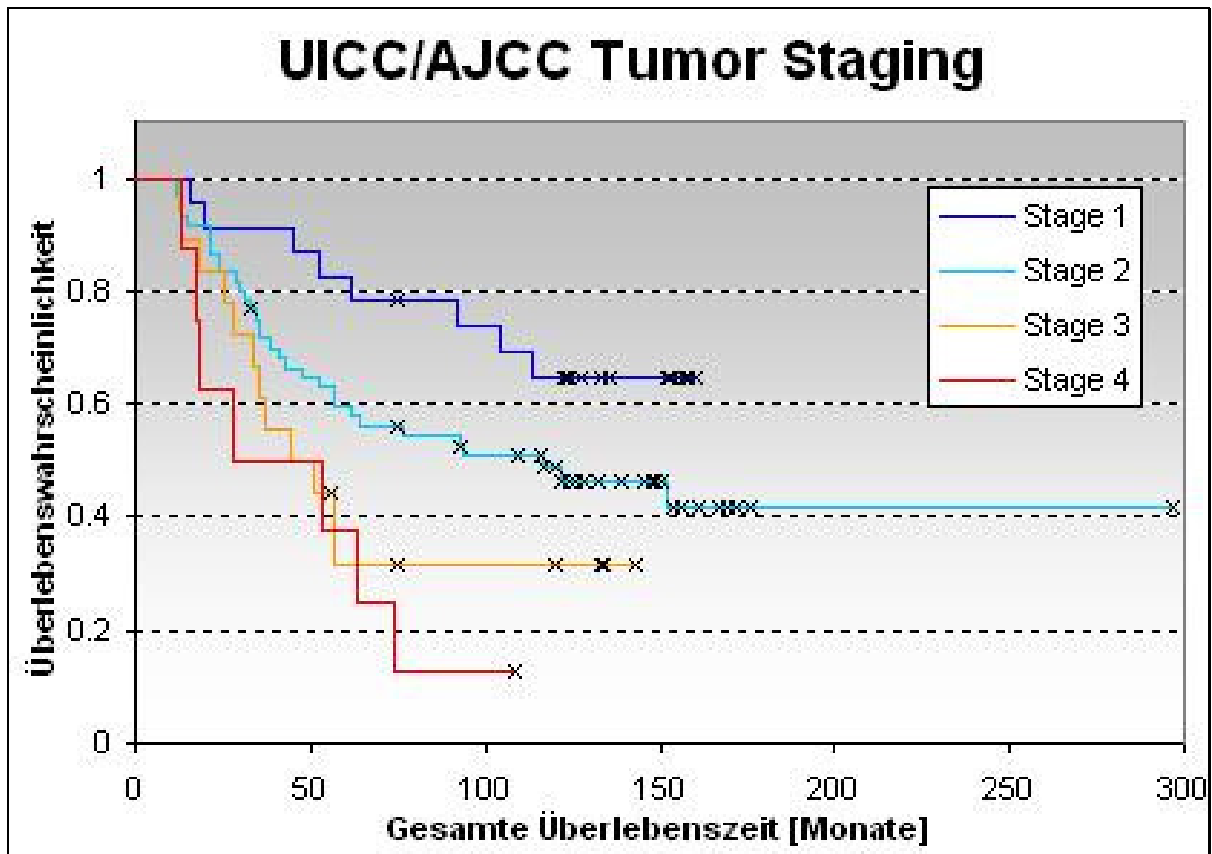


Abb.16: Kaplan-Meyer-Plot UICC/AJCC Tumor Staging

109 Brustkrebspatienten wurden auf Grundlage der UICC/AJCC-Definitionen in die Staging-Gruppen 1 (23 Patienten), 2 (60 Patienten), 3 (18 Patienten) oder 4 (8 Patienten) eingeteilt. Wie es der Erwartung entsprach, nahm die Überlebenswahrscheinlichkeit ab, je höher das Tumor Staging war: Patienten mit einem Mammakarzinom des Tumor Stage 1 hatten die beste Prognose, während Patienten der vierten Staging-Gruppe die geringste Wahrscheinlichkeit hatten die Brustkrebserkrankung zu überleben.

3.3.1 SAM-Analyse Tumor Staging

Um Gene zu finden, die mit dem Tumor Staging assoziiert waren, wurde eine SAM-Analyse durchgeführt. Der Test konnte jedoch keine Gene finden, deren Expression mit dem Tumor Staging korreliert hätte. SAM-Analysen, welche die Größe des Primärtumors bzw. den Lymphknotenbefall berücksichtigten, gelangten zu demselben Ergebnis: Es wurden keine Gene gefunden, deren Expression mit diesen klinischen Parametern assoziiert gewesen wäre.

3.4 Transkriptionelle Änderungen bei Überexpression von ErbB2

Das Protoonkogen *ErbB2* codiert einen Rezeptor mit Tyrosin-Kinaseaktivität, dessen Expression mit einer besonders aggressiven Tumorbiologie assoziiert ist. In 10-34%

aller Mammakarzinome lässt sich eine genomische Amplifikation der Region 17q12 beobachten, in der sich *ErbB2* befindet [68]. Die Amplifikation dieser Region verursacht eine Überexpression von *ErbB2*, welche die Aggressivität des Mammakarzinoms erhöht [109,118,183-185].

3.4.1 SAM-Analyse auf Grundlage des DAKO HercepTest

Seit mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin) ein Medikament für *ErbB2*-überexprimierenden Brustkrebs zur Verfügung steht [114,186-188], wird vor Behandlung der Brustkrebspatienten die Expression dieses Gens ermittelt. Der Nachweis einer *ErbB2*-Überexpression erfolgt entweder auf DNA-Ebene mittels FISH-Analyse oder auf Protein-Ebene mithilfe eines kommerziell erhältlichen immunohistochemischen Assays (DAKO HercepTest). Von 51 Patienten waren die Ergebnisse dieses Tests bekannt. Um Gene zu identifizieren, die in Abhängigkeit von der *ErbB2*-Expression ihre Transkriptionsaktivität änderten, wurde eine SAM-Analyse durchgeführt (Abb.17, Tabelle 17).

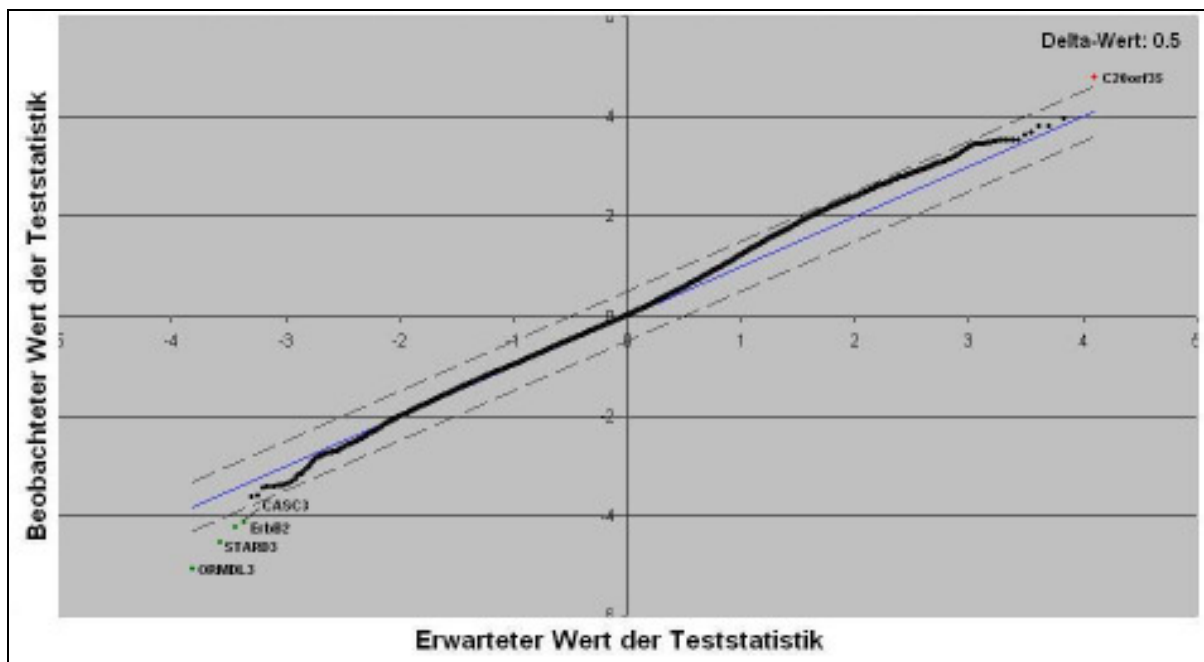


Abbildung 17: SAM-Plot der Analyse bezüglich des DAKO HercepTests

SAM-Plot einer Analyse, in der nach Genen gesucht wurde, deren Expression mit der im HercepTest gemessenen *ErbB2*-Expression korrelierte. Dazu wurde eine Teststatistik mit linearer Regression eingesetzt, welche die Ergebnisse des HercepTests bezüglich *ErbB2*-Expression von 51 Brustkrebspatienten benutzte. Bei einem Signifikanzniveau von 5% falsch Positiven, was der üblichen Konvention entspricht, wurde kein Gen gefunden, das mit der *ErbB2*-Expression korreliert gewesen wäre. Fünf Gene hatten allerdings eine (statistisch nicht signifikante) Tendenz: *ORMDL3*, *STARD3*, *ErbB2* und *CASC3* waren positiv mit der *ErbB2*-Expression korreliert, während sich die Transkription von *C20orf35* mit zunehmender *ErbB2*-Expression verringerte.

Die SAM-Analyse identifizierte vier Gene, die mit der im HercepTest gemessenen ErbB2-Expression tendenziell positiv korreliert waren: *ORMDL3*, *STARD3*, *ErbB2* selbst und *CASC3*. Alle vier Gene befinden sich in der chromosomalen Region 17q12, die in Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression genomisch amplifiziert vorliegt. Ein Gen zeigte die entgegengesetzte Tendenz: Die Transkription von *C20orf35* war umso niedriger, je mehr ErbB2-Rezeptoren an der Oberfläche der Brustkrebs-Zellen detektiert wurden. Allerdings war das Ergebnis der SAM-Analyse statistisch nicht signifikant, da die beobachtete Korrelation bei einem Signifikanzniveau von 5% falsch Positiven zu gering zum Verwerfen der Nullhypothese war. Die Analyse zeigte jedoch, dass die mit dem Mikroarray gemessene Expression des Protoonkogens *ErbB2* gut mit der Menge an ErbB2-Protein korrelierte, die mithilfe des HercepTests ermittelt wurde.

Tabelle 17: Gene, die tendenziell mit der im HercepTest gemessenen ErbB2-Expression assoziiert waren, aber nicht statistisch signifikant waren

RZPD ID	Unigene ID	Gen-Symbol	Gen-Bezeichnung	SAM-Score	q-Wert (%)
Gene, die tendenziell in Mammakarzinomen stärker exprimiert wurden, wenn ErbB2 stark exprimiert wurde:					
IMAGp998M03113	Hs.514151	ORMDL3	ORM1-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	-5.08	26.23
IMAGp998E14241	Hs.77628	STARD3	START domain containing 3	-4.53	26.23
IMAGp998E101931	Hs.446352	ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene	-4.23	26.23
IMAGp998N13143	Hs.350229	CASC3	Cancer susceptibility candidate 3	-4.13	26.23
Ein Gen, das tendenziell in Mammakarzinomen schwächer exprimiert wurden, wenn ErbB2 stark exprimiert wurde:					
IMAGp998C24342	Hs.472847	C20orf35	Chromosome 20 open reading frame 35	4.79	26.23

3.4.2 Expression des Protoonkogens ErbB2 in 126 Brustkrebspatienten

Die SAM-Analyse bezüglich des DAKO HercepTests zeigte, dass die Expression des *ErbB2*-Gens, die mit dem cDNA Mikroarray gemessen wurde, gut mit der Menge des ErbB2-Rezeptors an der Oberfläche der Mammakarzinom-Zellen korrelierte, die mithilfe des DAKO HercepTests in 51 Patienten gemessen wurde. Diese Beobachtung ermutigte dazu, die Expression des *ErbB2*-Gens als Grundlage für weitere Analysen heranzuziehen, um alle 126 Brustkrebspatienten untersuchen zu können. Daher wurde zunächst die relative Genexpression des Protoonkogens *ErbB2* für alle 126 verfügbaren Brustkrebsgewebe in einem Diagramm dargestellt (Abb.18, blaue Balken). Zusätzlich wurde eine quantitative RT-PCR mit einem Taqman-Assay für *ErbB2* durchgeführt (Abb.18, gelbe Balken) und der geometrische Mittelwert aus beiden Expressionswerten gebildet (Abb 18., rote Balken). Mit dieser Vorgehensweise wurde die Zuverlässigkeit der Messwerte erhöht, da bei jedem Mammakarzinomgewebe zwei Messungen mit zwei unterschiedlichen Methoden in

das Ergebnis eingingen. Es zeigte sich, dass etwa ein Fünftel der Patienten eine deutlich erhöhte *ErbB2*-Expression aufwies. Um einen statistischen Test durchführen zu können, wurden jene 23 Gewebe, welche die stärkste Expression des Protoonkogens zeigten, als *ErbB2*-überexprimierende Gruppe definiert. Die restlichen 103 Gewebeproben wurden in weiterer Folge als Mammakarzinome mit normaler Expression des Gens *ErbB2* bezeichnet.

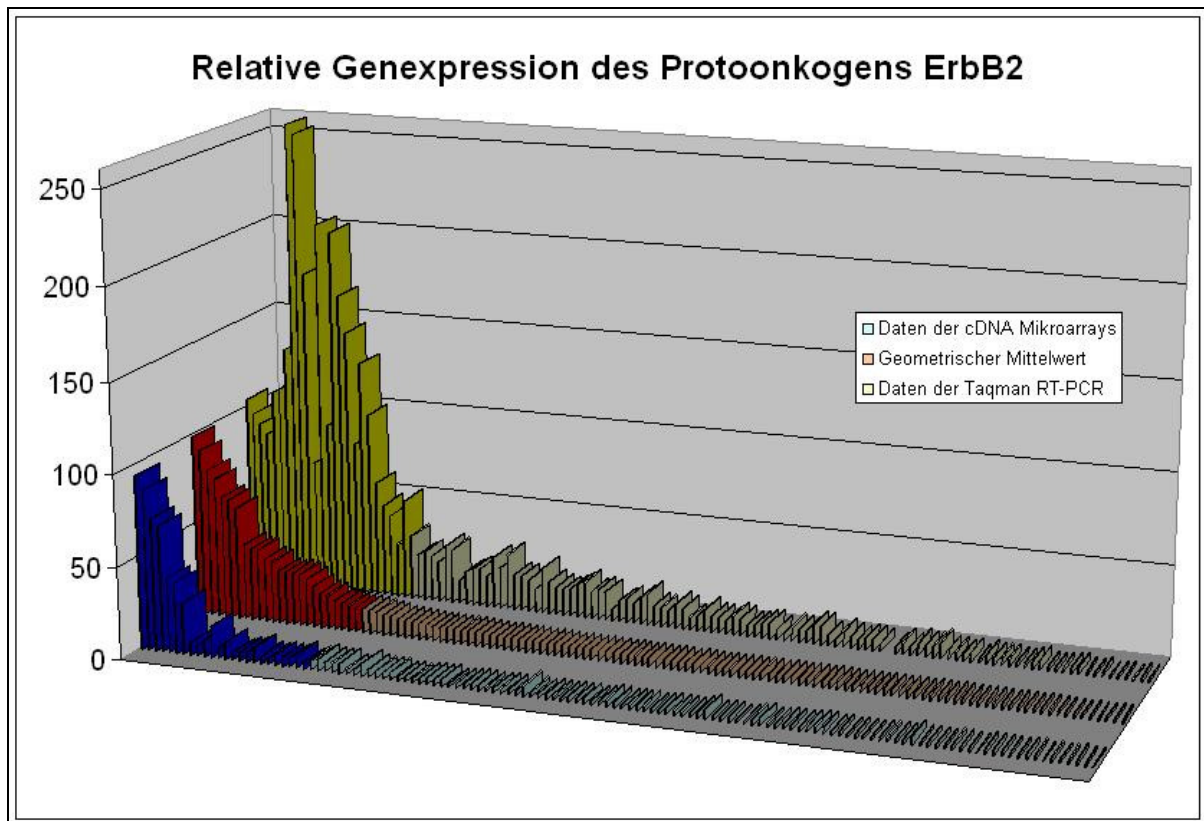


Abbildung 18: Relative Genexpression des Protoonkogens ErbB2 in 126 Brustkrebs-Patienten

Die Abbildung zeigt die relative Genexpression des Protoonkogens *ErbB2* in 126 Brustkrebspatienten, gemessen mit cDNA Mikroarrays (blaue Balken) und Taqman qRT-PCR (gelbe Balken). Etwa ein Fünftel der Mammakarzinompatienten zeigte eine *ErbB2*-Überexpression. Der geometrische Mittelwert beider Messwerte wurde gebildet (roter Balken) und zur Definition jener Patienten benutzt, die *ErbB2* stärker exprimieren als der Rest: Jene 23 Patienten, welche die stärkste Expression von *ErbB2* zeigten, wurden als *ErbB2*-überexprimierende Gruppe definiert. Die Messwerte der *ErbB2*-überexprimierenden Patienten sind in dunkler Farbe dargestellt.

3.4.3 *ErbB2*-Expression und Überleben der Patienten

Nach Einteilung in Mammakarzinome mit Überexpression von *ErbB2* und Mammakarzinome mit normaler Expression von *ErbB2* stellte sich die Frage, ob die Überexpression des Protoonkogens die Überlebenschancen der Patienten

tatsächlich verringert, wie in der Literatur angenommen wird [118,183-185]. Mithilfe eines Kaplan-Meyer-Plots konnte gezeigt werden, dass jene 23 Patienten, die einen *ErbB2*-überexprimierenden Brustkrebs hatten, eine schlechtere Prognose aufwiesen als die übrigen 103 Patienten, deren Mammakarzinom eine normale *ErbB2*-Expression hatte (Abb. 19).

