

Charakterisierung zweier im Mammakarzinom überexprimierter Gene: LIV-1 und Stromelysin-3

von Diplom-Ingenieur

Grit Kasper

aus Jena

von der Fakultät für Prozesswissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

-Dr.-Ing.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. R. Lauster

Gutachter: Prof. Dr. U. Stahl

Gutachter: Dr. K. Lehmann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 8.Juni 2004

Berlin 2004

D 83

Symbole und Abkürzungen

| | |
|----------------------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| C | Cytosin |
| cDNA | komplementäre DNA |
| cRNA | komplementäre RNA |
| c _t -Wert | Zyklusanzahl der quantitativen RT-PCR |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DCIS | duktales Karzinom <i>in situ</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ø | Durchschnitt (mathematisches Mittel) |
| EGF | „epidermal growth factor“ |
| EST | „expressed sequence tag“ |
| FasL | Fas Ligand |
| FBS | fötales bovines Serum |
| bFGF | „basic fibroblast growth factor“ |
| FI | Einheit der Färbeintensität |
| G | Guanin |
| GAPDH | Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase |
| h | Stunde |
| ICC | Immunzytochemie |
| IDC | invasiv duktales Karzinom |
| IGF-1 | „insulin like growth factor-1“ |
| IGFBP-1 | “insulin like growth factor binding protein 1” |
| IHC | Immunhistochemie |
| ILC | invasiv lobuläres Karzinom |
| ISH | <i>in situ</i> Hybridisierung |

| | |
|--------------|---|
| kDa | kilo Dalton |
| KFI | krankheitsfreies Intervall |
| LIV-1 | Liverpool-1 |
| LIV-1a | LIV-1 spezifischer polyklonaler Antikörper |
| LNK | Lymphknoten |
| LZT | „LIV-1 like zinc transporter“ |
| min | Minute |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| mRNA | „messenger“ RNA |
| n | Anzahl |
| N | Normalgewebe |
| - | negativ |
| OD | optische Dichte |
| ÖR | Östrogenrezeptor- α |
| PBS | “phosphate buffered saline” |
| PDGF | „platelet derived growth factor“ |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMQ | “perfect match quartil” |
| + | positiv |
| PR | Progesteronrezeptor |
| p-Wert | „probability“ –Wert |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | “interfering” RNA |
| RT-PCR | „reverse transcription-polymerase chain reaction“ |
| sek | Sekunde |
| SL-3 | Stromelysin-3 |
| Tab. | Tabelle |
| TGF- β | „transforming growth factor- β “ |
| T | Thymidin |
| Tu | Tumorgewebe |
| TIMP | „tissue inhibitor of matrix proteases“ |

Nomenklatur

mRNA, cDNA und Gennamen sind mit kursiven Großbuchstaben angegeben, z.B. *LIV-1*

Proteinnamen sind in Großbuchstaben angegeben, z.B. LIV-1

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| SYMBOLS UND ABKÜRZUNGEN | II |
| NOMENKLATUR | IV |
| ZUSAMMENFASSUNG | V |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 EINFÜHRUNG IN DIE TUMORBIOLOGIE..... | 1 |
| 1.2 DAS MAMMAKARZINOM..... | 2 |
| 1.2.1 Inzidenz und Mortalität..... | 2 |
| 1.2.2 Risikofaktoren..... | 2 |
| 1.2.3 Histologie..... | 3 |
| 1.2.4 Tumorgraduierung..... | 4 |
| 1.2.5 Tumorstadien..... | 5 |
| 1.2.6 Prognostische Marker..... | 5 |
| 1.2.7 Therapie..... | 6 |
| 1.2.8 Tumorwachstum, Östrogenrezeptor und Tamoxifenbehandlung..... | 7 |
| 1.3 NEUE ANSÄTZE IN DER TUMORTHERAPIE..... | 8 |
| 1.4 DER PUTATIVE ZINKTRANSPORTER LIV-1..... | 9 |
| 1.4.1 Assoziation mit dem Mammakarzinom..... | 9 |
| 1.4.2 Struktur- und Funktionsanalysen..... | 10 |
| 1.5 DIE MATRIX-METALLOPROTEASE STROMELYSIN-3 (SL-3)..... | 11 |
| 1.5.1 Assoziation mit dem Mammakarzinom..... | 12 |
| 1.5.2 Expression in Normalgeweben..... | 13 |
| 1.5.3 Struktur- und Funktionsanalysen..... | 13 |
| 1.5.4 Regulation der Expression und Aktivität..... | 15 |
| 1.6 PROBLEM- UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT..... | 16 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2 | MATERIAL, METHODEN | 17 |
| 2.1 | OLIGONUKLEOTIDE | 17 |
| 2.2 | BIOLOGISCHES MATERIAL | 17 |
| 2.3 | MEDIEN UND ZUSÄTZE | 18 |
| 2.4 | ENZYME | 18 |
| 2.5 | ANTIKÖRPER | 19 |
| 2.6 | PUFFER, LÖSUNGEN, CHEMIKALIEN | 19 |
| 2.7 | GERÄTE, ZELLKULTURMATERIALIEN | 20 |
| 2.8 | DNA-BASIERTE METHODEN | 20 |
| 2.8.1 | Klonierung | 20 |
| 2.8.2 | Sequenzierung | 21 |
| 2.8.3 | Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) | 21 |
| 2.9 | mRNA- UND cDNA BASIERTE METHODEN | 22 |
| 2.9.1 | Isolation von mRNA und cDNA Synthese | 22 |
| 2.9.2 | Mikrodissektion und Hybridisierung von Affymetrix Genchips | 22 |
| 2.9.3 | quantitative RT-PCR („TaqMan™“) | 23 |
| 2.9.4 | in situ Hybridisierung | 23 |
| 2.10 | PROTEINCHEMISCHE METHODEN | 24 |
| 2.10.1 | Herstellung von Proteinlysaten | 24 |
| 2.10.2 | SDS-PAGE und Western Blot | 24 |
| 2.10.3 | Immunzytochemie | 25 |
| 2.10.4 | Immunhistochemie | 25 |
| 2.10.5 | in vitro Transkription / Translation | 26 |
| 2.10.6 | Immunpräzipitation | 26 |
| 2.11 | ALLGEMEINE METHODEN DER SÄUGERZELLKULTUR | 26 |
| 2.12 | METHODEN ZUR FUNKTIONELLEN ANALYSE | 26 |
| 2.12.1 | Herstellung stabil transfizierter Klone | 26 |
| 2.12.2 | Kokulturen | 27 |
| 2.12.3 | 3D Matrigelkulturen | 27 |
| 2.12.4 | MTS Test | 27 |
| 2.12.5 | Softagartest | 27 |
| 2.12.6 | <i>in vivo</i> Xenograft Experimente | 28 |
| 2.13 | STATISTISCHE METHODEN | 28 |
| 2.13.1 | Fehlerberechnung und Expressionsanalyse | 28 |
| 2.13.2 | Analyse der Überlebenszeiten | 29 |
| 2.14 | GEWEBEPROBEN UND QUANTIFIZIERUNGSSYSTEM | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | ERGEBNISSE | 30 |
| 3.1 | LIV-1 mRNA EXPRESSION IN TUMOR- UND NORMALGEWEBE DER BRUST | 30 |
| 3.1.1 | Ergebnisse der Affymetrix Genchip Hybridisierungen..... | 30 |
| 3.1.2 | Ergebnisse der quantitativen RT-PCR | 33 |
| 3.1.3 | Ergebnisse der in situ Hybridisierung..... | 34 |
| 3.2 | <i>LIV-1</i> mRNA EXPRESSION IN NORMALGEWEBEN..... | 38 |
| 3.3 | KLONIERUNG DER <i>LIV-1</i> CDNA..... | 39 |
| 3.3.1 | Vergleich mit publizierten Sequenzen | 39 |
| 3.3.2 | Überprüfung des Expressionsplasmides | 40 |
| 3.4 | VALIDIERUNG EINES LIV-1 SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERS..... | 40 |