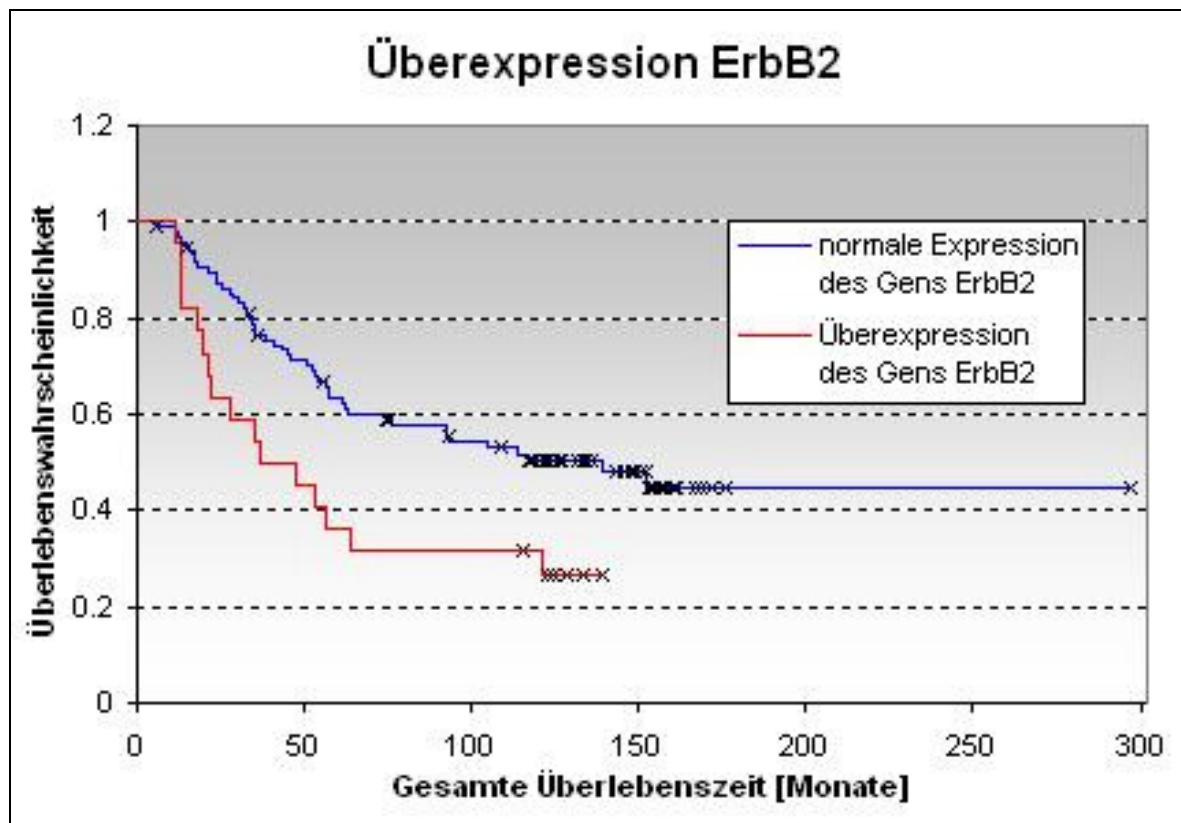


Abb.19: Kaplan-Meyer-Plot Überexpression ErbB2

In Mammakarzinomen von 23 Patienten dieser Arbeit wurde *ErbB2* überexprimiert, während 103 Patienten Brustkrebs mit normaler *ErbB2*-Expression hatten. Im Kaplan-Meyer-Plot sind diese beiden Patientengruppen dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit, die Brustkrebserkrankung zu überleben, war in Patienten mit *ErbB2*-überexprimierenden Mammakarzinomen deutlich geringer. Bei Durchführung eines Log-Rank-Tests ergab sich ein signifikanter p-Wert von 0,011. Allerdings stellte die geringe Zahl von 23 Patienten in einer der beiden verglichenen Gruppen die Verteilungsannahmen der Log-Rank-Tests nicht sicher, sodass die Schätzung des p-Wertes nicht völlig zuverlässig war. Die Tendenz war jedoch klar zu erkennen.

3.4.4 Differentielle Genexpression zwischen *ErbB2*-überexprimierenden Mammakarzinomen und Brustkrebsgeweben mit normaler *ErbB2*-Expression.

Um Gene zu finden, die zwischen Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression und jenen mit normaler Expression von *ErbB2* differentiell exprimiert waren, wurde ein Student's t-Test zwischen diesen Gruppen durchgeführt (Tabelle 18).

Tabelle 18 Differentiell exprimierte Gene zwischen Patienten mit Überexpression des Protoonkogens ErbB2 und normaler ErbB2-Expression

RZPD ID	Unigene ID	Gen-Symbol	Gen-Bezeichnung	Lokalisation	p-Wert (%)
Gene, die in Mammakarzinomen stärker exprimiert wurden, wenn ErbB2 überexprimiert war:					
IMAGp998A22517	Hs.462971	PERLD1	Per1-like domain containing 1	17:q12	1.69E-17
IMAGp998E101931	Hs.446352	ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene	17:q11.2-q12	2.66E-16
IMAGp998L04179	Hs.86859	GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7	17:q12	6.3E-15
IMAGp998E14241	Hs.77628	STARD3	START domain containing 3	17:q11-q12	1.68E-13
IMAGp998M03113	Hs.514151	ORMDL3	ORM1-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	17:q12-q21.1	2.65E-11
IMAGp998G181785	Hs.462983	THRAP4	Thyroid hormone receptor associated protein 4	17:q21.1	7.63E-05
Ein Gen, welches im Brustkrebsgewebe schwächer exprimiert wurde, wenn ErbB2 überexprimiert war:					
IMAGp998C24342	Hs.472847	C20orf35	Chromosome 20 open reading frame 35	20:q13.12	0.048

Das Ergebnis zeigte, dass in Brustkrebsgeweben mit *ErbB2*-Überexpression sechs Gene stärker exprimiert wurden als in Mammakarzinomen mit normaler Expression von *ErbB2*: *ErbB2* selbst, sowie *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *ORMDL3* und *THRAP4*. Zwei Beobachtungen fielen dabei auf: Alle sechs Gene befanden sich in der Region 17q12, wodurch sich die Vermutung aufdrängte, dass diese Gene aufgrund einer genomischen Amplifikation überexprimiert wurden. Außerdem fiel die Intensität auf, mit der diese Gene in den 23 Patienten überexprimiert wurden. Die Expression war dort ca 50-100 mal stärker als in den übrigen Patienten (Abb.20 für Mikroarraydaten, Abb 21. für Taqman qRT-PCR-Daten).

Zusätzlich fand sich ein Gen, dessen Expression diametral dazu verlief: *C20orf35* wurde schwach exprimiert, wenn *ErbB2* stark exprimiert wurde (Abb.20 für Mikroarraydaten, Abb 21. für Taqman qRT-PCR-Daten).

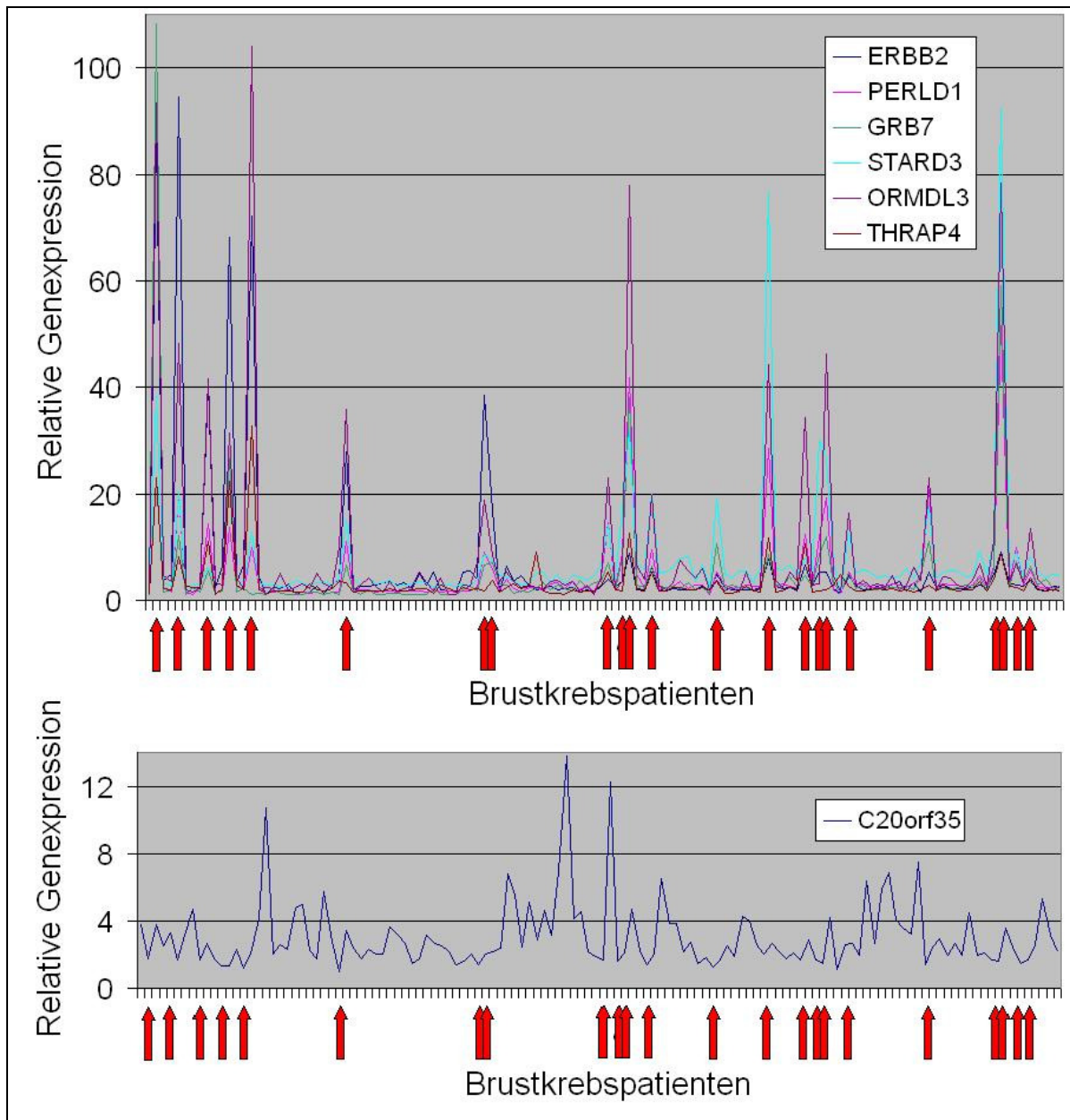


Abbildung 20: Differentiell exprimierte Gene zwischen Mammakarzinomen mit normaler Expression und Mammakarzinomen mit Überexpression von ErbB2, gemessen mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie

Ein Student's t-Test ergab, dass zwischen Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression und jenen mit normaler Expression von *ErbB2* sieben Gene differentiell exprimiert wurden. Die Gene *ErbB2*, *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *ORMDL3* und *THRAP4* wurden stärker exprimiert, wenn *ErbB2* überexprimiert war. Die relative Genexpression dieser sechs Gene in allen 126 untersuchten Brustkrebspatienten ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Darunter wird die relative Genexpression von *C20orf35* gezeigt. Die Expression dieses Gens wurde in Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression schwächer. In beiden Teilen der Abbildung werden die 23 *ErbB2*-überexprimierenden Patienten durch rote Pfeile angezeigt.

3.4.4.1 Validierung der Mikroarraydaten mittels Taqman qRT-PCR

Die Analyse von 126 Mammakarzinomen auf Grundlage der Mikroarraydaten ergab, dass in 23 *ErbB2*-überexprimierenden Patienten die Gene *ErbB2*, *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *ORMDL3* und *THRAP4* stärker, das Gen *C20orf35* hingegen schwächer exprimiert wurde. Diese Ergebnisse wurden mithilfe der Taqman qRT-PCR überprüft. Dazu wurde die relative Genexpression von *ErbB2*, *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *ORMDL3*, *THRAP4* und *C20orf35* in 125 Brustkrebsproben gemessen, für *C20orf35* in 124 Mammakarzinomen und in Abb. 21 dargestellt. Anschließend wurde mit einem Student's t-Test ermittelt, ob die beobachteten Unterschiede in der Genexpression statistisch signifikant waren. In allen sieben Fällen war der p-Wert kleiner als 0,01. Die Ergebnisse der Taqman qRT-PCR-Analysen bestätigten also die Aussagen, welche auf Grundlage der Mikroarraydaten gemacht wurden.

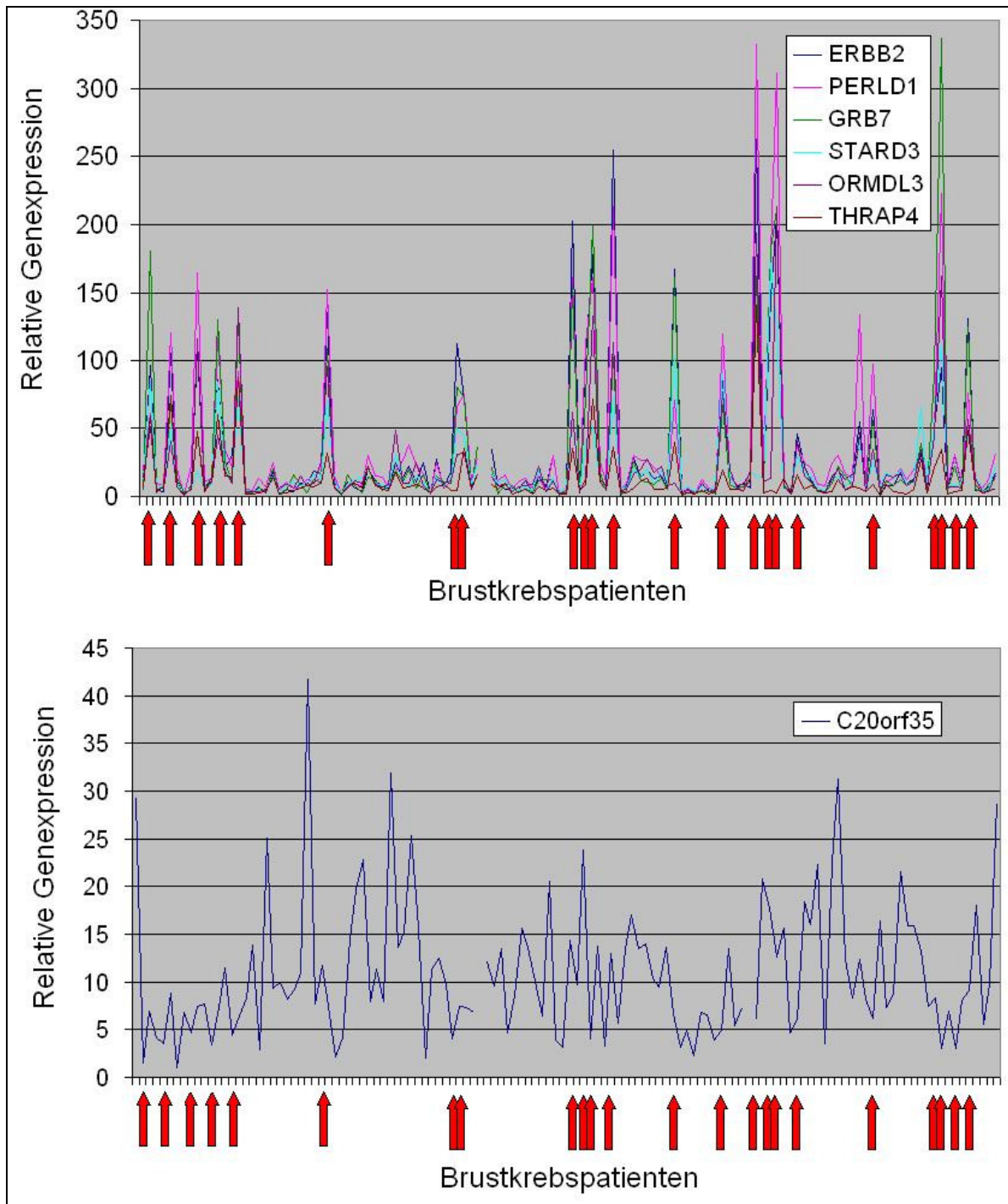


Abbildung 21: Differentiell exprimierte Gene zwischen Mammakarzinomen mit normaler Expression und Mammakarzinomen mit Überexpression von ErbB2, gemessen mithilfe der Taqman qRT-PCR

Im oberen Teil der Abbildung wird die relative Expression der Gene *ErbB2*, *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *ORMDL3* und *THRAP4* für 125 Mammakarzinome dargestellt. Darunter ist die relative Expression des Gens *C20orf35* für 124 Brustkrebsgewebe gezeigt. Patienten mit *ErbB2*-Überexpression werden mithilfe der roten Pfeile angezeigt. Die Unterschiede in der Genexpression zwischen *ErbB2*-überexprimierenden Patienten und Patienten mit normaler Expression von *ErbB2* waren für alle 7 Gene statistisch signifikant (Student's t-Test; $p < 0,01$). Die Analyse der Genexpression mithilfe der Taqman qRT-PCR bestätigte die Ergebnisse der cDNA-Mikroarray-Technologie.

4 DISKUSSION

4.1 Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus

4.1.1 Östrogene stimulieren das Wachstum von Mammakarzinomen

Bereits am Ende des 19. Jahrhunderts wurde beobachtet, dass die Funktion der Ovarien das Wachstum von Mammakarzinomen fördert und die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten steigt, wenn diese entfernt werden [46]. Seitdem konnte gezeigt werden, dass Östrogene das Brustkrebs-Risiko erhöhen [20,47-52], normales Brustgewebe in Brustkrebsgewebe transformieren [53] und bereits existierende Mammakarzinome zu Wachstum anregen, sofern diese den Östrogenrezeptor exprimieren [54-58]. Die endokrine Therapie, welche die Funktion des Östrogenrezeptors inhibiert, war die Folge. Dabei kann einerseits die Produktion von Östrogenen reduziert werden, indem Aromatase-Inhibitoren wie z.B. Letrozol und Anastrozol eingesetzt werden [71-77] oder indem die Ovarien chirurgisch entfernt bzw. durch Bestrahlung inaktiviert werden. Andererseits ist es möglich, die Aktivität des Östrogenrezeptors selbst zu inhibieren, z.B. durch Einnahme von Tamoxifen. Ungefähr 50-60% aller Patienten mit östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen profitieren von einer endokrinen Therapie [189]. Allerdings bleibt ein Teil der Patienten, die mit Tamoxifen behandelt werden, therapieresistent oder entwickelt im Verlauf der Behandlung eine Resistenz [190]. Die Reduktion der Östrogenproduktion wiederum ist mit Nebenwirkungen verbunden, welche die Lebensqualität der Patienten deutlich verschlechtert. Daher ist die Brustkrebsforschung an einem besseren Verständnis des östrogeninduzierten Wachstums von Brustkrebsgeweben interessiert, um bei der Therapie östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome zusätzliche Interventionsmöglichkeiten zu erhalten.

4.1.2 Funktion des Östrogenrezeptors

Der Rezeptor, welcher die biologische Wirkung des Östrogens Estradiol-17 β in das zelluläre Geschehen überträgt, wurde 1962 entdeckt [191] und 1985 kloniert [192]. Zehn Jahre später wurde ein zweiter Östrogenrezeptor entdeckt, der die Bezeichnung *ER β* erhalten hat, während der zuerst klonierte Rezeptor *ER α* genannt wurde. Im Brustgewebe scheint der *ER β* allerdings kein Wachstum anregen zu

können [193]. Daher wird die immunhistochemische Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus am ER α durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die Expression des ER α gemessen und für alle anschließend Analysen herangezogen. Aussagen über den Östrogenrezeptor oder den Östrogenrezeptorstatus beziehen sich daher ausschließlich auf den ER α . Sowohl ER α als auch ER β gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren [194]. Die Bindung von Estradiol-17 β bewirkt Konformationsänderungen [195] und führt über mehrere Zwischenschritte zu einer veränderten Genexpression in der Zelle. Die Ereignisse nach der Ligandenbindung sind hochkomplex und werden nicht vollständig verstanden. Man weiß aber, dass es zu einer Rezeptordimerisierung [194], einer Rezeptor-DNA-Interaktion [196], zu Wechselwirkungen mit Koaktivatoren und anderen Transkriptionsfaktoren [197], sowie zur Bildung eines Präinitiationskomplexes [198] kommt.

4.1.3 Stimulation des Wachstums durch den Östrogenrezeptor

Sowohl für die normale Entwicklung der Brust als auch für die Induktion und Progression von östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen wird Estradiol-17 β benötigt [199,200]. Dennoch exprimiert ein Großteil der proliferierenden Zellen beim pubertären Wachstum der Brust und während des Menstruationszyklus weder ER α noch ER β [201-205]. Daher wird angenommen, dass Estradiol-17 β das Wachstum indirekt anregt, indem östrogenrezeptorpositive Stromazellen zur Bildung von Wachstumsfaktoren angeregt werden, welche anschließend östrogenrezeptornegative Epithelzellen zur Proliferation bringen [206]. Im Mausmodell konnte bestätigt werden, dass Expression von ER α in Stromazellen und nicht im Epithel für östrogenabhängiges Wachstum verantwortlich ist [207]. Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, warum östrogenrezeptorpositive Mammakarzinome von Estradiol-17 β zu Wachstum angeregt werden, während Estradiol-17 β östrogenrezeptorpositive Zellen der gesunden Brust nicht zum Wachstum bringt. Eine mögliche Erklärung könnte das Gleichgewicht zwischen Stimulation durch Wachstumsfaktoren [208] und jene des aktivierten Östrogenrezeptors liefern [209]. Im gesunden Brustgewebe reduziert ein positiver Östrogenrezeptorstatus die Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren [210], wodurch Zellen durch Estradiol-17 β alleine nicht zur Proliferation gebracht werden. Bei negativem Östrogenrezeptorstatus hingegen wird die Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren angeregt, sodass diese Zellen von

Wachstumsfaktoren zur Proliferation gebracht werden können [211]. Es ist daher möglich, dass dieses Gleichgewicht bei Mammakarzinomen gestört ist und sowohl Rezeptoren für Wachstumsfaktoren als auch für Estradiol-17 β gebildet werden [209]. Bei sehr starker Aktivierung mithilfe der Wachstumsfaktoren, wie z.B. bei einer Überexpression von *ErbB2*, kann die Stimulation durch den Östrogenrezeptor sogar überflüssig werden und wegfallen [210,212,213]. Mammakarzinome, die von der Stimulation über Estradiol-17 β unabhängig sind und keinen Östrogenrezeptor exprimieren, führen zu einer schlechten Prognose der Patienten [178,179].

4.1.4 Östrogenrezeptorstatus und Klassifikation

Zahlreiche Studien führten mithilfe der DNA-Mikroarray-Technologie eine Klassifikation von Mammakarzinomen durch [152,156,158,159]. Man wollte Untergruppen erhalten, die hinsichtlich ihrer Genexpression und des klinischen Verhaltens homogener sein sollten als es mit der bisherigen Einteilung der Mammakarzinome der Fall war. Dabei wurde beobachtet, dass die stärksten Expressionsunterschiede zwischen Mammakarzinomen mit und jenen ohne Expression des Östrogenrezeptors auftraten [151]. Weitere Studien schienen diese Beobachtung zu bestätigen [156-160,214], sodass in der Literatur angenommen wird, dass zwischen östrogenrezeptorpositiven und östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen massive Unterschiede hinsichtlich der Genexpression existieren. Die hohe Anzahl differentiell exprimierter Gene entfachte Diskussionen über den Ursprung östrogenrezeptornegativer Mammakarzinome. Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien schienen die Hypothese zu bestätigen, dass östrogenrezeptornegative Mammakarzinome nicht aus östrogenrezeptorpositiven Brustkrebsgeweben hervorgehen, sondern aus einem anderen Zelltyp entstehen und daher eine eigene Form der Brustkrebserkrankung darstellen [151,214].

4.1.5 Definition hormonrezeptorpositiver Patienten und Überlebenszeitanalyse

Die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus wurde von Pathologen der Medizinischen Universität Graz immunhistochemisch in formalinfixierten Paraffinschnitten von Brustkrebsgeweben durchgeführt. Zur Definition der Patienten, welche den Östrogenrezeptor exprimierten, wurden die Befunde beider IHC-Untersuchungen herangezogen und jene Patienten als

östrogenrezeptorpositiv aufgefasst, die gemäß der pathologischen Daten entweder den Östrogenrezeptor (12 Patienten), den Progesteronrezeptor (6 Patienten) oder beide Rezeptoren (60 Patienten) exprimierten. Diese 78 Patienten wurden in weiterer Folge als hormonrezeptorpositiv bezeichnet, während die restlichen 43 Patienten, die weder positiven Östrogen- noch positiven Progesteronrezeptorstatus zeigten, hormonrezeptornegativ genannt wurden. Der Grund für diese Vorgehensweise war das Auftreten von falsch Negativen bei der immunhistochemischen Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus. Die Anwendung der Immunhistochemie an formalinfixierten Paraffinschnitten ist eine routinemäßig angewendete Standardmethode, welche die diagnostische Praxis erheblich verbessert hat [215], aber auch Schwächen aufweist. Unter anderem wurde in einer Untersuchung, die 200 Labore in 26 Ländern umfasste, festgestellt, dass zwischen 30% und 60% aller schwach östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinome falsch negativ diagnostiziert wurden [176]. In einer deutschlandweit durchgeführten Studie, an der 172 Pathologen teilnahmen, wurden bei der Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus 24% falsch Negative beobachtet [216]. Auch bei den Befunden der Medizinischen Universität Graz traten in der Vergangenheit falsch Negative auf, wenn auch in vergleichsweise geringer Anzahl [177]. In dieser Arbeit wurden sechs Patienten beobachtet, die gemäß der Immunhistochemie einen negativen Östrogenrezeptorstatus aufwiesen, allerdings einen positiven Progesteronrezeptorstatus hatten. In Hierarchical Clustering-Analysen zeigten diese sechs Mammakarzinome eine ähnliche Genexpression wie östrogenrezeptorpositive Mammakarzinome. Außerdem war die mit dem cDNA-Mikroarray gemessene Expression des Östrogenrezeptors selbst in allen sechs Brustkrebsgeweben ebenso hoch wie in den restlichen 72 Mammakarzinomen, die gemäß der immunhistochemischen Bestimmung einen positiven Östrogenrezeptorstatus hatten. Daher wurde davon ausgegangen, dass diese sechs Patienten falsch negativ befundet waren. Der Einfluss des Hormonrezeptorstatus auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der 121 untersuchten Brustkrebs-Patienten wurde mithilfe eines Kaplan-Meyer-Plots in Abb. 3 gezeigt. In Übereinstimmung mit der Literatur [178,179] hatten Patienten mit positivem Hormonrezeptorstatus eine bessere Prognose als hormonrezeptornegative Patienten.

4.1.6 Differentiell exprimierte Gene und systematische Messabweichung

Um Gene zu identifizieren, die bezüglich des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert waren, wurde eine SAM-Analyse zwischen 78 hormonrezeptorpositiven und 43 hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen durchgeführt (Abb.4, Tab.10). Bei einem Signifikanzniveau, das 5% falsch Positive zuließ, waren 1273 Gene differentiell exprimiert. Die hohe Anzahl differentiell exprimierter Gene entsprach den Ergebnissen früherer Studien, in denen die größten Genexpressionsunterschiede zwischen östrogenrezeptorpositiven und östrogenrezeptornegativen Brustkrebsgeweben beobachtet wurden [151,156-160,214]. Allerdings zeigte sich, dass zahlreiche Gene in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen stärker exprimiert waren, die charakteristisch für Zellen des Immunsystems sind, z.B. *CD48*, *NK4*, die T-Zellrezeptorgene *TCRA*, *TCRD*, die Immunglobulingene *IGLL1*, *IGHG3*, *IGLC2* und der B-Zell-Marker *Oct2*. Einige Studien konnten beobachten, dass lymphozytische Infiltrate aus T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen bevorzugt in Mammakarzinomen mit negativem Östrogenrezeptorstatus auftraten [180-182]. Die naheliegendste Erklärung für diese Ergebnisse war das Vorliegen einer systematischen Messabweichung: Wenn lymphozytische Infiltrate in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen häufiger auftreten als in hormonrezeptorpositivem Brustkrebsgewebe, dann würden Gene differentiell exprimiert erscheinen, die charakteristisch für Zellen des lymphozytischen Infiltrates sind. In diesem Fall hätte man nicht zwischen Genen unterscheiden können, die tatsächlich aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert wurden und jenen Genen, die lediglich wegen einer systematischen Messabweichung differentiell exprimiert erschienen.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden zunächst Gene ermittelt, die mit der lymphozytären Infiltration assoziiert waren. Pathologen der Medizinischen Universität Graz hatten das Ausmaß der Infiltration für 70 Patienten ermittelt und quantifiziert. Mithilfe einer SAM-Analyse für stetige Werte konnten 788 Gene gefunden werden, die mit dem Auftreten eines lymphozytischen Infiltrats korrelierten. Anschließend wurden diese Gene mit den 1273 differentiell exprimierten Genen bezüglich des Hormonrezeptorstatus verglichen: 348 Gene waren identisch (Abb.5). Dieses Ergebnis war ein starker Hinweis dafür, dass die Infiltration mit Lymphozyten die SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus beeinflusste. Das Auftreten der lymphozytären Infiltration wurde daraufhin genauer untersucht, indem einerseits

pathologische Daten und andererseits die Expression des T-Zellrezeptors und des Immunglobulins Lambda als Indikatoren für die Anwesenheit von T-Zellen und B-Zellen herangezogen wurden (Abb.6). Es zeigte sich, dass das lymphozytische Infiltrat in Mammakarzinomen mit negativem Hormonrezeptorstatus häufiger und stärker aufgetreten ist als in hormonrezeptorpositiven Brustkrebsgeweben. Eine systematische Messabweichung war daher die unvermeidbare Folge.

4.1.7 Korrektur der systematischen Messabweichung mithilfe der Varianzanalyse

Um Gene zu finden, die ausschließlich aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert wurden, musste das Auftreten des lymphozytischen Infiltrates quantitativ erfasst und anschließend korrigiert werden. Dazu wurden einerseits die Expressionswerte von T-Zellrezeptorgen als Indikatoren für die Anwesenheit von T-Zellen und jene von Immunglobulin Lambda-Genen als Indikatoren für die Anwesenheit von B-Zellen herangezogen. Anschließend wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, welche den Einfluss dieser Faktoren auf die Genexpressionswerte abschätzen konnte. Die dreifaktorielle Varianzanalyse, welche den Hormonrezeptorstatus, die Anwesenheit von T-Zellen und die Anwesenheit von B-Zellen berücksichtigte, ergab, dass nur 49 Gene aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert wurden, während 2013 Gene mit der Anwesenheit von T-Zellen und 315 Gene mit der Anwesenheit von B-Zellen zu erklären waren (Tab.11). Nach Beseitigung der systematischen Messabweichung zeigte sich also, dass in Wirklichkeit nur sehr wenige Gene aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert wurden. Dieses Ergebnis steht in scharfem Gegensatz zu der in vielen Studien vertretenen Auffassung, dass zwischen östrogenrezeptorpositiven und östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen sehr große Genexpressionsunterschiede existieren [151,156-160,214].

4.1.8 Auswirkung der systematischen Messabweichung

Die Auswirkung der systematischen Messabweichung, welche durch das bevorzugte Auftreten eines lymphozytären Infiltrates in östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen bewirkt wurde, konnte an der SAM-Analyse bezüglich des Hormonrezeptorstatus demonstriert werden, die zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Brustkrebsgeweben durchgeführt wurde. Bei diesem

direkten Vergleich wurden 1273 Gene als differentiell exprimiert angesehen. Die Überschneidung dieser Gene mit den Testergebnissen der dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde mithilfe eines Venn-Diagramms in Abb. 7 dargestellt. Die Varianzanalyse hat 49 Gene identifiziert, die aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert wurden. Davon waren 44 Gene auch beim SAM-Test bezüglich des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert. Das entsprach der Erwartung: Gene, die nur aufgrund des Hormonrezeptorstatus differentiell exprimiert wurden, sollten in beiden Tests statistisch signifikant sein. Diese 44 Gene sind in Tabelle 12 aufgelistet und wurden für alle nachfolgenden Analysen verwendet. Darüber hinaus konnte man aber feststellen, dass ein großer Teil der 1273 Gene auf die Anwesenheit von T- und B-Zellen zurückzuführen war und daher nichts mit der Funktion des Östrogenrezeptors zu tun hatte.

4.1.9 Lymphozytische Infiltration in der Literatur

Das Auftreten lymphozytenspezifischer Genen wurde in zahlreichen Genexpressionsstudien beobachtet und erwähnt. In einer Klassifikationsstudie von Perou *et al.* wurden z.B. Cluster mit den B-Zell-spezifischen Genen *IGHG3*, *CSF1*, *NCF1*, *IGLL2*, *IGL@*, *HLA-DQB1*, *IGJ*, *IGH@*, *PH2* und den T-zellspezifischen Genen *IL10RA*, *ITGAL*, *TRB@*, *TRD@*, *LCK*, *CD3D*, *CD3G* beschrieben [151]. In einer vielbeachteten Brustkrebsstudie haben Van't veer *et al.* ein Cluster mit den Genen *POU2AF1*, *PIM2*, *IGLL1*, *IGL@*, *IGKV3D*, *IGKC*, *TLX3*, *ICAP-1A*, *MTR1*, *CD19*, *IGHM*, *VPREB3*, *BM040*, *KIAA0167*, *TRD@* und *IRF5* beobachtet und auf das Auftreten einer lymphozytischen Infiltration zurückgeführt [157]. Allerdings wurde der Einfluss, den das bevorzugte Auftreten der lymphozytären Infiltration in östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen ausübt, in keiner dieser Studien berücksichtigt oder korrigiert. Nur Yang *et al.* erkannten dieses Problem in einer Genexpressionsstudie zur Funktion des Östrogenrezeptor und umgingen es mithilfe der Laser-Mikrodissektion [217]. In allen anderen Fällen ergab sich aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ein differenzierteres Bild von den Genexpressionsunterschieden, welche in der Literatur zwischen östrogenrezeptorpositiven und östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen beschrieben wurden. Es ist wahrscheinlich, dass diese zum größten Teil auf das bevorzugte Auftreten einer lymphozytären Infiltration in östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen zurückzuführen waren, wodurch in den nachfolgenden

Datenanalysen eine systematische Messabweichung auftrat. Dadurch könnten bei Durchführung statistischer Tests und Hierarchical Clusterings große Genexpressionsunterschiede aufgrund des Östrogenrezeptorstatus vorgetäuscht worden sein, wo tatsächlich lymphozytenspezifische Gene vorhanden waren.

4.1.10 GO-Analyse der differentiell exprimierten Gene aufgrund des Hormonrezeptorstatus

44 Gene wurden zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen differentiell exprimiert (Tabelle 12). Da der Östrogenrezeptor das Wachstum von Mammakarzinomen anregt, wurde mithilfe einer GO-Analyse untersucht, ob überdurchschnittlich viele Gene am Zellwachstum beteiligt waren. Dabei wurde drei überrepräsentierte GO-Kategorien gefunden: „Negative Regulation des Wachstums über den Zellzyklus“, „Regulation der Proliferation“ und „Negative Regulation der Zellproliferation“ mit den Genen *BTG3*, *BTG2*, *EGFR*, *ESR1*, *EXT1* und *FABP7* (Abb. 8, Tabelle 13). Allerdings waren 44 Gene für die Durchführung einer GO-Analyse relativ wenig und es existierten keine verlässlichen Informationen darüber, welches Signifikanzniveau für einen statistischen Test sinnvoll war, wenn anschließend eine GO-Analyse durchgeführt werden sollte. Daher wurde eine zweite GO-Analyse mit differentiell exprimierten Genen durchgeführt, die bei einem Signifikanzniveau von 0.05 erhalten wurden. In diesem Fall wurden 18 überrepräsentierte GO-Kategorien gefunden, darunter jene für „Zellproliferation“ mit 20 Genen und einem p-Wert von 0.005 im Fischers-Exakt-Test (Abb. 9, Tabelle 14). Die Ergebnisse der beiden GO-Analysen deuteten darauf hin, dass unter den 44 differentiell exprimierten Genen eine überdurchschnittlich hohe Anzahl Funktionen beim Zellwachstum ausübte.

4.1.11 Differentiell exprimierte Gene mit Relevanz für das Zellwachstum

Unter den 44 differentiell exprimierten Genen zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen befanden sich, neben dem Gen für den Östrogenrezeptor selbst, fünf Gene, die an Prozessen des Zellwachstums beteiligt waren: *BTG3*, *BTG2*, *EGFR*, *EXT1* und *FABP7*. Bei der Interpretation dieser Gene musste beachtet werden, dass hormonrezeptorpositive und hormonrezeptornegative Mammakarzinome unterschiedliche Wege zur Wachstums-

Stimulation einschlagen: Im ersten Fall stimuliert überwiegend der aktivierte Östrogenrezeptor, im letzteren Fall werden epidermale Wachstumsfaktoren benutzt, um das maligne Wachstum zu ermöglichen.

4.1.11.1 BTG3/BTG2

BTG2 und *BTG3* gehören zu einer Familie von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind und eine negative Wirkung auf die Proliferation von Zellen ausüben [218]. Für Proteine der BTG-Familie ist der Besitz einer BTG1-Homologiedomäne am aminoterminalen Ende charakteristisch.

4.1.11.2 BTG2

BTG2 wurde als Gen entdeckt, dessen Expression durch mitogene Substanzen und Wachstumsfaktoren induziert wurde. In PC12- und Swiss 3T3-Zellen konnte *BTG2* durch Tetradecanoylphorbolacetat, *IL6* und den Wachstumsfaktoren *NGFB*, *BFGF*, *EGF* und *FGF* zur Expression gebracht werden [219-221]. Obwohl die Expression von *BTG2* durch Wachstumsfaktoren angeregt wurde, stellten die meisten Studien eine antiproliferative Wirkung von BTG2 fest [221,222]. Aufgrund der bisherigen Studien wurde BTG2 als potentiellen Tumor Suppressor aufgefasst [223]. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die antiproliferative Wirkung des BTG-Proteins von der Lokalisation abhing: Nukleäres BTG2 inhibierte Wachstum, während cytoplasmatisches BTG2 keine antiproliferative Wirkung zeigte [224]. In *ErbB2*-transformierten NIH3T3-Krebszellen wurde beobachtet, dass die antiproliferative Wirkung von BTG2 durch Transport in das Cytoplasma aufgehoben wurde [224]. In dieser Arbeit wurde *BTG2* stärker exprimiert, wenn das Mammakarzinom östrogenrezeptornegativ war. Da die Expression von BTG2 durch Wachstumsfaktoren induziert wurde [219-221], wäre eine naheliegende Erklärung, dass die stärkere Aktivität von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. EGFR) in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen die Expression von *BTG2* auslöste. In diesem Fall müsste das induzierte BTG2-Protein aber eine inhibierende Wirkung ausüben. In Mammakarzinom-Zellen sollte man daher einen Selektionsdruck erwarten, um diese Inhibition wieder aufzuheben. Daher wäre es interessant, die Lokalisation von BTG2 in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen zu untersuchen, um die Hypothese zu testen, dass Krebszellen BTG2 durch Transport ins Cytoplasma inaktivieren können [224].

4.1.11.3 BTG3

BTG3 wurde 1997 kloniert und zeigte eine zellzyklusabhängige Expression [225]. Es wird angenommen, dass *BTG3* die Proliferation negativ beeinflusst und als Tumorsuppressor wirkt. Ein möglicher Hinweis darauf lieferte die Beobachtung, dass *BTG3* die SRC Tyrosin-Kinase inhibierte [226]. *BTG3* wurde in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen schwächer exprimiert als in hormonrezeptornegativen Brustkrebsgeweben. Die geringe Anzahl an Studien über *BTG3* macht die Interpretation allerdings schwierig. Eine naheliegende Arbeitshypothese wäre, dass der aktivierte Östrogenrezeptor *BTG3* inhibiert.

4.1.11.4 EGFR

EGFR gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und fördert die Proliferation durch Aktivierung der Pathways von NF-kappaB, Phosphatidylinositol-3-kinase, Phospholipase C- γ 1 und *Grb2/Sos* [227-229]. Die Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. *EGFR* und *ErbB2*) in östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen wurde in zahlreichen Arbeiten gezeigt. Es wird angenommen, dass epidermale Wachstumsfaktoren die Proliferation von östrogenrezeptornegativen Brustkrebsgeweben fördern. Diese Auffassung wurde vom Ergebnis der vorliegenden Arbeit bestätigt, da *EGFR* in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen überexprimiert war.