| 3.4.1 | Testung in Western Blot Analysen und in der Immunzytochemie | 41 |
| 3.4.2 | Testung in der Immunpräzipitation..... | 42 |
| 3.4.3 | Testung der Paraffingängigkeit | 43 |
| 3.5 | UNTERSUCHUNG DER SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON LIV-1 | 44 |
| 3.5.1 | Computergestützte Vorhersagen..... | 44 |
| 3.5.2 | Kokalisation mit Markerproteinen..... | 44 |
| 3.6 | LIV-1 PROTEINEXPRESSION IN TUMOR- UND NORMALGEWEBE DER BRUST | 45 |
| 3.6.1 | Ergebnisse der Immunhistochemie | 45 |
| 3.6.2 | Western Blot Analyse von Zelllysaten..... | 49 |
| 3.7 | LIV-1 PROTEINEXPRESSION IN NORMALGEWEBEN..... | 49 |
| 3.8 | PROGNOSTISCHE RELEVANZ VON LIV-1 | 50 |
| 3.8.1 | LIV-1 mRNA Menge als Marker eines funktionellen Östrogenrezeptors | 51 |
| 3.8.2 | LIV-1 Proteinmenge als prognostischer Marker..... | 52 |
| 3.9 | SL-3 mRNA EXPRESSION IN TUMOR- UND NORMALGEWEBE DER BRUST | 55 |
| 3.9.1 | Ergebnisse der Affymetrix Genchip Hybridisierungen | 55 |
| 3.9.2 | Ergebnisse der quantitativen RT-PCR | 56 |
| 3.10 | SL-3 mRNA EXPRESSION IN NORMALGEWEBEN..... | 58 |
| 3.11 | SL-3 PROTEINEXPRESSION IN TUMOR- UND NORMALGEWEBE DER BRUST..... | 59 |
| 3.11.1 | Gewebeproben..... | 59 |
| 3.11.2 | Kokulturen..... | 61 |
| 3.12 | KLONIERUNG DER SL-3 CDNA..... | 62 |
| 3.13 | FUNKTIONELLE ANALYSEN VON SL-3 ÜBEREXPRIMIERENDEN KLONEN <i>IN VITRO</i> | 62 |
| 3.13.1 | Herstellung und Überprüfung stabil transfizierter Klone..... | 63 |
| 3.13.2 | Etablierung eines 3D in vitro Kulturmodells | 65 |
| 3.13.3 | Morphologie der Klone | 66 |
| 3.13.4 | Analyse der Zellzahl | 66 |
| 3.13.5 | Auswirkung von Wachstumsfaktoren auf die Zellzahl | 67 |
| 3.13.6 | Verankerungsunabhängigen Wachstum | 70 |
| 3.14 | FUNKTIONELLE ANALYSE VON SL-3 ÜBEREXPRIMIERENDEN KLONEN <i>IN VIVO</i> | 71 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4 | DISKUSSION | 74 |
| 4.1 | EXPRESSIONSANALYSE VON <i>LIV-1</i> mRNA | 74 |
| 4.1.1 | Vergleich der verwendeten Methoden | 74 |
| 4.1.2 | Expression im Mammakarzinom | 76 |
| 4.1.3 | Expression in Normalgeweben | 78 |
| 4.2 | SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON <i>LIV-1</i> | 78 |
| 4.3 | EXPRESSIONSANALYSE VON <i>LIV-1</i> PROTEIN | 79 |
| 4.3.1 | Expression im Mammakarzinom | 79 |
| 4.3.2 | Expression in Normalgeweben | 80 |
| 4.4 | <i>LIV-1</i> PROTEINMENGE ALS PROGNOTISCHER MARKER | 81 |
| 4.5 | <i>LIV-1</i> mRNA MENGE ALS MARKER DES FUNKTIONELLEN ÖSTROGENREZEPTORS | 81 |
| 4.6 | <i>LIV-1</i> EXPRESSION IN TAMOXIFEN RESISTENTEN REZIDIVEN | 83 |
| 4.7 | ÜBERLEGUNGEN ZUR FUNKTION VON <i>LIV-1</i> | 84 |
| 4.7.1 | <i>LIV-1</i> als putatives Zinkhomeostasis-beeinflussendes Protein | 84 |
| 4.7.2 | Zink in der Tumorprogression | 85 |
| 4.7.3 | <i>LIV-1</i> als potentielles Tumorsuppressorprotein | 86 |
| 4.8 | EXPRESSIONSANALYSE VON <i>SL-3</i> | 86 |
| 4.8.1 | mRNA Expression im Mammakarzinom | 87 |
| 4.8.2 | mRNA Expression in Normalgeweben | 88 |
| 4.8.3 | Proteinexpression im Mammakarzinom | 88 |
| 4.8.4 | Proteinexpression in Kokulturen | 88 |
| 4.9 | FUNKTIONELLE ANALYSE DER TUMORRELEVANZ VON <i>SL-3</i> | 90 |
| 4.9.1 | Das verwendete <i>in vitro</i> Modellsystem | 90 |
| 4.9.2 | Funktionelle Analyse <i>SL-3</i> überexprimierender Klone <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> | 91 |
| 4.9.3 | Putativer Mechanismus des <i>SL-3</i> Effektes | 93 |
| 4.10 | <i>SL-3</i> ALS POTENTIELLES ZIELMOLEKÜL EINER MEDIKAMENTENENTWICKLUNG | 95 |
| 4.11 | FAZIT UND AUSBLICK | 97 |
| | LITERATUR | 100 |
| | DANKSAGUNG | 113 |
| | ANHANG | 114 |
| | PUBLIKATIONEN / PATENTE | 114 |
| | LEBENS LAUF | 115 |