4.1.11.5 EXT1

EXT1 wurde als Gen identifiziert, das mit der erblichen Exostose assoziiert war [230]. Später konnte gezeigt werden, dass Mutationen oder Deletionen dieses Gens zu Knochentumoren führten und das Risiko erhöhten, an Osteosarkoma zu erkranken [231-234]. Darum wird eine Rolle von *EXT1* als Tumor Suppressor-Gen vermutet. In dieser Arbeit konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen *EXT1*-Expression und dem Hormonrezeptorstatus beobachtet werden: Die Expression von *EXT1* war in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen schwächer als in hormonrezeptornegativem Brustkrebsgeweben. Möglicherweise inhibiert ein aktiver Östrogenrezeptor im Mammakarzinom die Expression von *EXT1* und fördert auf diese Weise die Proliferation.

4.1.11.6 FABP7

FABP7 wurde im menschlichen Gehirn isoliert und mit einer Funktion bei der Fettsäurebindung in Zusammenhang gebracht [235]. Dort transportiert *FABP7* hydrophobe Substanzen wie z.B. Fettsäuren und wurde mit krebsrelevanten

Prozessen assoziiert. In neuronalem Gewebe wurde *FABP* durch EGFR zur Expression angeregt und fördert die Migration von Krebszellen [236]. Im Drüsengewebe der Brust hingegen wurden tumorinhibierende Wirkungen beschrieben. Dort verringert *FABP7* das Wachstum von Brustkrebsgeweben [237,238]. In dieser Arbeit wurde *FABP7* in hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen schwächer exprimiert als in Brustkrebsgeweben ohne Hormonrezeptorexpression. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass Östrogenrezeptoraktivität *FABP7* inhibiert. Diese Hypothese erscheint am plausibelsten, da sie Beobachtungen berücksichtigt, die im Brustgewebe gemacht wurden und nicht im Gewebe von Nervenzellen. Dennoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die EGFR-Aktivität, welche in hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen stärker war, auch im Drüsengewebe der Brust die Expression von *FABP7*-Expression anregen könnte. Weiterführende Studien müssen diese Frage beantworten.

4.1.12 Zusammenfassung

Mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie wurden die Genexpressionsunterschiede zwischen 78 hormonrezeptorpositiven und 43 hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen bestimmt. Dabei wurde das Vorliegen einer systematischen Messabweichung entdeckt, die durch das bevorzugte Auftreten einer lymphozytären Infiltration in hormonrezeptornegativen Brustkrebsgeweben hervorgerufen wurde. Mithilfe einer Varianzanalyse wurde diese systematische Messabweichung korrigiert und festgestellt, dass die Genexpressionsunterschiede zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen wesentlich geringer waren als in den bisher publizierten Studien beschrieben wurde. GO-Analysen konnten zeigen, dass von 44 differentiell exprimierten Genen bezüglich des Hormonrezeptorstatus überdurchschnittlich viele Funktionen beim Zellwachstum ausübten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei positivem Hormonrezeptorstatus das antiproliferative Gen *BTG3*, der putative Tumor-Suppressor *EXT1* und das wachstumsinhibierende Gen *FABP7* inhibiert werden, wodurch die Proliferation östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome gefördert wird.

4.2 Gene assoziiert mit dem Histologischen Grading

4.2.1 Einführung in das Histologische Grading

Das Histologische Grading beurteilt das Aussehen eines malignen Gewebes unter dem Mikroskop und wird von Pathologen durchgeführt. Dabei werden Anomalien erfasst, die ein Krebsgewebe von gesundem Gewebe unterscheiden, z.B. morphologische Abweichungen, Anomalien in der Anordnung des Zellverbands, erhöhte Zellteilungsrate u.s.w. Für verschiedene Krebsarten wurden unterschiedliche Grading-Systeme entwickelt, mit denen die histomorphologischen Veränderungen im Gewebe erfasst werden können. Beim Mammakarzinom wird das Grading üblicherweise nach dem so genannten Bloom-Richardson-System durchgeführt [64]. Dieses Grading-System berücksichtigt die Tubulusausbildung, die Kernpolymorphie und die Mitoserate und teilt Mammakarzinome aufgrund dieser Parameter in eine von drei Grading-Gruppen ein (Tabelle 3). Im Zusammenhang mit dem Histologischen Grading wird oft auch von der Differenzierung oder Entartung eines Gewebes gesprochen. Man bezeichnet Krebsgewebe der Grading-Gruppe 1 als gut differenziert, jene der Grading-Gruppe 2 als mäßig differenziert und Karzinome der Grading-Gruppe 3 werden schlecht differenziert oder wenig differenziert genannt. Zahlreiche Studien belegen den prognostischen Wert des Histologischen Gradings: Je weniger differenziert das Mammakarzinom ist, desto schlechter ist die Prognose des Brustkrebs-Patienten [3,65-67].

4.2.2 Histologisches Grading und Genexpressionsänderungen

Zwei Studien untersuchten Genexpressionsänderungen aufgrund des Histologischen Gradings. Sotiriou *et al.* haben in 64 östrogenrezeptorpositiven Brustkrebsgeweben 97 Gene gefunden, die zwischen Mammakarzinomen der Grading-Gruppen 1 und 3 differentiell exprimiert wurden [239]. Die meisten Gene wurden dabei in wenig differenzierten Mammakarzinomen stärker exprimiert als in gut differenzierten Brustkrebsgeweben und übten Funktionen im Zellzyklus und bei der Proliferation aus. Mithilfe dieser Gene konnte die Ähnlichkeit von Mammakarzinomen der Grading-Gruppe 2 zu gut differenzierten bzw. schlecht differenzierten Brustkrebsgeweben bestimmt werden. Die Prognose der Patienten war dabei umso besser, je stärker die Expression des Brustkrebs dem eines gut differenzierten Mammakarzinoms ähnelte. [239]. In einer weiteren Untersuchung mit 61 lasermikrodissezierten Mammakarzinomen haben Ma *et al.* 200 Gene gefunden, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren. Die Autoren vermuteten einen

Zusammenhang zwischen einem Teil dieser Gene und der Invasivität der Mammakarzinome. [240].

4.2.3 Gene assoziiert mit dem Histologischen Grading

Das Histologische Grading von 118 Brustkrebs-Patienten wurde von Pathologen der Medizinischen Universität Graz ermittelt. Eine Überlebenszeitanalyse zeigte, dass die Prognose der Patienten mit zunehmender Grading-Gruppe abnahm, wie es der Erwartung entsprach (Abb.10). Mithilfe einer SAM-Analyse für stetige Werte, die eine Teststatistik auf Grundlage der linearen Regression benutzte, konnten 113 Gene gefunden werden, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren (Abb.11, Tabelle 15). Mit diesen Genen wurde eine KEGG Pathway-Analyse durchgeführt, welche den Zellzyklus-Pathway mit den Genen *PRKDC*, *CCNB1*, *PTTG1* und *CDC20* überrepräsentiert fand (Abb.12a). Auch eine Wiederholung der Analyse mit einer Genliste, die bei einem Signifikanzniveau von 20% falsch Positiven erhalten wurde und 526 Gene umfasste, ergab als einzig überrepräsentierten Pathway jenen des Zellzyklus (Abb.12b). Analog dazu wurden GO-Analysen mit Genlisten, die bei Signifikanzniveaus von 5% falsch Positiven und 20% falsch Positiven erhalten wurden, durchgeführt. In beiden Fällen waren die drei GO-Kategorien „Mitotischer Zellzyklus“, „M-Phase des mitotischen Zellzyklus“ und „Mitose“ überrepräsentiert (Abb.12, Tabelle 16, Abb.14). Daraus konnte man schließen, dass überdurchschnittlich viele Gene Funktionen bei der mitotischen Zellteilung ausübten. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Sotiriou *et al.* überein, die ebenfalls eine Dominanz von Genen beschrieben, die mit Zellzyklus und Proliferation zu tun hatten. Beim Histologischen Grading wird die Mitoserate berücksichtigt und wenig differenzierte Mammakarzinome teilen sich schneller als gut differenzierte Brustkrebsgewebe. Daher erschien es plausibel, dass überdurchschnittlich viele Gene, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren, funktionell an der Zellteilung beteiligt waren.

4.2.4 Grading-Gene und Prognose

Um festzustellen, ob die Expression der 113 Gene prognostischen Wert hatte, wurde zunächst eine SAM Survival Analyse mit allen 14 065 Genen durchgeführt, die für Genexpressionsmessungen zur Verfügung standen. Anschließend wurden alle Gene gemäß ihrer Korrelation zu der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten

angeordnet. Das Gen, dessen Expression am stärksten mit einer kurzen Überlebenszeit korrelierte, erhielt den Rang 1. Jenem Gen, dessen Expression am stärksten mit einer langen Überlebenszeit korrelierte, wurde der Rang 14 065 zugewiesen. Gene, die in gut differenzierten Mammakarzinomen stärker exprimiert wurden, korrelierten mit einer hohen Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten. Gene, die in schlecht differenzierten Brustkrebsgeweben eine stärkere Expression zeigten, korrelierten mit einer schlechten Prognose (Abb.15). Die Wahrscheinlichkeit, eine derartige Rangverteilung bei Zutreffen der Nullhypothese zu erhalten, konnte mithilfe des Wilcoxon-Tests überprüft werden und ergab hochsignifikante p-Werte. Die Expression der Gene, welche mit dem Histologischen Grading assoziiert waren, korrelierte also mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Brustkrebspatienten. Mithilfe der Expressionswerte von Genen, welche die Differenzierung des Mammakarzinoms charakterisieren, könnte also dieselbe prognostische Information erhalten werden wie bei Durchführung des Histologischen Gradings durch einen Pathologen.

4.2.5 Grading-Gene in der Literatur

Von den 113 Genen, die mit dem Histologischen Grading assoziiert waren, wurden 12 Gene auch in der Studie von Sotiriou *et al* gefunden: Die Gene *NUSAP1*, *PRC1*, *RRM2*, *CDC20*, *MAD2L1*, *BM039*, *H2AFZ*, *CDKN3*, *DC13* und *CCNB1* zeigten in Mammakarzinomen der Grading-Gruppe 3 stärkere Expression, während *CYBRD1* und *LAMB2* in Brustkrebsgeweben der Grading-Gruppe 1 stärker exprimiert wurden (Tabelle 19). Mit der Arbeit von Ma *et al* [240] überschritten sechs Gene: *RRM2*, *CTSL*, *CDKN3*, *TOP2A* waren in schlecht differenzierten Mammakarzinomen stärker exprimiert, während *LAMB2* und *BCL2* stärkere Expression in gut differenziertem Brustkrebsgewebe zeigte (Tabelle 19). Die Gene *RRM2*, *CDKN3* und *LAMB2* wurden in allen drei Arbeiten gefunden. Dabei musste auch die Orientierung der Genexpression überprüft werden. Es hätte sein können, dass die Expression eines Gens in einer Studie stärker war, während in einer anderen Studie für dasselbe Gen in derselben Situation eine schwache Expression vorgefunden wurde. Tatsächlich wurden bei keinem dieser Gene widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Diese Konsistenz erhöhte nicht nur das Vertrauen in die Resultate. Man konnte daraus schließen, dass mehrere Gene in drei verschiedenen Patientenkollektiven ähnliche Genexpressionsänderungen aufgrund der Differenzierung des Mammakarzinoms

zeigten. Daher kann man die Hypothese aufstellen, dass bei der Entartung eines Mammakarzinoms biologische Veränderungen auftreten, die zumindest teilweise bei jedem Patienten gleich verlaufen und daher zu identischen Genexpressionsänderungen führen. In diesem Fall wären Gene, die mit dem Histologischen Grading assoziiert sind, in doppelter Hinsicht attraktiv für die Brustkrebsforschung. Einerseits könnte man versuchen, mithilfe dieser Gene Einblick in biologische Veränderungen zu gewinnen, die bei der Entartung des Mammakarzinoms stattfinden. Andererseits könnte die Durchführung eines Molekularen Gradings möglich werden, bei dem die Expression von Genen gemessen wird, welche für die Differenzierung des Mammakarzinoms charakteristisch sind. Auf diese Weise wäre eine objektivere und vielleicht auch präzisere Durchführung des Gradings möglich, da die bisher übliche Beurteilung der Gewebeschnitte durch Pathologen von subjektiven Faktoren beeinflusst wird und Variationen zeigen kann [241-243].

Tabelle 19: Überschneidung mit Sotiriou *et al.* [239] und Ma *et al.* [240]

Überschneidung mit Sotiriou <i>et al.</i>			
RZPD-ID	Unigene-ID	Gen-Symbol	Rang Survival Analyse
Gene mit stärkerer Expression in schlecht differenziertem als in gut differenziertem Brustkrebsgewebe:			
IMAGp998D14670	Hs.511093	NUSAP1	10
IMAGp998N171933	Hs.459362	PRC1	29
IMAGp998J01977	Hs.226390	RRM2	97
IMAGp998D22135	Hs.524947	CDC20	127
IMAGp998J21134	Hs.533185	MAD2L1	383
RZPDp201H0411D	Hs.283532	BM039	472
RZPDp201C0413D	Hs.119192	H2AFZ	804
IMAGp998A19654	Hs.84113	CDKN3	979
IMAGp998A061864	Hs.388255	DC13	1534
IMAGp998E011780	Hs.23960	CCNB1	2290
Gene mit stärkerer Expression in gut differenziertem als in schlecht differenziertem Brustkrebsgewebe			
IMAGp998L02560	Hs.221941	CYBRD1	13962
IMAGp998E20251	Hs.439726	LAMB2	13909
Überschneidung mit Ma <i>et al.</i>			
RZPD-ID	Unigene-ID	Gen-Symbol	Rang Survival Analyse
Gene mit stärkerer Expression in schlecht differenziertem als in gut differenziertem Brustkrebsgewebe:			
IMAGp998J01977	Hs.226390	RRM2	97
RZPDp201B1019D	Hs.418123	CTSL	239
IMAGp998A19654	Hs.84113	CDKN3	979
RZPDp1096C092D	Hs.156346	TOP2A	3815
Gene mit stärkerer Expression in gut differenziertem als in schlecht differenziertem Brustkrebsgewebe			
IMAGp998E20251	Hs.439726	LAMB2	13909
IMAGp998G145245	Hs.150749	BCL2	13891

4.2.6 Der Nutzen weiterer Genexpressionsstudien zur Analyse des Histologischen Gradings

Bevor ein Molekulares Grading realisiert werden kann, müssen jene Gene identifiziert werden, die unabhängig von der verwendeten Mikroarray-Plattform und

unabhängig vom jeweils untersuchten Patientenkollektiv mit dem Histologischen Grading assoziiert sind. Dass ein derartiges Vorgehen Erfolg haben kann, zeigt die Konsistenz, welche zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und jenen von Sotiriou *et al.* und Ma *et al.* zu beobachten war [239,240]. Der prognostische Wert der Gene konnte sowohl in dieser Arbeit als auch bei Sotiriou *et al.* gezeigt werden. Es ist daher die persönliche Überzeugung des Autors, dass der Analyse von Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Histologischen Grading bisher zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde.

4.2.7 Zusammenfassung

In 118 Brustkrebsgeweben wurden mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie Genexpressionsänderungen aufgrund des Histologischen Gradings gemessen. Eine Teststatistik mit linearer Regression wurde eingesetzt, um den progressiven und graduellen Charakter des Histologischen Gradings zu erfassen und 113 Gene zu identifizieren, deren Expression mit der Differenzierung des Brustkrebsgewebes korrelierte. KEGG-Pathway- und GO-Analysen zeigten, dass überdurchschnittlich viele dieser Gene Funktionen bei der mitotischen Zellteilung ausübten. Mithilfe einer SAM Survival Analyse wurde gezeigt, dass die Expression dieser Gene mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Brustkrebs-Patienten korrelierte. Damit wurde die Möglichkeit aufgezeigt, mithilfe der Expressionswerte von Genen, welche die Differenzierung des Mammakarzinoms charakterisieren, dieselbe prognostische Information zu erhalten wie bei Durchführung des Histologischen Gradings durch einen Pathologen. Die Konsistenz der Daten wurde durch einen Vergleich mit Ergebnissen von Sotiriou *et al.* [239]. und Mao *et al.* [240] gezeigt und der Nutzen weiterer Genexpressionstudien zur Analyse des Histologischen Gradings diskutiert.

4.3 Gene assoziiert mit dem Tumor Staging

4.3.1 Einführung in das Tumor Staging

Beim Tumor Staging werden die Größe des Primärtumors zum Diagnosezeitpunkt, die Ausbreitung des Tumorgewebes in die Lymphknoten der Brust oder der Achselhöhlen und das Vorliegen von Fernmetastasen ermittelt. Auf Grundlage dieser Parameter werden die Patienten einer von vier Staging-Gruppen zugeordnet (Tab. 2). Das Tumor Staging wurde vom französischen Chirurgen Pierre Denoix entwickelt

[244] und von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) standardisiert [245]. Heute arbeitet die UICC eng mit der AJCC (American Joint Committee on Cancer) zusammen, um einheitliche Richtlinien bei der Durchführung des Tumor Stagings zu gewährleisten.

4.3.2 Bedeutung des Tumor Stagings

Das Tumor Staging wurde entwickelt, um prognostische Informationen zu erhalten, die Behandlung der Patienten zu planen und den Informationsaustausch zwischen onkologischen Zentren zu erleichtern. Außerdem kann der Erfolg von Vorsorge-Untersuchungen abgeschätzt werden, weil mit Hilfe des Tumor Stagings der Anteil jener Patienten ermittelt werden kann, der in einem frühen Stadium der Erkrankung entdeckt wird. In einer Untersuchung der National Cancer Data Base, die 240031 Brustkrebspatienten umfasste, wurden in Abhängigkeit vom Tumor Staging folgende 10-Jahres-Überlebensraten beobachtet: Stage 0: 95 %, Stage I: 88%, Stage II: 66%, Stage III: 36% und Stage IV: 7% [63].

4.3.3 Tumor Staging und Genexpression

Die Größe des Primärtumors, der Lymphknotenbefall und das Vorliegen von Fernmetastasen wurden von Onkologen der Medizinischen Universität Graz ermittelt. Die zur Verfügung stehenden Daten erlaubten es, das Tumor Staging von 109 Mammakarzinom-Patienten zu bestimmen: 23 Patienten waren Stage 1, 60 Patienten Stage 2, 18 Patienten Stage 3 und 8 Patienten hatten Fernmetastasen und waren daher Stage 4. Eine Darstellung im Kaplan-Meyer-Plot zeigt, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit der 109 Patienten vom Tumor Staging abhängig war und bei zunehmender Staging-Gruppe erwartungsgemäß abnahm (Abb.16). Um Gene zu finden, die mit dem Tumor Staging assoziiert waren, wurde eine SAM-Analyse für stetige Werte durchgeführt. Dabei war die Expression keines einzigen Gens mit dem Tumor Staging assoziiert. Zusätzlich wurden Analysen mit den Faktoren Tumorgröße und Lymphknotenbefall durchgeführt. Auch in diesen Fällen wurden keine Gene gefunden, deren Expression sich aufgrund der Tumorgröße oder des Lymphknotenbefalls verändert hätte. Dabei war ein zu stringentes Signifikanzniveau nicht die Ursache der negativen Testergebnisse. Die Expression der Gene zeigte nicht die geringste Korrelation mit den getesteten Parametern. Die Möglichkeit eines molekularen Stagings wird in drei Publikationen theoretisch

diskutiert [246-248]. Reale Genexpressionsänderungen aufgrund des Tumor Stagings wurden in der Literatur allerdings nicht beobachtet, ebenso wenig in dieser Arbeit. Diese Umstände deuten darauf hin, dass das Tumor Staging die zugrundeliegenden molekulare Veränderungen bei der Progression des Tumorgewebes nicht erfasst. Tatsächlich gehen morphologische und histologische Veränderungen des Tumors nicht in das Tumor Staging ein. Außerdem liefert das Tumor Staging keine Information darüber, wie schnell ein Tumor wächst: Ein kleiner Primärtumor kann auch schneller wachsen als ein großer Primärtumor. Die Wachstumsgeschwindigkeit hat also nichts mit dem Ausgang des Tumor Stagings zu tun. Es erscheint daher naheliegend, dass das Tumor Staging ausschließlich ein Maß dafür darstellt wie fortgeschritten die Erkrankung ist bzw. zu welchem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes ein Patient zur Therapie gelangt.

4.3.4 Zusammenfassung

In 109 Mammakarzinomen wurden keine Genexpressionsänderungen aufgrund des Tumor Stagings gefunden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Tumor Staging keine zugrundeliegenden molekularen Veränderungen während der Tumorprogression erfasst, sondern lediglich ein Maß dafür darstellt, wie fortgeschritten die Krankheit ist bzw. zu welchem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes ein Patient zur Therapie gelangt.

4.4 Transkriptionelle Änderungen bei Überexpression von ErbB2

4.4.1 Funktion des Protoonkogens ErbB2

Das Protoonkogen *ErbB2* codiert einen Rezeptor mit Tyrosin-Kinase-Aktivität, der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR, epidermal growth factor receptor) gehört [249]. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt, indem ErbB2 nach Bindung des Liganden mit einem anderen Mitglied der Wachstumsfaktor-Rezeptoren dimerisiert [250]. Dabei kann sowohl ein Homodimer mit einem anderen ErbB2-Rezeptor als auch ein Heterodimer mit EGFR, ErbB3 oder ErbB4 gebildet werden [251]. Anschließend werden Tyrosin-Reste im intrazellulären Bereich des Rezeptors phosphoryliert [252]. Die Phosphorylierungen aktivieren ErbB2, das anschließend zahlreiche Signaltransduktionswege beeinflusst, darunter den

Ras/Mitogenaktivierten Proteinkinase-Pathway, Januskinasen-Pathway, PI3K-Pathway und den PLC- γ -Pathway [253,254].

4.4.2 Auswirkungen einer Überexpression von ErbB2

ErbB2-Überexpression in Krebszellen fördert Zellproliferation, substratunabhängiges Wachstum, Zellmigration, Invasivität, Angiogenese und erhöht außerdem das metastatische Potential [255-258]. Auf molekularer Ebene führt überexprimiertes *ErbB2* zur Aktivierung der Aromatase [259], verstärkter Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR4 [260] und erhöhten Mengen von Cox-2 [259]. Die Synthese von *VEGFR* [258] und *Src* [261] wird ebenfalls angeregt. Außerdem werden Krebszellen durch *ErbB2*-Überexpression resistenter gegen Apoptose [262,263]. Mammakarzinome mit hoher Expression von *ErbB2* zeichnen sich durch hohe Rückfallraten, einer aggressiven Tumorbilogie und geringen Überlebenszeiten der Patienten aus [109,118,183-185].

4.4.3 Lokalisation des Erbb2-Gens und genomische Amplifikation

Das *ErbB2*-Gen befindet sich im Chromosom 17 und wurde den Regionen 17q21.1 und 17q11.2-q12 zugeordnet. In einer aktuellen Version des NCBI Map Viewer wird *ErbB2* in der Region 17q12 angezeigt (Abb.22). Sowohl im Mammakarzinom [264,265] als auch in zahlreichen anderen Karzinomen [266-270] erfolgt die Überexpression des ErbB2-Rezeptors durch eine Amplifikation der codierenden DNA im Genom [271-273]. Die Angaben über die Häufigkeit, mit der die genomische Amplifikation von 17q12 im Mammakarzinom auftritt, variieren in der Literatur und reichen von 10% aller Brustkrebspatienten bis 34%, wenn die Ergebnisse von 54 Studien zusammengefasst werden [68]. Am häufigsten wird von einer 17q12-Amplifikation in 20-25% aller Mammakarzinom-Patienten ausgegangen. Diese Werte wurden von Slamon *et al.* in den ersten Publikationen zur *ErbB2*-Amplifikationen angegeben, die sehr oft zitiert werden. [109,266].

PPP1R1B	+	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q12
STARD3	+	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q11-q12
TCAP	+	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q12
LOC728108	†			sv	pr	dl	ev	mm					protein	17q12
PNMT	+	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q21-q22
PERLD1	†		HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts		SNP	best RefSeq	17q12
ERBB2	+	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts		SNP	best RefSeq	17q21.1
C17orf37	†		HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts		SNP	best RefSeq	17q12
GRB7	+	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q12
LOC728110	↓			sv	pr	dl	ev	mm					protein	17q12
ZNFN1A3	†	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q21
ZPBP2	+	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm		CCDS	SNP	best RefSeq	17q12
GSDML	†		HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts		SNP	best RefSeq	17q12
ORMDL3	†		HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q12-q21.1
LOC728129	↓			sv	pr	dl	ev	mm	hm				mRNA	17q12
GSDM1	↓		HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts		SNP	best RefSeq	17q12
PSMD3	↓		HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q12-q21.1
CSF3	+	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q11.2-q12
THRAP4	†	OMIM	HGNC	sv	pr	dl	ev	mm	hm	sts	CCDS	SNP	best RefSeq	17q21.1
LOC728149	↓			sv	pr	dl	ev	mm					mRNA	17q21.1

Abbildung 22: Lokalisation des Protoonkogens ErbB2 in Chromosom 17

Darstellung der chromosomalen Region 17q12, in der sich das Protoonkogen *ErbB2* gemäß der aktuellen Version (*Homo sapiens*, Build 36.2) des NCBI Map Viewer befindet. Die Gene *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *ORMDL3* und *THRAP4* befinden sich alle in unmittelbarer Nähe des *ErbB2*-Gens.

4.4.4 ErbB2-überexprimierende Patienten in dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Genexpression von 126 Mammakarzinom-Patienten gemessen. Davon zeigten 23 Patienten eine ca. 50-100 mal stärkere Expression von *ErbB2* und wurden daher als *ErbB2*-überexprimierende Patienten definiert (Abb.18). 18% der Patienten hatten demnach ein Mammakarzinom, das *ErbB2* überexprimierte. Diese Beobachtung stimmt gut mit den in der Literatur publizierten Ergebnissen überein. Eine Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan-Meyer-Plot und Log-Rank-Test konnte zeigen, dass die *ErbB2*-überexprimierenden Patienten eine schlechtere Prognose hatten als die übrigen Patienten (Abb.19), was ebenfalls mit den Erkenntnissen aus der Literatur übereinstimmt [118,183-185]. Außerdem konnte man in einem Vorversuch mit 51 Patienten feststellen, dass die Expression von *ErbB2*, welche mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie gemessen wurde, mit der Expression des ErbB2-Rezeptors korrelierte, die mithilfe des HercepTests auf Proteinebene ermittelt wurde (Abb.17).

4.4.5 Transkriptionelle Änderungen bei ErbB2-Überexpression

Es wurden 23 Patienten identifiziert, die *ErbB2* überexprimierten. Außerdem lagen für 126 Brustkrebspatienten Expressionsmessungen von 14065 Genen vor. Diese Umstände erlaubten es, transkriptionelle Änderungen zu untersuchen, die bei einer *ErbB2*-Überexpression in Mammakarzinomen auftraten. Mithilfe eines Student's t-Test zwischen *ErbB2*-überexprimierenden Patienten und Patienten mit normaler Expression von *ErbB2* wurden sieben differentiell exprimierte Gene gefunden (Tab.18) Davon waren sechs Gene bei den *ErbB2*-überexprimierenden Patienten stärker exprimiert als im restlichen Patientenkollektiv: *ErbB2* selbst, sowie *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *ORMDL3* und *THRAP4* (Abb.20, 21). Zahlreiche Studien haben eine stärkere Transkription von *PERLD1* [265,274], *GRB7* [264,265,275-277], *STARD3* [264,274,278-280], und *THRAP4* [274,281] in Patienten mit *ErbB2*-Überexpression beschrieben und mithilfe einer genomische Amplifikation der Region 17q12 erklärt [274,275]. Wie Abb.22 zeigt, liegen alle Gene, die in *ErbB2*-überexprimierenden Patienten stärker transkribiert wurden, in unmittelbarer Nähe von *ErbB2*. Daraus kann man schließen, dass *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, *ORMDL3* und *THRAP4* gemeinsam mit *ErbB2* überexprimiert wurden, weil sich diese sieben Gene auf dem 17q12-Amplikon befanden. Neuartig war die Entdeckung, dass *ORMDL3* mit *ErbB2* koexprimiert wurde. Vermutlich konnte diese Beobachtung in den bisher durchgeführten Studien nicht gemacht werden, da *ORMDL3* relativ spät entdeckt wurde. *ORMDL3* codiert ein Transmembranprotein des Endoplasmatischen Reticulums und gehört mit *ORMDL1* und *ORMDL2* zu einer Genfamilie, die im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert wird [282]. Die Existenz homologer Gene in verschiedenen Organismen, angefangen von Hefe bis zu den Wirbeltieren, deutet auf eine konservierte Funktion der *ORMDL*-Familie. Es wird vermutet, dass *ORMDL3* an der Proteinfaltung im Endoplasmatischen Reticulum beteiligt ist [282]. Krebsrelevante Prozesse wurden bislang nicht mit *ORMDL3* in Zusammenhang gebracht.

Die häufige Amplifikation der Region 17q12, die auch in vielen anderen Karzinomen beobachtet wurde [266-270], deutet darauf hin, dass die Überexpression eines oder mehrerer Gene des 17q12-Amplikons dem Tumor einen Selektionsvorteil verschafft. Dass ein derartiger Vorteil durch die Überexpression von *ErB2* bewirkt werden kann, ist unbestritten. Es ist aber nicht auszuschließen, dass auch andere Gene, die bei Amplifikation von 17q12 überexprimiert werden, die Progression eines

Mammakarzinoms fördern könnten. Diese Möglichkeit wurde insbesondere für die Gene *GRB7* und *STARD3* diskutiert [283]. Das GRB7-Protein kann mithilfe seiner SH2-Domäne an eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität binden [284,285], unter anderem auch an ErbB2 [277]. Die Interaktionen zwischen GRB7 und diversen Oberflächenrezeptoren modulieren die Signaltransduktion zu verschiedenen Pathways unterhalb der Wachstumsfaktoren [285]. Mehrere Studien zeigten, dass GRB7 eine Schlüsselrolle bei der Zellmigration einnimmt [286-288] und dadurch die Tumorprogression fördern könnte. STARD3 wiederum ist ein Transmembranprotein mit starker Homologie zu START, das bei der Steroid-Hormon-Biosynthese eine wichtige Rolle spielt [289]. Es wurde gezeigt, dass STARD3 die Synthese von Steroidhormonen fördern kann [290]. Auf diese Weise könnte *STARD3* das Wachstum hormonabhängiger Karzinome fördern wie z.B. jenes östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome [289,291]. Es bedarf aber weiterer Studien, um feststellen zu können, ob *GRB7*, *STARD3* oder andere Gene des 17q12-Amplikons tatsächlich die Tumorprogression fördern und damit zum aggressiven Phänotyp von *ErbB2*-überexprimierenden Patienten beitragen.

Eine bislang nicht bekannte Beobachtung war die schwächere Expression des Gens *C20orf35* in *ErbB2*-überexprimierenden Mammakarzinomen. Alle transkriptionellen Veränderungen, die man bisher in Brustkrebs mit *ErbB2*-Überexpression feststellen konnte, betrafen Gene, die in der Region 17q12 lagen und aufgrund einer genomischen Amplifikation überexprimiert wurden. Man weiß nur sehr wenig über das Gen *C20orf35*, welches auch unter den Bezeichnungen *HSMNP1*, *DBNDD2* oder *Dysbindin domain containing 2* bekannt ist. *C20orf35* befindet sich im Chromosom 20q13.12 und codiert ein Protein mit 261 Aminosäuren, das eine Dysbindin-Domäne enthält. *C20orf35* zeigt 86% Homologie zu einem Ratten-Protein, das bei der Apoptose-Induktion in myelomonozytischen Stammzellen von Ratten als „immediate-early response gene“ exprimiert wurde [292]. Zusätzlich wurden Deletionen in *C20orf35* mit myeloproliferativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [292,293]. Es wäre daher denkbar, dass die reduzierte Expression von *C20orf35* zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose führt, was mit dem Phänotyp *ErbB2*-überexprimierender Mammakarzinome übereinstimmen würde [262,263].

4.4.6 Zusammenfassung

Mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie wurden transkriptionelle Änderungen gemessen, die bei einem Vergleich von 23 ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinomen mit 103 Brustkrebsgeweben auftraten, die eine normale *ErbB2*-Expression aufwiesen. Dabei wurden in Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression sieben Gene aufgrund einer genomischen Amplifikation der Region 17q12 überexprimiert: Neben den in der Literatur bekannten Genen *ErbB2*, *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, und *THRAP4* wurde auch *ORMDL3* stärker transkribiert, wenn *ErbB2* überexprimiert wurde. Eine neuartige Beobachtung war die verringerte Transkription des Gens *C20orf35* in Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression, das zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose führen könnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe der cDNA-Mikroarray-Technologie Genexpressionsänderungen in Brustkrebsgeweben gemessen, die mit den vier wichtigsten klinischen Parametern auf dem Gebiet der Brustkrebs-Behandlung einhergehen: Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus, dem Histologischen Grading, dem TNM-Status und der Expression des ErbB2-Rezeptors.

5.2 Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus

Zwischen 78 hormonrezeptorpositiven und 43 hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen wurden Genexpressionsunterschiede bestimmt. Dabei wurde das Vorliegen einer systematischen Messabweichung entdeckt, die durch das bevorzugte Auftreten einer lymphozytären Infiltration in hormonrezeptornegativen Brustkrebsgeweben hervorgerufen wurde. Mithilfe einer Varianzanalyse wurde diese systematische Messabweichung korrigiert und festgestellt, dass die Genexpressionsunterschiede zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen wesentlich geringer waren als in den bisher publizierten Studien beschrieben wurde. GO-Analysen konnten zeigen, dass von 44 differentiell exprimierten Genen bezüglich des Hormonrezeptorstatus überdurchschnittlich viele Funktionen beim Zellwachstum ausübten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei positivem Hormonrezeptorstatus das antiproliferative Gen *BTG3*, der putative Tumor-Suppressor *EXT1* und das wachstumsinhibierende Gen *FABP7* inhibiert werden, wodurch die Proliferation östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome gefördert wird.

5.3 Gene assoziiert mit dem Histologischen Grading

In 118 Brustkrebsgeweben wurden Genexpressionsänderungen aufgrund des Histologischen Gradings gemessen. Eine Teststatistik mit linearer Regression wurde eingesetzt, um den progressiven und graduellen Charakter des Histologischen Gradings zu erfassen und 113 Gene zu identifizieren, deren Expression mit der Differenzierung des Brustkrebsgewebes korrelierte. KEGG-Pathway- und GO-Analysen zeigten, dass überdurchschnittlich viele dieser Gene Funktionen bei der mitotischen Zellteilung ausübten. Mithilfe einer SAM Survival Analyse wurde gezeigt,

dass die Expression dieser Gene mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Brustkrebs-Patienten korrelierte. Damit wurde die Möglichkeit aufgezeigt, mithilfe der Expressionswerte von Genen, welche die Differenzierung des Mammakarzinoms charakterisieren, dieselbe prognostische Information zu erhalten wie bei Durchführung des Histologischen Gradings durch einen Pathologen.

5.4 Gene assoziiert mit dem TNM-Staging

In 109 Mammakarzinomen wurden keine Genexpressionsänderungen aufgrund des Tumor Stagings gefunden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Tumor Staging keine zugrundeliegenden molekularen Veränderungen während der Tumorprogression erfasst, sondern lediglich ein Maß dafür darstellt, wie fortgeschritten die Krankheit ist bzw. zu welchem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes ein Patient zur Therapie gelangt.

5.5 Transkriptionelle Änderungen bei Überexpression von ErbB2

Transkriptionelle Änderungen wurden gemessen, die bei einem Vergleich von 23 *ErbB2*-überexprimierenden Mammakarzinomen mit 103 Brustkrebsgeweben auftraten, die eine normale *ErbB2*-Expression aufwiesen. Dabei wurden in Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression sieben Gene aufgrund einer genomischen Amplifikation der Region 17q12 überexprimiert: Neben den in der Literatur bekannten Genen *ErbB2*, *PERLD1*, *GRB7*, *STARD3*, und *THRAP4* wurde auch *ORMDL3* stärker transkribiert, wenn *ErbB2* überexprimiert wurde. Eine neuartige Beobachtung war die verringerte Transkription des Gens *C20orf35* in Mammakarzinomen mit *ErbB2*-Überexpression, das zu einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose führen könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Schmidt-Matthiesen H., B.G.a.W.D. (2002) *Gynäkologische Onkologie*, Schattauer
- 2 du Toit, R.S. et al. (1989) Invasive lobular carcinomas of the breast--the prognosis of histopathological subtypes. *Br J Cancer* 60 (4), 605-609
- 3 Ellis, I.O. et al. (1992) Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 20 (6), 479-489
- 4 Martinez, V. and Azzopardi, J.G. (1979) Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants. *Histopathology* 3 (6), 467-488
- 5 Sastre-Garau, X. et al. (1996) Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 77 (1), 113-120
- 6 Winchester, D.J. et al. (1998) A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg* 186 (4), 416-422
- 7 Zafrani, B. et al. (2000) High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology* 37 (6), 536-545
- 8 Gamallo, C. et al. (1993) Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 142 (4), 987-993
- 9 Moll, R. et al. (1993) Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 143 (6), 1731-1742
- 10 Oka, H. et al. (1993) Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53 (7), 1696-1701
- 11 Palacios, J. et al. (1995) Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Am J Pathol* 146 (3), 605-612
- 12 Dixon, J.M. et al. (1982) Infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Histopathology* 6 (2), 149-161
- 13 Silverstein, M.J. et al. (1994) Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma? *Cancer* 73 (6), 1673-1677
- 14 Toikkanen, S. et al. (1997) Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. *Br J Cancer* 76 (9), 1234-1240
- 15 Peiro, G. et al. (2000) The influence of infiltrating lobular carcinoma on the outcome of patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Breast Cancer Res Treat* 59 (1), 49-54
- 16 Ashikari, R. et al. (1973) Infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Cancer* 31 (1), 110-116
- 17 Mersin, H. et al. (2003) Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma? *Eur J Surg Oncol* 29 (4), 390-395
- 18 Schön D., B.J., Görsch B. et al. (2004) *Die Dachdokumentation Krebs*
- 19 J, C.-C. (1997) Genetische Disposition bei Krebserkrankungen von Frauen. *Forum der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Schwerpunktthema FrauenLeben und Krebs* 8, 595-597