Zusammenfassung

Um neue Zielmoleküle für die rationale Medikamentenentwicklung gegen Tumorerkrankungen der Brust identifizieren zu können, wurden anhand von Genchip Hybridisierungsdaten die im Mammakarzinom überexprimierten Gene LIV-1 und Stromelysin-3 (SL-3) für eine weitere Analyse des Proteinexpressionsmusters bzw. der Tumorrelevanz ausgewählt. Die Überexpression auf mRNA Ebene wurde zuvor mittels quantitativer RT-PCR bestätigt.

Für die Transkripte des putativen Zinktransporters LIV-1 wurde durch *in situ* Hybridisierung an 111 Tumor- und dazugehörigen Normalgeweben der Brust die Assoziation mit einem positiven Östrogenrezeptor- α Status sowie deren Überexpression in ca. 50% der Brusttumorproben bestätigt. Da gezeigt werden konnte, dass die *LIV-1* Expressionshöhe die Aktivität des Östrogenrezeptor- α besser reflektiert als der derzeit in der klinischen Diagnostik verwendete Progesteronrezeptorstatus, könnten diese für die Entscheidung über eine anti-hormonale Therapie verwendet werden. Durch die Herstellung und Validierung eines LIV-1 spezifischen polyklonalen Antikörpers war es möglich, die Lokalisation des Proteins im endoplasmatischen Retikulum nachzuweisen. Anhand von immunhistochemischen Färbungen wurde festgestellt, dass LIV-1 mRNA- und Proteinexpressionshöhen weder in Normal- noch Tumorgeweben der Brust miteinander korrelieren. Dies deutet auf das Vorhandensein posttranskriptionaler Regulationsmechanismen hin. Allerdings wurde nachgewiesen, dass die LIV-1 Proteinmengen für die Prognose der Länge des krankheitsfreien Intervalls geeignet sind. Im Gegensatz zur mRNA- war die Proteinexpression in aggressiven Tumoren im Vergleich zum Brustnormalgewebe signifikant erniedrigt, was auf eine Funktion als neues Tumorsuppressorprotein hindeutet. Da außerdem eine hohe Expression des Proteins in Normalgeweben lebenswichtiger Organe gezeigt wurde, scheint LIV-1 als potentiell Zielmolekül für die Entwicklung therapeutischer Inhibitoren ungeeignet zu sein.

Für die sekretierte Matrix-Metalloprotease SL-3, deren prognostische Signifikanz bereits bekannt war, wurde gezeigt, dass eine Überexpression in humanen Brusttumorzelllinien deren Zellzahl in 3D Zellkulturmodellen erhöht. Dieser Effekt war abhängig von der IGF-1 Signalkaskade. Außerdem steigerte SL-3 sowohl in *in vitro* Softagartests als auch in *in vivo* Xenograft Tumormodellen in Nacktmäusen die Tumorgenität der Zelllinien. *In vivo* führte die SL-3 Überexpression zu einer höheren Anwachsrate sowie einer Volumenzunahme der Tumore. Dieser Effekt war ebenfalls abhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren.

Die gewonnenen Daten zeigen somit, dass LIV-1 als prognostischer Marker sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene klinische Relevanz beweisen könnte. SL-3 hingegen stellt aufgrund seiner hohen Überexpression im Mammakarzinom und der gezeigten Tumorrelevanz *in vitro* und *in vivo* einen viel versprechenden Kandidaten für die Entwicklung eines spezifischen Therapieansatzes dar.

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Tumorbologie

Nach kardiovaskulären Erkrankungen stellen Tumore die zweithäufigste Todesursache in Ländern der westlichen Welt dar [Statistisches Bundesamt, 2002]. Als Tumore werden alle unnormalen Gewebsneubildungen (Neoplasien) bezeichnet, wobei man zwischen benignen und malignen Tumoren unterscheidet [David, 1990]. Unter Krebserkrankungen werden im weitesten Sinne alle malignen Tumore verstanden [David, 1990]. Je nach ihrem zellulären Ursprung werden die Tumore weiter unterteilt, so bezeichnet man z.B. bösartige Tumore des Epithels als Karzinome und die des Mesenchyms als Sarkome [Schäffler & Schmitt, 1993].

Tumorerkrankungen sind multifaktorielle, genetische Erkrankungen, d.h. im Verlauf der Entwicklung vom Normalgewebe zum Tumorgewebe müssen mehrere Abnormalitäten angehäuft werden. Dieser Prozess wurde anhand einer Mehrschritt-Theorie der Tumorentstehung erklärt [Vogelstein & Kinzler, 1993]. Dabei gewinnen definitionsgemäß Onkogene an Funktion und Tumorsuppressorgene verlieren an Aktivität im Vergleich zum Normalgewebe [Bishop, 1985; Bishop, 1991]. Dadurch werden verschiedene Schritte der Tumorentstehung, -promotion oder -erhaltung gefördert bzw. ermöglicht. Die Abberationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen können auf DNA Ebene (z.B. Genamplifikationen oder Punktmutationen), auf mRNA-Ebene (z.B. Veränderung der mRNA-Stabilität) sowie auf Proteinebene (z.B. Änderung der Lokalisation oder der Proteinstabilität) stattfinden [Baylin *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1995; Knudson, 1971; Singer & Berg, 1992; Storey *et al.*, 1998].

Als Onkogene bzw. Tumorsuppressoren kommen zahlreiche Genen in Frage, von denen viele nur in bestimmten Tumorentitäten aktiviert bzw. supprimiert werden [Bast *et al.*, 2000]. Betroffen sind außerdem verschiedenste zelluläre Regulationsmechanismen, wie z.B. DNA-Reparatur, Apoptose oder Zell/Matrixinteraktionen. Trotz dieser Komplexität postulierten Hanahan und Weinberg, dass die Zellen der meisten Krebsarten im Laufe der Tumorprogression die gleichen sechs Fähigkeiten erwerben: 1.) Verhinderung von Apoptose, 2.) Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren, 3.) Desensibilisierung gegenüber wachstumshemmenden Signalen, 4.) endloses Teilungspotential 5.) Angiogenese und 6.) Invasion in Gewebe und Metastasierung [Hanahan & Weinberg, 2000].

1.2 Das Mammakarzinom

1.2.1 Inzidenz und Mortalität

Brustkrebs ist die am häufigsten diagnostizierte Krebsform bei Frauen in Industrieländern [Bast *et al.*, 2000]. In Deutschland entwickelt zirka jede neunte Frau diese Krankheit im Laufe ihres Lebens. Mit über 18.000 Todesfällen jährlich stellt Brustkrebs die häufigste tumorbedingte Todesursache für Frauen in Deutschland dar [Statistisches Bundesamt, 2002]. Da es kein deutschlandweites Krebsregister gibt, kann die jährliche Zahl der Neudiagnosen in Deutschland nur abgeschätzt werden: sie liegt bei ca. 43.000 Frauen [Statistisches Bundesamt, 2002]. Weltweit sind es ca. 900.000 neu diagnostizierte Fälle pro Jahr [Bast *et al.*, 2000]. Die Mortalitätsrate liegt in Deutschland bei ca. 30 pro 100.000 Frauen jährlich. [Statistisches Bundesamt, 2002].