- 20 Beral, V. (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362 (9382), 419-427
- 21 Huang, Z. et al. (1997) Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *Jama* 278 (17), 1407-1411
- 22 Hunter, D.J. and Willett, W.C. (1993) Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15 (1), 110-132
- 23 van den Brandt, P.A. et al. (2000) Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 152 (6), 514-527
- 24 Smith-Warner, S.A. et al. (1998) Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *Jama* 279 (7), 535-540
- 25 Glade, M.J. (1999) Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition* 15 (6), 523-526
- 26 Vainio, H. et al. (2002) Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2, S94-100
- 27 Wohlfahrt, J. and Melbye, M. (2001) Age at any birth is associated with breast cancer risk. *Epidemiology* 12 (1), 68-73
- 28 Chang-Claude, J. et al. (2000) Breastfeeding and breast cancer risk by age 50 among women in Germany. *Cancer Causes Control* 11 (8), 687-695
- 29 Bernier, M.O. et al. (2000) Breastfeeding and risk of breast cancer: a metaanalysis of published studies. *Hum Reprod Update* 6 (4), 374-386
- 30 Claus, E.B. et al. (1994) Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 73 (3), 643-651
- 31 Pharoah, P.D. et al. (1997) Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 71 (5), 800-809
- 32 Miki, Y. et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266 (5182), 66-71
- 33 Wooster, R. et al. (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265 (5181), 2088-2090
- 34 Bonadona, V. et al. (2005) Contribution of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations to the incidence of breast cancer in young women: results from a prospective population-based study in France. *Genes Chromosomes Cancer* 43 (4), 404-413
- 35 Garcia-Higuera, I. et al. (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7 (2), 249-262
- 36 Moynahan, M.E. et al. (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 4 (4), 511-518
- 37 Xu, X. et al. (1999) Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet* 22 (1), 37-43
- 38 Bork, P. et al. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J* 11 (1), 68-76
- 39 Scully, R. et al. (1999) Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell* 4 (6), 1093-1099
- 40 Venkitaraman, A.R. (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108 (2), 171-182
- 41 Kerr, P. and Ashworth, A. (2001) New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Curr Biol* 11 (16), R668-676

- 42 Parkin, D.M. et al. (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94 (2), 153-156
- 43 Ziegler, R.G. et al. (1993) Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 85 (22), 1819-1827
- 44 Kliwer, E.V. and Smith, K.R. (1995) Breast cancer mortality among immigrants in Australia and Canada. *J Natl Cancer Inst* 87 (15), 1154-1161
- 45 Balzi, D. et al. (1993) Cancer in Italian migrant populations. Summary of the results by site. *IARC Sci Publ* (123), 193-292
- 46 Love, R.R. and Philips, J. (2002) Oophorectomy for breast cancer: history revisited. *J Natl Cancer Inst* 94 (19), 1433-1434
- 47 Colditz, G.A. (1993) Epidemiology of breast cancer. Findings from the nurses' health study. *Cancer* 71 (4 Suppl), 1480-1489
- 48 Rossouw, J.E. et al. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288 (3), 321-333
- 49 Yu, J.C. et al. (2006) Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the genes involved in the estrogen-receptor-signaling pathway: a multigenic study on cancer susceptibility. *J Biomed Sci*
- 50 Key, T.J. and Pike, M.C. (1988) The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24 (1), 29-43
- 51 Key, T. et al. (2002) Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 94 (8), 606-616
- 52 (1997) Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 350 (9084), 1047-1059
- 53 Russo, J. et al. (2006) 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *Faseb J* 20 (10), 1622-1634
- 54 Prall, O.W. et al. (1997) Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem* 272 (16), 10882-10894
- 55 Planas-Silva, M.D. and Weinberg, R.A. (1997) Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Biol* 17 (7), 4059-4069
- 56 Lippman, M.E. and Dickson, R.B. (1989) Mechanisms of normal and malignant breast epithelial growth regulation. *J Steroid Biochem* 34 (1-6), 107-121
- 57 Sutherland, R.L. et al. (1983) Effects of oestrogens on cell proliferation and cell cycle kinetics. A hypothesis on the cell cycle effects of antioestrogens. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19 (3), 307-318
- 58 MacGregor, J.I. and Jordan, V.C. (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 50 (2), 151-196
- 59 Engel J., H.D., Kerr J. and Schubert-Fritschle G. (2003) Epidemiologie. In *Mammakarzinome*, pp. 1-11, Tumorzentrum München und W.Zuckerschwerdt
- 60 Obermair, A. et al. (1994) [Tumoral vascular density in breast tumors and their effect on recurrence-free survival]. *Chirurg* 65 (7), 611-615
- 61 Singletary, S.E. et al. (2002) Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20 (17), 3628-3636

- 62 Woodward, W.A. et al. (2003) Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 21 (17), 3244-3248
- 63 Bland, K.I. et al. (1998) The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States. *Cancer* 83 (6), 1262-1273
- 64 Bloom, H.J. and Richardson, W.W. (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11 (3), 359-377
- 65 Elston, C.W. and Ellis, I.O. (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19 (5), 403-410
- 66 Latinovic, L. et al. (2001) Prognostic relevance of three histological grading methods in breast cancer. *Int J Oncol* 19 (6), 1271-1277
- 67 Galea, M.H. et al. (1992) The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22 (3), 207-219
- 68 Ross, J.S. and Fletcher, J.A. (1999) The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin Cancer Biol* 9 (2), 125-138
- 69 Williams, M.R. et al. (1987) Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: an eight year review of 704 cases. *Br J Cancer* 55 (1), 67-73
- 70 Arpino, G. et al. (2005) Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 97 (17), 1254-1261
- 71 (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365 (9472), 1687-1717
- 72 Mina, L. and Sledge, G.W., Jr. (2006) Twenty years of systemic therapy for breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 20 (1), 25-32; discussion 32-23, 36, 40
- 73 Abrial, C. et al. (2006) Does survival increase in metastatic breast cancer with recently available anticancer drugs? *Oncol Res* 15 (9), 431-439
- 74 Ingle, J.N. et al. (2006) Duration of letrozole treatment and outcomes in the placebo-controlled NCIC CTG MA.17 extended adjuvant therapy trial. *Breast Cancer Res Treat*
- 75 Tuma, R.S. (2006) Latest studies hint at survival advantage with aromatase inhibitors in early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 98 (2), 86-87
- 76 Berry, J. (2005) Are all aromatase inhibitors the same? A review of controlled clinical trials in breast cancer. *Clin Ther* 27 (11), 1671-1684
- 77 Howell, A. and Locker, G.Y. (2005) Defining the roles of aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer* 6 (4), 302-309
- 78 Carstens, P.H. et al. (1985) Tubular carcinoma of the breast. A long term follow-up. *Histopathology* 9 (3), 271-280
- 79 Carstens, P.H. et al. (1972) Tubular carcinoma of the breast: a clinicopathologic study of 35 cases. *Am J Clin Pathol* 58 (3), 231-238
- 80 Cooper, H.S. et al. (1978) Tubular carcinoma of the breast. *Cancer* 42 (5), 2334-2342
- 81 McDivitt, R.W. et al. (1982) Tubular carcinoma of the breast. Clinical and pathological observations concerning 135 cases. *Am J Surg Pathol* 6 (5), 401-411

- 82 Oberman, H.A. and Fidler, W.J., Jr. (1979) Tubular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 3 (5), 387-395
- 83 Diab, S.G. et al. (1999) Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol* 17 (5), 1442-1448
- 84 Page, D.L. et al. (1983) Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology* 7 (4), 525-536
- 85 Venable, J.G. et al. (1990) Infiltrating cribriform carcinoma of the breast: a distinctive clinicopathologic entity. *Hum Pathol* 21 (3), 333-338
- 86 Fentiman, I.S. et al. (1997) Mucoïd breast carcinomas: histology and prognosis. *Br J Cancer* 75 (7), 1061-1065
- 87 Scopsi, L. et al. (1994) Mucinous carcinoma of the breast. A clinicopathologic, histochemical, and immunocytochemical study with special reference to neuroendocrine differentiation. *Am J Surg Pathol* 18 (7), 702-711
- 88 Toikkanen, S. and Kujari, H. (1989) Pure and mixed mucinous carcinomas of the breast: a clinicopathologic analysis of 61 cases with long-term follow-up. *Hum Pathol* 20 (8), 758-764
- 89 Komaki, K. et al. (1988) Mucinous carcinoma of the breast in Japan. A prognostic analysis based on morphologic features. *Cancer* 61 (5), 989-996
- 90 Norris, H.J. and Taylor, H.B. (1965) Prognosis of Mucinous (Gelatinous) Carcinoma of the Breast. *Cancer* 18, 879-885
- 91 Fischer, H. (1956) [Pathologic and anatomic findings after severe alimentary dystrophy.]. *Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr* 16 (2-3), 103-111
- 92 Fisher, E.R. et al. (1993) Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. *Cancer* 71 (6 Suppl), 2141-2150
- 93 Fisher, E.R. et al. (1980) Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). VI. Invasive papillary cancer. *Am J Clin Pathol* 73 (3), 313-322
- 94 Tavassoli, F.A. and Norris, H.J. (1980) Secretory carcinoma of the breast. *Cancer* 45 (9), 2404-2413
- 95 Krausz, T. et al. (1989) Secretory carcinoma of the breast in adults: emphasis on late recurrence and metastasis. *Histopathology* 14 (1), 25-36
- 96 Peters, G.N. and Wolff, M. (1983) Adenoid cystic carcinoma of the breast. Report of 11 new cases: review of the literature and discussion of biological behavior. *Cancer* 52 (4), 680-686
- 97 Ro, J.Y. et al. (1987) Adenoid cystic carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 18 (12), 1276-1281
- 98 Wells, C.A. et al. (1986) Adenoid cystic carcinoma of the breast: a case with axillary lymph node metastasis. *Histopathology* 10 (4), 415-424
- 99 Sorensen, F.B. and Paulsen, S.M. (1987) Glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast: a solid variant with mucus. A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study of a case. *Histopathology* 11 (8), 857-869
- 100 Hull, M.T. and Warfel, K.A. (1986) Glycogen-rich clear cell carcinomas of the breast. A clinicopathologic and ultrastructural study. *Am J Surg Pathol* 10 (8), 553-559
- 101 Hayes, M.M. et al. (1995) Glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast. A clinicopathologic study of 21 cases. *Am J Surg Pathol* 19 (8), 904-911
- 102 Gradishar, W.J. (1996) Inflammatory breast cancer: the evolution of multimodality treatment strategies. *Semin Surg Oncol* 12 (5), 352-363

- 103 Robbins, G.F. et al. (1974) Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Clin North Am* 54 (4), 801-810
- 104 Fastenberg, N.A. et al. (1985) Management of inflammatory carcinoma of the breast. A combined modality approach. *Am J Clin Oncol* 8 (2), 134-141
- 105 McBride, C.M. and Hortobagyi, G.N. (1985) Primary inflammatory carcinoma of the female breast: staging and treatment possibilities. *Surgery* 98 (4), 792-798
- 106 Moore, M.P. et al. (1991) Inflammatory breast cancer. *Arch Surg* 126 (3), 304-306
- 107 Chevallier, B. et al. (1987) Inflammatory breast cancer. Determination of prognostic factors by univariate and multivariate analysis. *Cancer* 60 (4), 897-902
- 108 Ferrero-Pous, M. et al. (2000) Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 6 (12), 4745-4754
- 109 Slamon, D.J. et al. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (4785), 177-182
- 110 Wang, S.C. and Hung, M.C. (2001) HER2 overexpression and cancer targeting. *Semin Oncol* 28 (5 Suppl 16), 115-124
- 111 Andrulis, I.L. et al. (1998) neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 16 (4), 1340-1349
- 112 Tetu, B. and Brisson, J. (1994) Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer* 73 (9), 2359-2365
- 113 Hanna, W. et al. (1999) Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol* 12 (8), 827-834
- 114 Vogel, C.L. et al. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20 (3), 719-726
- 115 Bell, R. (2002) What can we learn from Herceptin trials in metastatic breast cancer? *Oncology* 63 Suppl 1, 39-46
- 116 Romond, E.H. et al. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353 (16), 1673-1684
- 117 Piccart-Gebhart, M.J. et al. (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353 (16), 1659-1672
- 118 Ross, J.S. et al. (2003) The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8 (4), 307-325
- 119 Lander, E.S. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822), 860-921
- 120 Venter, J.C. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291 (5507), 1304-1351
- 121 (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (6814), 796-815
- 122 Seki, M. et al. (2002) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 296 (5565), 141-145
- 123 Waterston, R.H. et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420 (6915), 520-562
- 124 (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (7011), 931-945

- 125 (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282 (5396), 2012-2018
- 126 Blattner, F.R. et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277 (5331), 1453-1474
- 127 Wood, D.W. et al. (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294 (5550), 2317-2323
- 128 Case-Green, S.C. et al. (1998) Analysing genetic information with DNA arrays. *Curr Opin Chem Biol* 2 (3), 404-410
- 129 Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257 (5072), 967-971
- 130 Diatchenko, L. et al. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (12), 6025-6030
- 131 Velculescu, V.E. et al. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270 (5235), 484-487
- 132 Schena, M. et al. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (5235), 467-470
- 133 Southern, E.M. (1996) DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genet* 12 (3), 110-115
- 134 Lipshutz, R.J. et al. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21 (1 Suppl), 20-24
- 135 Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 (3), 503-517
- 136 Maskos, U. and Southern, E.M. (1992) Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Res* 20 (7), 1679-1684
- 137 Hughes, T.R. et al. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 19 (4), 342-347
- 138 Singh-Gasson, S. et al. (1999) Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol* 17 (10), 974-978
- 139 Van Gelder, R.N. et al. (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (5), 1663-1667
- 140 Eberwine, J. et al. (1992) Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (7), 3010-3014
- 141 Phillips, J. and Eberwine, J.H. (1996) Antisense RNA Amplification: A Linear Amplification Method for Analyzing the mRNA Population from Single Living Cells. *Methods* 10 (3), 283-288
- 142 Schneider, J. et al. (2004) Systematic analysis of T7 RNA polymerase based in vitro linear RNA amplification for use in microarray experiments. *BMC Genomics* 5 (1), 29
- 143 Yue, H. et al. (2001) An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res* 29 (8), E41-41
- 144 Quackenbush, J. (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2 (6), 418-427
- 145 (2004) Expression profiling--best practices for data generation and interpretation in clinical trials. *Nat Rev Genet* 5 (3), 229-237

- 146 Quackenbush, J. (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32 Suppl, 496-501
- 147 Cherry, J.M. et al. (1998) SGD: Saccharomyces Genome Database. *Nucleic Acids Res* 26 (1), 73-79
- 148 Ramaswamy, S. et al. (2001) Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (26), 15149-15154
- 149 Su, A.I. et al. (2001) Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 61 (20), 7388-7393
- 150 Bittner, M. et al. (2000) Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406 (6795), 536-540
- 151 Perou, C.M. et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406 (6797), 747-752
- 152 Sorlie, T. et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (19), 10869-10874
- 153 Alizadeh, A.A. et al. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 (6769), 503-511
- 154 Ramaswamy, S. et al. (2003) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33 (1), 49-54
- 155 Rosenwald, A. et al. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346 (25), 1937-1947
- 156 Sotiriou, C. et al. (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (18), 10393-10398
- 157 van 't Veer, L.J. et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 (6871), 530-536
- 158 West, M. et al. (2001) Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (20), 11462-11467
- 159 Sorlie, T. et al. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (14), 8418-8423
- 160 Pusztai, L. et al. (2003) Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 9 (7), 2406-2415
- 161 Wang, Y. et al. (2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365 (9460), 671-679
- 162 Huang, E. et al. (2003) Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 361 (9369), 1590-1596
- 163 van de Vijver, M.J. et al. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347 (25), 1999-2009
- 164 Björn, R. et al. (2004) *Quantitative Methoden*, Springer-Verlag
- 165 Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J.Roy.Stat.Soc.B.* 57, 289-300
- 166 Tusher, V.G. et al. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (9), 5116-5121
- 167 Kanehisa, M. et al. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res* 34 (Database issue), D354-357

- 168 Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28 (1), 27-30
- 169 Ashburner, M. et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25 (1), 25-29
- 170 (2001) Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome Res* 11 (8), 1425-1433
- 171 (2006) The Gene Ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Res* 34 (Database issue), D322-326
- 172 Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25 (2), 169-193
- 173 Higuchi, R. et al. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11 (9), 1026-1030
- 174 Bardou, V.J. et al. (2003) Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21 (10), 1973-1979
- 175 McGuire, W.L. (1978) Steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 38 (11 Pt 2), 4289-4291
- 176 Rhodes, A. et al. (2000) Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 53 (2), 125-130
- 177 Schneider, J. et al. (2006) Identification and meta-analysis of a small gene expression signature for the diagnosis of estrogen receptor status in invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* 119 (12), 2974-2979
- 178 Fisher, B. et al. (1988) Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 6 (7), 1076-1087
- 179 Skasko, E. et al. (2005) A new look at the prognostic value of the estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptors in breast cancer tissue. *Neoplasma* 52 (1), 10-17
- 180 Shevde, L.A. et al. (1999) Immune functions, clinical parameters and hormone receptor status in breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 125 (5), 313-320
- 181 Kastelan, M. et al. (1985) Lymphocyte reactivity to mitogens and tumor sex steroid receptors in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother* 39 (8), 442-444
- 182 Whitford, P. et al. (1990) Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br J Cancer* 62 (6), 971-975
- 183 Joensuu, H. et al. (2003) Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res* 9 (3), 923-930
- 184 Kato, T. et al. (2002) C-erbB-2 and PCNA as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. *Anticancer Res* 22 (2B), 1097-1103
- 185 Spizzo, G. et al. (2002) Prognostic significance of Ep-CAM AND Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int J Cancer* 98 (6), 883-888
- 186 Slamon, D.J. et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344 (11), 783-792

- 187 Yeon, C.H. and Pegram, M.D. (2005) Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 23 (5), 391-409
- 188 McKeage, K. and Perry, C.M. (2002) Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 62 (1), 209-243
- 189 (1992) Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 339 (8785), 71-85
- 190 Jordan, V.C. (1994) Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 31 (1), 41-52
- 191 Jensen, E.V. (1962) On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* 6, 47-59
- 192 Walter, P. et al. (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (23), 7889-7893
- 193 Couse, J.F. and Korach, K.S. (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20 (3), 358-417
- 194 Mangelsdorf, D.J. et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (6), 835-839
- 195 Beekman, J.M. et al. (1993) Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol* 7 (10), 1266-1274
- 196 Katzenellenbogen, J.A. and Katzenellenbogen, B.S. (1996) Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol* 3 (7), 529-536
- 197 McKenna, N.J. et al. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20 (3), 321-344
- 198 Kraus, W.L. and Kadonaga, J.T. (1998) p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev* 12 (3), 331-342
- 199 Russo, J. and Russo, I.H. (2004) Development of the human breast. *Maturitas* 49 (1), 2-15
- 200 Russo, J. and Russo, I.H. (2006) The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102 (1-5), 89-96
- 201 Clarke, R.B. et al. (1997) Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res* 57 (22), 4987-4991
- 202 Clarke, R.B. et al. (1997) Estrogen sensitivity of normal human breast tissue in vivo and implanted into athymic nude mice: analysis of the relationship between estrogen-induced proliferation and progesterone receptor expression. *Breast Cancer Res Treat* 45 (2), 121-133
- 203 Russo, J. et al. (1999) Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat* 53 (3), 217-227
- 204 Zeps, N. et al. (1998) Estrogen receptor-negative epithelial cells in mouse mammary gland development and growth. *Differentiation* 62 (5), 221-226
- 205 Saji, S. et al. (2000) Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (1), 337-342
- 206 Wiesen, J.F. et al. (1999) Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development* 126 (2), 335-344

- 207 Cunha, G.R. et al. (1997) Elucidation of a role for stromal steroid hormone receptors in mammary gland growth and development using tissue recombinants. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2 (4), 393-402
- 208 Ethier, S.P. (1995) Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 87 (13), 964-973
- 209 Nicholson, R.I. and Gee, J.M. (2000) Oestrogen and growth factor cross-talk and endocrine insensitivity and acquired resistance in breast cancer. *Br J Cancer* 82 (3), 501-513
- 210 El-Ashry, D. et al. (1997) Constitutive Raf-1 kinase activity in breast cancer cells induces both estrogen-independent growth and apoptosis. *Oncogene* 15 (4), 423-435
- 211 Nilsson, S. et al. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81 (4), 1535-1565
- 212 McClelland, R.A. et al. (2001) Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology* 142 (7), 2776-2788
- 213 Knowlden, J.M. et al. (2003) Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 144 (3), 1032-1044
- 214 Gruvberger, S. et al. (2001) Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 61 (16), 5979-5984
- 215 Harvey, J.M. et al. (1999) Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17 (5), 1474-1481
- 216 Rudiger, T. et al. (2002) Quality assurance in immunohistochemistry: results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am J Surg Pathol* 26 (7), 873-882
- 217 Yang, F. et al. (2006) Laser microdissection and microarray analysis of breast tumors reveal ER-alpha related genes and pathways. *Oncogene* 25 (9), 1413-1419
- 218 Matsuda, S. et al. (2001) In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family. *FEBS Lett* 497 (2-3), 67-72
- 219 Fletcher, B.S. et al. (1991) Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters. *J Biol Chem* 266 (22), 14511-14518
- 220 Bradbury, A. et al. (1991) Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (8), 3353-3357
- 221 Altin, J.G. et al. (1991) Differential induction of primary-response (TIS) genes in PC12 pheochromocytoma cells and the unresponsive variant PC12nnr5. *J Biol Chem* 266 (9), 5401-5406
- 222 Rouault, J.P. et al. (1996) Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet* 14 (4), 482-486
- 223 Boiko, A.D. et al. (2006) A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation. *Genes Dev* 20 (2), 236-252

- 224 Kawamura-Tsuzuku, J. et al. (2004) Nuclear localization of Tob is important for regulation of its antiproliferative activity. *Oncogene* 23 (39), 6630-6638
- 225 Guehenneux, F. et al. (1997) Cloning of the mouse BTG3 gene and definition of a new gene family (the BTG family) involved in the negative control of the cell cycle. *Leukemia* 11 (3), 370-375
- 226 Rahmani, Z. (2006) APRO4 negatively regulates Src tyrosine kinase activity in PC12 cells. *J Cell Sci* 119 (Pt 4), 646-658
- 227 Biswas, D.K. et al. (2000) Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (15), 8542-8547
- 228 Biswas, D.K. and Iglehart, J.D. (2006) Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signaling in breast cancer. *J Cell Physiol* 209 (3), 645-652
- 229 Brandt, B. et al. (2006) Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* 12 (24), 7252-7260
- 230 Cook, A. et al. (1993) Genetic heterogeneity in families with hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet* 53 (1), 71-79
- 231 Hecht, J.T. et al. (1995) Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome II and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes II and 8. *Am J Hum Genet* 56 (5), 1125-1131
- 232 Raskind, W.H. et al. (1995) Loss of heterozygosity in chondrosarcomas for markers linked to hereditary multiple exostoses loci on chromosomes 8 and 11. *Am J Hum Genet* 56 (5), 1132-1139
- 233 Blanton, S.H. et al. (1996) Hereditary multiple exostoses: confirmation of linkage to chromosomes 8 and 11. *Am J Med Genet* 62 (2), 150-159
- 234 Hecht, J.T. et al. (1997) Hereditary multiple exostoses (EXT): mutational studies of familial EXT1 cases and EXT-associated malignancies. *Am J Hum Genet* 60 (1), 80-86
- 235 Shimizu, F. et al. (1997) Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochim Biophys Acta* 1354 (1), 24-28
- 236 Liang, Y. et al. (2006) Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed in infiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. *BMC Cancer* 6, 97
- 237 Shi, Y.E. et al. (1997) Antitumor activity of the novel human breast cancer growth inhibitor, mammary-derived growth inhibitor-related gene, MRG. *Cancer Res* 57 (15), 3084-3091
- 238 Wang, M. et al. (2003) Induction of mammary gland differentiation in transgenic mice by the fatty acid-binding protein MRG. *J Biol Chem* 278 (47), 47319-47325
- 239 Sotiriou, C. et al. (2006) Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98 (4), 262-272
- 240 Ma, X.J. et al. (2003) Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (10), 5974-5979
- 241 Robbins, P. et al. (1995) Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 26 (8), 873-879
- 242 Hopton, D.S. et al. (1989) Observer variation in histological grading of breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 15 (1), 21-23

- 243 Theissig, F. et al. (1990) Histological grading of breast cancer. Interobserver, reproducibility and prognostic significance. *Pathol Res Pract* 186 (6), 732-736
- 244 Denoix, P.F. and Baclesse, F. (1955) [Proposed clinical classification of breast cancers; statement of the International Cancer Union.]. *Bull Assoc Fr Etud Cancer* 42 (4), 433-440
- 245 (1959) INTERNATIONAL Union Against Cancer. Clinical stage classification for malignant tumours of the breast. *Br J Surg* 47, 330-332
- 246 Harpole, D.H. and Meyerson, S.L. (2006) Lung cancer staging: proteomics. *Thorac Surg Clin* 16 (4), 339-343
- 247 Nguyen, D.M. and Schrupp, D.S. (2006) Lung cancer staging in the genomics era. *Thorac Surg Clin* 16 (4), 329-337
- 248 D'Amico, T.A. (2006) Molecular biologic staging of esophageal cancer. *Thorac Surg Clin* 16 (4), 317-327
- 249 Stern, D.F. et al. (1986) p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol* 6 (5), 1729-1740
- 250 Lemmon, M.A. and Schlessinger, J. (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* 19 (11), 459-463
- 251 Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2), 127-137
- 252 Olayioye, M.A. et al. (1998) ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18 (9), 5042-5051
- 253 Karunakaran, D. et al. (1996) ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *Embo J* 15 (2), 254-264
- 254 Bose, R. et al. (2006) Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (26), 9773-9778
- 255 Meric, F. et al. (2002) HER2/neu in the management of invasive breast cancer. *J Am Coll Surg* 194 (4), 488-501
- 256 Hung, M.C. and Lau, Y.K. (1999) Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol* 26 (4 Suppl 12), 51-59
- 257 Tan, M. et al. (1997) Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res* 57 (6), 1199-1205
- 258 Klos, K.S. et al. (2006) ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 66 (4), 2028-2037
- 259 Subbaramaiah, K. et al. (2006) HER-2/neu status is a determinant of mammary aromatase activity in vivo: evidence for a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Cancer Res* 66 (10), 5504-5511
- 260 Li, Y.M. et al. (2004) Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6 (5), 459-469
- 261 Tan, M. et al. (2005) ErbB2 promotes Src synthesis and stability: novel mechanisms of Src activation that confer breast cancer metastasis. *Cancer Res* 65 (5), 1858-1867
- 262 Yu, D. et al. (1998) Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* 2 (5), 581-591

- 263 Zhou, B.P. et al. (2000) HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 275 (11), 8027-8031
- 264 Kauraniemi, P. et al. (2001) New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res* 61 (22), 8235-8240
- 265 Kauraniemi, P. et al. (2003) Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *Am J Pathol* 163 (5), 1979-1984
- 266 Slamon, D.J. et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244 (4905), 707-712
- 267 Schneider, P.M. et al. (1989) Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 49 (18), 4968-4971
- 268 Weiner, D.B. et al. (1990) Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 50 (2), 421-425
- 269 Yokota, J. et al. (1988) Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene* 2 (3), 283-287
- 270 Hou, L. et al. (1992) Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression. *Cancer Lett* 65 (3), 215-220
- 271 Schwab, M. (1998) Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* 20 (6), 473-479
- 272 Schwab, M. (1999) Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 9 (4), 319-325
- 273 Kuwahara, Y. et al. (2004) Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 41 (2), 125-132
- 274 Luoh, S.W. (2002) Amplification and expression of genes from the 17q11 approximately q12 amplicon in breast cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 136 (1), 43-47
- 275 Dressman, M.A. et al. (2003) Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer. *Cancer Res* 63 (9), 2194-2199
- 276 Bertucci, F. et al. (2004) Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene* 23 (14), 2564-2575
- 277 Stein, D. et al. (1994) The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *Embo J* 13 (6), 1331-1340
- 278 Tomasetto, C. et al. (1995) Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* 28 (3), 367-376
- 279 Bieche, I. et al. (1996) Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res* 56 (17), 3886-3890
- 280 Orsetti, B. et al. (2004) Genomic and expression profiling of chromosome 17 in breast cancer reveals complex patterns of alterations and novel candidate genes. *Cancer Res* 64 (18), 6453-6460
- 281 Willis, S. et al. (2003) Detailed gene copy number and RNA expression analysis of the 17q12-23 region in primary breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 36 (4), 382-392

- 282** Hjelmqvist, L. et al. (2002) ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol* 3 (6), RESEARCH0027
- 283** Kauraniemi, P. and Kallioniemi, A. (2006) Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13 (1), 39-49
- 284** Pero, S.C. et al. (2002) Identification of novel non-phosphorylated ligands, which bind selectively to the SH2 domain of Grb7. *J Biol Chem* 277 (14), 11918-11926
- 285** Shen, T.L. and Guan, J.L. (2004) Grb7 in intracellular signaling and its role in cell regulation. *Front Biosci* 9, 192-200
- 286** Han, D.C. et al. (2000) Role of Grb7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration. *J Biol Chem* 275 (37), 28911-28917
- 287** Shen, T.L. et al. (2002) Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration. *J Biol Chem* 277 (32), 29069-29077
- 288** Li, H. et al. (2005) The adaptor Grb7 is a novel calmodulin-binding protein: functional implications of the interaction of calmodulin with Grb7. *Oncogene* 24 (26), 4206-4219
- 289** Watari, H. et al. (1997) MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (16), 8462-8467
- 290** Strauss, J.F., 3rd et al. (2003) START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Mol Cell Endocrinol* 202 (1-2), 59-65
- 291** Tsujishita, Y. and Hurley, J.H. (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat Struct Biol* 7 (5), 408-414
- 292** Lucas, T. et al. (2005) The human orthologue of a novel apoptosis response gene induced during rat myelomonocytic stem cell apoptosis maps to 20q13.12. *Stem Cells Dev* 14 (5), 556-563
- 293** Bench, A.J. et al. (2000) Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Oncogene* 19 (34), 3902-3913

7 TABELLARISCHER ANHANG

7.1 Patientendaten

Tabelle 20: Diagnose, Alter und TNM-Staging der Mammakarzinom-Patienten

Patienten code	Diagnose	Alter	pT	pN	pM	UICC Stage
39	IDC (NOS)	71	pT2	pN1b	pM0	IIB
65	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
68	IDC (NOS)	74	pT4	pN0	pM0	IIIB
69	IDC (NOS)	59	pT1c	pN2	pM0	IIIA
167	IDC (NOS)	50	pT2	pN1b	pM0	IIB
180	IDC (NOS)	48	pT2	pN1b	pM0	IIB
200	IDC (NOS)	52	pT2	pN0	pM0	IIA
201	IDC (NOS)	45	pT1c	pN1b	pM0	IIA
227	IDC (NOS)	58	pT1c	pN1a	pM0	IIA
230	IDC (NOS)	54	pT1	pN0	pM0	I
234	IDC (NOS)	63	pT4	pN0	pM1	IV
249	IDC (NOS)	38	pT3	pN0	pM0	IIB
274	IDC (NOS)	56	pT2	pN1b	pM0	IIB
301	ILC	43	pT1c	pN0	pM0	I
319	IDC (NOS)	61	pT2	pN0	pM0	IIA
326	IDC (NOS)	52	pT1c	pN0	pM1	IV
333	IDC (NOS)	62	pT1c	pN0	pM1	IV
360	IDC (NOS)	76	pT2	pNX	pM0	k.A.
363	IDC (NOS)	41	pT4c	pNX	pM0	k.A.
394	dukt.-lob. Karzinom	43	pT2	pN1b	pM0	IIB
444	IDC (NOS)	67	pT2	pN1b	pM0	IIB
548	IDC (NOS)	61	pT1c	pN1b	pM0	IIA
552	IDC (NOS)	51	pT2	pN1b	pM0	IIB
657	dukt.-lob. Karzinom	67	pT2	pN0	pM0	IIA
771	IDC (NOS)	67	pT1b	pN1b	pM0	IIA
805	medulläres Karzinom	68	pT2	pN1b	pM0	IIB
832	IDC (NOS)	58	pT2	pN0	pM0	IIA
932	IDC (NOS)	39	pT3	pN1b	pM0	IIIA
938	IDC (NOS)	52	pT2	pN1b	pM0	IIB
1000	IDC (NOS)	59	pT2	pN1b	pM0	IIB
1001	IDC (NOS)	25	pT1b	pN1b	pM0	IIA
1006	ILC	60	pT2	pN1b	pM0	IIB
1058	IDC (NOS)	53	pT3	pN2	pM0	IIIA
1067	IDC (NOS)	41	pTX	pN1b	pM0	k.A.
1127	IDC (NOS)	63	pT1c	pN0	pM0	I
1140	ILC	73	pT2	pN1b	pM0	IIB
1190	IDC (NOS)	51	pT4b	pN2	pM1	IV
1202	IDC (NOS)	35	pT2	pN2	pM0	IIIA
1228	IDC (NOS)	53	pT1c	pN1b	pM0	IIA
1236	muzinöses Karzinom	65	pT2	pN1b	pM0	IIB
1246	dukt.-lob. Karzinom	39	pT1c	pN0	pM0	I
1278	dukt.-lob. Karzinom	37	pT1c	pN1b	pM0	IIA
1322	IDC (NOS)	38	pT2	pN1b	pM0	IIB
1437	IDC (NOS)	68	pT1c	pN0	pM0	I

Tabellarischer Anhang

1452	IDC (NOS)	51	pT1c	pN1b	pM0	IIA
2279	dukt.-lob. Karzinom	62	pT3	pN1b	pM0	IIIA
3813	IDC (NOS)	67	pT2	pN1b	pM0	IIB
5005	IDC (NOS)	62	pT2	pN1b	pM0	IIB
6427	IDC (NOS)	49	pT2	pN0	pM0	IIA
6892	IDC (NOS)	47	pT2	pN1b	pM0	IIB
6893	Hautmetastase eines IDC	48	pT4	pN1b	pM0	IIIB
6894	IDC (NOS)	46	pT1c	pN0	pM0	I
6898	IDC (NOS)	70	pTX	pNX	pM0	k.A.
¹ 8545	ILC	54	pTX	pN2	pM0	k.A.
² 9105	IDC (NOS)	43	pT2	pN1b	pM0	k.A.
9472	IDC (NOS)	82	pT1c	pNX	pMX	k.A.
9495	IDC (NOS)	79	pT2	pNX	pMX	k.A.
10199	muzinöses Karzinom	60	pTX	pNX	pMX	k.A.
10200	IDC (NOS)	68	pTX	pNX	pMX	k.A.
10226	IDC (NOS)	53	pT3	pN1b	pM0	IIIA
10227	ILC	33	pT4	pN1b	pM0	IIIB
10229	IDC (NOS)	41	pT3	pN0	pM0	IIB
10230	IDC (NOS)	79	pT4	pN0	pM0	IIIB
10231	IDC (NOS)	66	pT1c	pN0	pM0	I
10233	IDC (NOS)	68	pT2	pN0	pM0	IIA
10234	IDC (apokrin-onkozytär)	70	pT2	pN0	pM0	IIA
10235	IDC (NOS)	49	pT2	pN1b	pM1	IV
10236	IDC (NOS)	71	pT2	pN1b	pM0	IIB
10238	IDC (NOS)	66	pT4c	pN2	pM0	IIIB
10239	medulläres Karzinom	57	pT1c	pN1b	pM0	IIA
10240	medulläres Karzinom	47	pT2	pN0	pM0	IIA
10241	IDC (NOS)	48	pTX	pN1a	pM0	k.A.
10242	IDC (NOS)	42	pT4	pN1b	pM1	IV
10243	IDC (NOS)	58	pT1a	pN0	pM0	I
10245	IDC (NOS)	39	pT2	pN1b	pM0	IIB
10246	IDC (NOS)	69	pT2	pN0	pM0	IIA
10247	Adenokarzinom	52	pT4d	pNX	pM1	IV
10248	IDC (NOS)	53	pT1b	pN0	pM0	I
10366	medulläres Karzinom	58	pT1	pN0	pM0	I
10367	IDC (NOS)	71	pT1c	pN1b	pM0	IIA
10368	IDC (NOS)	47	pT1c	pN0	pM0	I
10369	IDC (NOS)	46	pT2	pN0	pM0	IIA
10370	IDC (NOS)	56	pT2	pN0	pM0	IIA
10372	IDC (NOS)	65	pTX	pN0	pM0	k.A.
10373	IDC (NOS)	71	pT1c	pN1b	pM0	IIA
10375	IDC (NOS)	45	pT1c	pN0	pM0	I
10376	IDC (NOS)	61	pT1b	pN0	pM0	I
10377	IDC (NOS)	67	pT1c	pN0	pM0	I
10378	medulläres Karzinom	61	pTX	pN0	pM0	k.A.
10379	muzinöses Karzinom	66	pT2	pN0	pM0	IIA
10380	IDC (NOS)	36	pT2	pN1b	pM0	IIB
10381	IDC (NOS)	59	pT1b	pN0	pM0	I
10383	IDC (NOS)	35	pT4b	pN1b	pM0	IIIB
10384	IDC (NOS)	57	pT3	pN1b	pM1	IV
10385	IDC (NOS)	48	pT4d	pN1b	pM0	IIIB
10386	medulläres Karzinom	58	pT1c	pN1b	pM0	IIA
10387	IDC (NOS)	43	pT1c-2	pN0	pM0	IIA
10388	dukt.-lob. Karzinom	54	pT1	pN1b	pM0	IIA

Tabellarischer Anhang

10389	dukt.-lob. Karzinom	49	pT1c	pN0	pM0	I
10390	IDC (NOS)	67	pT2	pN1b	pM0	IIB
10391	IDC (NOS)	43	pT1c	pN0	pM0	I
10392	IDC (NOS)	72	pT4	pN0	pM0	IIIB
10393	IDC (NOS)	71	pT1c	pN0	pM0	I
10394	IDC (NOS)	39	pT1c	pN1b	pM0	IIA
10395	IDC (NOS)	77	pT2	pN1b	pM0	IIB
10396	IDC (NOS)	45	pT1c	pN0	pM0	I
10397	IDC (NOS)	48	pT1b	pN1b	pM0	IIA
10398	IDC (NOS)	69	pT2	pN1b	pM0	IIB
10399	IDC (NOS)	46	pT1a	pN0	pM0	I
10400	IDC (NOS)	65	pT4	pN1b	pM0	IIIB
10401	IDC (NOS)	70	pT1c	pN1b	pM0	IIA
10402	IDC (NOS)	50	pT1c	pN0	pM0	I
10403	dukt.-lob. Karzinom	56	pT2	pN1b	pM0	IIB
10416	IDC (NOS)	75	pT4	pNX	pM0	k.A.
10417	ILC	38	pT1c	pN0	pM0	I
10418	IDC (NOS)	80	pT2	pN2	pM0	IIIA
10419	IDC (NOS)	73	pT4d	pN1b	pM0	IIIB
10420	IDC (NOS)	70	pT2	pN2	pM0	IIIA
10421	IDC (NOS)	62	pT1a	pN0	pM0	I
10422	IDC (NOS)	68	pT1c	pN1b	pM0	IIA
10424	IDC (NOS)	67	pT2	pN1b	pM0	IIB
10425	IDC (NOS)	71	pTX	pN2	pM0	k.A.
10426	IDC (NOS)	52	pT2	pN0	pM0	IIA
10427	IDC (NOS)	47	pT2	pN1b	pM0	IIB
10429	IDC (NOS)	51	pT2	pN0	pM0	IIA
10430	ILC	61	pT2	pN1b	pM0	IIB

¹8545: Cryogewebe entspricht Zweitmalignom! Klinische Daten beziehen sich auf Primärtumor!

²9105: Kontralaterales Zweitmalignom! Pathologische Daten beziehen sich auf Zweitmalignom, klinische auf Erstmalignom!!

Tabelle 21: Histologisches Grading, Status der Hormonrezeptoren und lymphozytäre Infiltration der Mammakarzinom-Patienten

Patienten code	Histologisches Grading	ER Status	PR Status	Hormonrezeptor status	lymphozytäre Infiltration
39	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
65	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
68	pG3	negativ	negativ	negativ	k.A.
69	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
167	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
180	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
200	pG3	negativ	negativ	negativ	k.A.
201	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
227	pG3	positiv	negativ	positiv	k.A.
230	pG2	positiv	negativ	positiv	k.A.
234	pG2	positiv	negativ	positiv	k.A.
249	pG3	negativ	positiv	positiv	k.A.
274	pG3	negativ	negativ	negativ	k.A.
301	pG2	negativ	positiv	positiv	k.A.
319	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.

Tabellarischer Anhang

326	pG2	negativ	negativ	negativ	k.A.
333	pG3	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
360	pG2	negativ	negativ	negativ	k.A.
363	pG3	negativ	positiv	positiv	k.A.
394	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
444	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
548	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
552	pG1	negativ	negativ	negativ	k.A.
657	pG2	negativ	negativ	negativ	k.A.
771	pG1	negativ	negativ	negativ	k.A.
805	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
832	pG3	positiv	negativ	positiv	k.A.
932	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
938	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
1000	pG3	negativ	negativ	negativ	k.A.
1001	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
1006	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
1058	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
1067	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
1127	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
1140	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
1190	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
1202	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
1228	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
1236	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
1246	pGX	positiv	positiv	positiv	k.A.
1278	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
1322	pG3	negativ	negativ	negativ	k.A.
1437	pG2	negativ	negativ	negativ	k.A.
1452	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
2279	pG3	positiv	negativ	positiv	k.A.
3813	pG3	negativ	negativ	negativ	k.A.
5005	pG3	negativ	negativ	negativ	k.A.
6427	pG3	negativ	negativ	negativ	2
6892	pG2	positiv	negativ	positiv	k.A.
6893	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
6894	pG3	negativ	negativ	negativ	k.A.
6898	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
¹ 8545	pG3	k.A.	positiv	positiv	0
² 9105	pG3	negativ	negativ	negativ	1
9472	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
9495	pG3	positiv	positiv	positiv	k.A.
10199	pGX	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
10200	pG2	positiv	positiv	positiv	k.A.
10226	pG3	negativ	negativ	negativ	2
10227	pG2	positiv	positiv	positiv	0
10229	pG3	negativ	negativ	negativ	1
10230	pG3	negativ	negativ	negativ	2
10231	pG2	negativ	negativ	negativ	2
10233	pG2	positiv	positiv	positiv	1
10234	pG3	negativ	negativ	negativ	1
10235	pG3	negativ	negativ	negativ	1
10236	pG3	positiv	positiv	positiv	2
10238	pG3	positiv	positiv	positiv	0

Tabellarischer Anhang

10239	pG3	negativ	negativ	negativ	2
10240	pG3	negativ	negativ	negativ	2
10241	pG2	positiv	positiv	positiv	1
10242	pG2	negativ	negativ	negativ	1
10243	pG2	positiv	positiv	positiv	1
10245	pG3	negativ	negativ	negativ	2
10246	pG2	positiv	positiv	positiv	1
10247	pG3	positiv	negativ	positiv	1
10248	pG2	negativ	positiv	positiv	0
10366	pG3	negativ	negativ	negativ	3
10367	pG3	negativ	negativ	negativ	3
10368	pG2	negativ	negativ	negativ	1
10369	pG2	negativ	negativ	negativ	1
10370	pG3	positiv	positiv	positiv	2
10372	pG2	k.A.	k.A.	k.A.	0
10373	pG3	negativ	negativ	negativ	2
10375	pG2	positiv	negativ	positiv	1
10376	pG2	positiv	positiv	positiv	0
10377	pGX	positiv	positiv	positiv	0
10378	pG3	positiv	positiv	positiv	2
10379	pG2	positiv	positiv	positiv	0
10380	pG2	positiv	negativ	positiv	1
10381	pG1	positiv	negativ	positiv	1
10383	pGX	negativ	negativ	negativ	1
10384	pG3	negativ	negativ	negativ	1
10385	pG3	negativ	positiv	positiv	1
10386	pG3	negativ	negativ	negativ	1
10387	pG2	positiv	positiv	positiv	1
10388	pG2	positiv	positiv	positiv	1
10389	pG3	negativ	positiv	positiv	1
10390	pG2-3	negativ	negativ	negativ	0
10391	pGX	positiv	positiv	positiv	0
10392	pG1	positiv	positiv	positiv	0
10393	pG2	positiv	positiv	positiv	0
10394	pG2	positiv	positiv	positiv	0
10395	pG2	positiv	positiv	positiv	1
10396	pG2	positiv	positiv	positiv	0
10397	pG2	positiv	negativ	positiv	0
10398	pG3	negativ	negativ	negativ	1
10399	pG3	negativ	negativ	negativ	0
10400	pG2	positiv	negativ	positiv	0
10401	pG3	positiv	positiv	positiv	0
10402	pG1	positiv	positiv	positiv	0
10403	pG2	negativ	negativ	negativ	0
10416	pG3	positiv	positiv	positiv	0
10417	pGX	negativ	negativ	negativ	2
10418	pG3	positiv	positiv	positiv	1
10419	pG3	negativ	negativ	negativ	1
10420	pG3	negativ	negativ	negativ	0
10421	pG2	positiv	positiv	positiv	1
10422	pG3	positiv	positiv	positiv	1
10424	pG3	negativ	negativ	negativ	2
10425	pG3	negativ	negativ	negativ	2
10426	pG3	positiv	positiv	positiv	1

Tabellarischer Anhang

10427	pG3	positiv	positiv	positiv	2
10429	pG1-2	positiv	positiv	positiv	0
10430	pGX	positiv	positiv	positiv	1

¹8545: Cryogewebe entspricht Zweitmalignom! Klinische Daten beziehen sich auf Primärtumor!

²9105: Kontralaterales Zweitmalignom! Pathologische Daten beziehen sich auf Zweitmalignom, klinische auf Erstmalignom!!

Tabelle 22: Daten bezüglich ErbB2-Expression und Überlebenszeiten der Mammakarzinom-Patienten

Patienten code	DAKO Hercep Test	ErbB2 Über-expression	¹ DFS [Monate]	Zensurierung DFS	² OS [Monate]	Zensurierung OS
39	3	nein	21.88	1	23.69	1
65	k.A.	ja	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
68	0	nein	38.64	1	51.15	1
69	2	nein	18.56	1	33.35	1
167	3	ja	1.77	1	63.87	1
180	k.A.	nein	29.70	1	93.34	1
200	0	nein	13.67	1	21.26	1
201	0	nein	64.16	1	176.00	0
227	k.A.	ja	16.16	1	56.74	1
230	2	nein	39.16	1	61.27	1
234	0	nein	0	1	17.35	1
249	3	ja	3.19	1	13.08	1
274	2	nein	18.17	1	35.38	1
301	k.A.	nein	17.54	1	45.60	1
319	3	ja	20.80	1	47.54	1
326	0	nein	25.36	1	53.65	1
333	0	nein	28.00	1	74.38	1
360	k.A.	nein	10.00	1	15.00	0
363	0	nein	0	1	17.05	1
394	0	nein	108.02	1	156.00	0
444	0	nein	6.08	1	32.69	1
548	k.A.	nein	122.58	1	150.77	0
552	0	nein	63.31	1	76.52	1
657	1	nein	16.59	1	28.58	1
771	1	nein	26.87	1	33.25	0
805	k.A.	nein	108.25	1	145.61	0
832	1	nein	26.22	1	43.01	1
932	2	ja	1.00	1	37.00	1
938	k.A.	nein	148.00	1	148.00	0
1000	k.A.	nein	9.36	1	14.92	1
1001	k.A.	nein	13.67	1	31.51	1
1006	2	nein	54.67	1	92.65	1
1058	0	nein	42.28	1	56.54	1
1067	0	nein	54.64	1	139.17	1
1127	0	nein	60.71	1	113.74	1
1140	0	nein	5.59	1	11.10	1
1190	0	nein	0	1	108.62	0
1202	3+	nein	102.05	1	143.00	0
1228	k.A.	nein	12.25	1	41.10	1

Tabellarischer Anhang

1236	0	nein	48.76	1	116.70	1
1246	0	nein	39.66	1	133.52	0
1278	0	nein	0.56	1	93.21	0
1322	k.A.	nein	20.11	1	29.96	1
1437	2	nein	11.93	1	15.21	1
1452	1	nein	39.49	1	120.00	0
2279	0	nein	18.83	1	56.97	1
3813	3	ja	4.96	1	21.75	1
5005	3	ja	0.66	1	11.27	1
6427	k.A.	nein	2.00	1	117.00	0
6892	k.A.	nein	36.40	1	154.00	0
6893	0	nein	5.52	1	25.69	1
6894	k.A.	nein	29.96	1	104.64	1
6898	k.A.	nein	6.00	0	6.00	0
8545	k.A.	nein	10.00	1	44.00	0
9105	k.A.	nein	67.00	1	191.00	0
9472	k.A.	nein	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
9495	k.A.	nein	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
10199	k.A.	nein	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
10200	k.A.	nein	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
10226	k.A.	nein	133.88	0	133.88	0
10227	k.A.	nein	120.00	0	120.00	0
10229	k.A.	nein	5.42	1	13.21	1
10230	k.A.	nein	0	1	12.00	1
10231	k.A.	ja	0.50	1	20.00	1
10233	k.A.	nein	75	0	75	0
10234	k.A.	ja	139.00	0	139.00	0
10235	k.A.	ja	0.00	1	18.33	1
10236	k.A.	nein	161.00	0	161.00	0
10238	k.A.	nein	1.02	1	18.37	1
10239	k.A.	ja	115.61	0	115.61	0
10240	k.A.	nein	29.37	1	52.70	1
10241	k.A.	nein	122.00	0	122.00	0
10242	1	nein	22.00	1	63.11	1
10243	k.A.	nein	155.00	0	155.00	0
10245	2+	nein	18.00	1	122.00	0
10246	k.A.	nein	132.00	0	132.00	0
10247	k.A.	nein	0	1	28.16	1
10248	k.A.	nein	74.94	0	74.94	0
10366	k.A.	ja	122.48	0	122.48	0
10367	k.A.	nein	173.00	1	297.00	0
10368	k.A.	nein	34.27	1	92.16	1
10369	k.A.	nein	124.06	0	124.06	0
10370	k.A.	nein	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
10372	0	nein	27.24	1	35.78	0
10373	k.A.	nein	92.98	0	92.98	0
10375	k.A.	ja	124.42	0	124.42	0
10376	k.A.	nein	153.00	0	153.00	0
10377	k.A.	nein	157.00	0	157.00	0
10378	k.A.	nein	118.00	0	118.00	0
10379	k.A.	nein	161.00	0	161.00	0
10380	3+	ja	84.80	1	121.40	1
10381	k.A.	nein	152.00	0	152.00	0
10383	k.A.	ja	3.78	1	12.91	1

Tabellarischer Anhang

10384	k.A.	ja	3.29	1	13.04	1
10385	1	nein	4.00	1	35.00	1
10386	k.A.	nein	13.00	1	23.43	1
10387	k.A.	ja	33.58	1	35.12	1
10388	0	nein	45.14	1	152.05	1
10389	k.A.	nein	133.09	0	133.09	0
10390	0	nein	37.82	1	61.96	1
10391	k.A.	nein	133.26	0	133.26	0
10392	k.A.	nein	55.72	0	55.72	0
10393	0	nein	40.71	1	52.96	1
10394	k.A.	nein	118.57	0	167.00	0
10395	k.A.	nein	82.79	0	109.00	0
10396	k.A.	nein	49.00	1	160.16	0
10397	k.A.	nein	169.00	0	169.00	0
10398	k.A.	ja	7.79	1	21.16	1
10399	k.A.	nein	122.91	0	122.91	0
10400	0	nein	18.43	1	44.78	1
10401	k.A.	nein	16.82	1	34.30	1
10402	k.A.	nein	136.00	0	136.00	0
10403	k.A.	nein	31.74	1	38.87	1
10416	0	nein	0.69	1	5.88	1
10417	k.A.	nein	127.18	0	127.18	0
10418	k.A.	nein	74.87	0	74.87	0
10419	3+	ja	18.00	1	28.19	1
10420	k.A.	ja	133.26	0	133.26	0
10421	k.A.	nein	158.00	0	158.00	0
10422	k.A.	ja	128.10	0	128.10	0
10424	k.A.	nein	126.00	0	126.00	0
10425	k.A.	ja	38.80	1	52.96	1
10426	k.A.	nein	51.48	1	148.00	0
10427	k.A.	nein	172.00	0	172.00	0
10429	k.A.	nein	116.00	1	149.00	0
10430	0	nein	29.70	1	56.97	1

¹DFS: Zeitpunkt der Erstmetastasierung oder des Auftretens eines Lokalrezidivs – Operationszeitpunkt

²OS: Endzeitpunkt des dokumentierten Überlebens - Erstdiagnosezeitpunkt

7.2 Genlisten

Tabelle 23: GO-Analyse Histologisches Grading; 5% falsch Positive

GO Kategorie	Erwartete Anzahl der Gene	Beobachtete Anzahl der Gene	p-Wert
M-Phase des mitotischen Zellzyklus	1.15	5	0.0065
CCNB1 (Hs.23960)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
PTTG1 (Hs.350966)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
KIF23 (Hs.270845)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
CDC20 (Hs.524947)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
ESR1 (Hs.208124)	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
Mitose	1.14	5	0.0065
CCNB1 (Hs.23960)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
PTTG1 (Hs.350966)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		

Tabellarischer Anhang

KIF23 (Hs.270845)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
CDC20 (Hs.524947)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
ESR1 (Hs.208124)	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
Mitotischer Zellzyklus	1.48	6	0.0041
CDKN3 (Hs.84113)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
CCNB1 (Hs.23960)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
PTTG1 (Hs.350966)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
KIF23 (Hs.270845)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
CDC20 (Hs.524947)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
ESR1 (Hs.208124)	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
Negative Regulation des Protein-Metabolismus	0.35	3	0.0061
EIF4EBP1 (Hs.411641)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
CAPZA1 (Hs.514934)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
ARHGEF2 (Hs.516790):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
Mitochondrium	4.01	10	0.0067
PPIF (Hs.381072)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
COX4I1 (Hs.433419)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
COX6B1 (Hs.431668)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
MRPS28 (Hs.521124)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
MRPL13 (Hs.333823)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
IDH2 (Hs. 513141)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
NDUFB9 (Hs.15977)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
ABAT (Hs.336768)	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
BCL2 (Hs.150749)	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
SLC25A2 (Hs.134544)	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
Zellorganisation und Biogenese	9.29	18	0.0039
ARHGEF2 (Hs.516790):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
HSPC176 (Hs.461722)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
VPS26 (Hs.499925):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
SEC61G (Hs.488282):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
RNF19 (Hs.292882):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
TAP2 (Hs.502):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
CAPZA1 (Hs.514934):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
H2AFZ (Hs.119192):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
MAGOH (Hs.421576):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
KIF23 (Hs.270845):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
PTTG1 (Hs.350966):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
CHD3 (Hs.25601):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
IGFBP4 (Hs.462998):	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
TNKS (Hs.370267):	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
STN2 (Hs.14248):	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
ESR1 (Hs.208124):	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
TNN (Hs.156369):	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
TOM1L2 (Hs.462379):	schwächer exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
Mikrotubulus-Cytoskelett-Organisation und Biogenese	0.42	3	0.0098
RNF19 (Hs.292579)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
ARHGEF2 (Hs.516790)	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		
KIF23 (Hs.270845):	stärker exprimiert in Mammakarzinomen mit hohem Grading		

Tabelle 24: GO-Analyse Histologisches Grading; 20% falsch Positive

GO Kategorie	Erwartete Anzahl der Gene	Beobachtete Anzahl der Gene	p-Wert
M-Phase	7.09	16	0.00359
Mitotischer Zellzyklus	7.89	18	0.00186
M-Phase des mitotischen Zellzyklus	6.11	15	0.00230
Mitose	6.04	15	0.00211

Tabellarischer Anhang

Zellteilung	7.03	18	0.00056
Intrazellulärer Transport	20.17	32	0.00937
Physiologischer Prozess	306.16	323	0.00370
Neurotransmitter-Metabolismus	0.62	4	0.00704
Katabolismus	18.69	32	0.00336
Zellulärer Katabolismus	16.65	31	0.00118
Makromolekül-Katabolismus	12.09	22	0.00760
Zellulärer Makromolekül-Katabolismus	11.35	22	0.00389
Biopolymer-Katabolismus	8.26	19	0.00128
Protein-Katabolismus	8.02	19	0.00093
Zellulärer Protein-Katabolismus	7.28	19	0.00032
Proteolyse	18.81	32	0.00368
Proteolyse während des zellulären Protein-Katabolismus	7.22	19	0.00029
Modifikationsabhängiger Protein-Katabolismus	5.92	19	0.00003
Ubiquitinabhängiger Protein-Katabolismus	5.92	19	0.00003
Nukleotidausschneide-Reparatur	0.68	4	0.00916
Peptidbindung	3.02	9	0.00573
Peptidase-Aktivität	16.56	29	0.00393
Endopeptidas-Aktivität	11.76	22	0.00576
Threonin-Endopeptidase-Aktivität	0.92	7	0.00017
Mitochondriale Ribosomen	1.36	6	0.00466
Organellen Ribosomen	1.36	6	0.00466
Protein Kinase CK2 Komplex	1.73	8	0.00086
Proteasom-Kern-Komplex	0.93	7	0.00017

8 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Annemarie Poustka für die Möglichkeit, in der Abteilung für Molekulare Genomanalyse des DKFZ Heidelberg zu promovieren.

Ich danke PD Dr. Holger Sültmann für seine Betreuung während der Promotion und für wertvolle Korrekturvorschläge beim Verfassen der Doktorarbeit.

PD Dr. Ralf Bischoff danke ich für die Vertretung dieser Arbeit in der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Ich danke meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Kurt Zatloukal und Dr. Martin Asslaber von der Medizinischen Universität Graz für die zur Verfügung gestellten Mammakarzinomproben und Patientendaten, sowie für zahlreiche Diskussionen zum Thema Brustkrebs.

Ich möchte mich für den Rückhalt meiner Eltern bedanken, insbesondere bei meinem Vater, der nie an mich oder meinem Erfolg zweifelte.

Herzlich danken möchte ich meinem Vorgänger und langjährigen Kollegen Jörg Schneider, der einen wesentlichen Anteil daran hatte, dass ich mich schnell in die notwendigen Arbeitstechniken einarbeiten konnte und darüber hinaus für ein angenehmes und freundschaftliches Arbeitsklima sorgte.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Holger Sültmann, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Sabrina Balaguer für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft im Labor bedanken.

Ich möchte mich bei Dr. Jan Mollenhauer und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe für Anregungen, Diskussionen und Unterstützung aller Art danken.

Danksagung

Ich danke Ute Ernst, Dr.Dorothea Zink, Dr.Andreas Martin und Karl-Heinz Nolte für ihre Freundschaft und zahllose Freizeitaktivitäten jenseits der Laborbank.

Und ich möchte Irina Mulyaeva für ihre Liebe danken, die sie mir geschenkt hat, und für ihre Unterstützung in schlechten Zeiten.