Da nicht der Primärtumor, sondern die Metastasen die häufigste Todesursache sind, hängt die 5-Jahresüberlebensrate ganz entscheidend vom Ort der Metastasierung ab. So überleben 50% der Patienten mit Metastasen in der Brust, aber nur 10% mit Knochenmetastasen weitere 5 Jahre nach der Diagnose. Bei Lebermetastasen liegt die 2-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit unter 10% [Statistisches Bundesamt, 2002].

1.2.2 Risikofaktoren

Die größten Risikofaktoren für eine Erkrankung an einem Mammakarzinom sind Alter und Geschlecht. Brustkrebs ist bei Frauen ca. 100- bis 200-fach häufiger als bei Männern [Bast *et al.*, 2000]. Frauen im Alter von 20 bis 30 Jahren haben eine jährliche Inzidenzrate von weniger als 10 Fällen pro 100.000 Einwohner, wobei für Frauen über 60 Jahre eine Inzidenzrate von über 300 Fälle je 100.000 Einwohner pro Jahr zu verzeichnen ist [Colditz *et al.*, 1993; Henderson, 1993].

Die Inzidenz- und Mortalitätsraten unterscheiden sich stark zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen. So werden in Japan 20 neu diagnostizierte Fälle pro 100.000 Einwohner gemeldet, hingegen in den USA und Nordeuropa liegt die durchschnittliche Inzidenzrate bei 110 pro 100.000 Einwohner [Parkin & Muir, 1992]. Diese Unterschiede wurden zumindest zum Teil auf verschiedene Ernährungs- und Verhaltensgewohnheiten zurückgeführt. Dabei ist wahrscheinlich das reproduktive Verhalten entscheidend, da eine starke Korrelation zwischen dem weiblichen Hormon Östrogen und dem Risiko an Brustkrebs zu erkranken postuliert wurde [Bast *et al.*, 2000]. So zeigen epidemiologische Studien, dass eine fehlende Schwangerschaft einen Risikofaktor darstellt [Kelsey & Gammon, 1991; Sellers *et al.*, 1992]. Weiterhin sind früher Beginn der Menarche und spätes Einsetzen der Menopause mit einem erhöhten Risiko verbunden [Henderson *et al.*, 1985]. Ob ein Zusammenhang zwischen der zusätzlichen Einnahme von Hormonen durch orale Kontrazeptiva oder im Rahmen einer Hormonersatztherapie besteht, ist bisher nicht eindeutig geklärt [Armstrong, 1988; Buring *et al.*, 1987; Olsson, 1989; Pike *et al.*, 1981].

Ein weiterer entscheidender Risikofaktor ist die genetische Disposition. Dabei spielen Mutationen in den beiden Brustkrebs-assoziierten Gene BRCA1 und BRCA2 eine wesentliche Rolle. Frauen mit Mutationen in diesen Genen erkranken mit 85%-iger Wahrscheinlichkeit bis zu ihrem 80. Lebensjahr an Brustkrebs und mit einer 50%-igen Wahrscheinlichkeit bis zum 50. Lebensjahr [Statistisches Bundesamt, 2002]. Andere Risikofaktoren wie Alkoholkonsum, regelmäßige physische Aktivität, Abtreibungen, Koffeingenuss u. ä. werden zusätzlich diskutiert, sind aber weniger bedeutend als die hier aufgeführten [Bast *et al.*, 2000].

1.2.3 Histologie

Die Brust der erwachsenen Frau unterteilt sich in stromale und epitheliale Komponenten. Das Stroma besteht aus Fett- und Bindegewebe. Zu den epithelialen Strukturen gehören die Acini mit ihren Ausführungsgängen und die Milchgänge. Acini sind die Endknospen des Drüsensystems und sezernieren während der Laktationsperiode die Milch. Als Lobuli werden die Endstrukturen der Ausführungsgänge mit den Acini bezeichnet (Abb. 1).

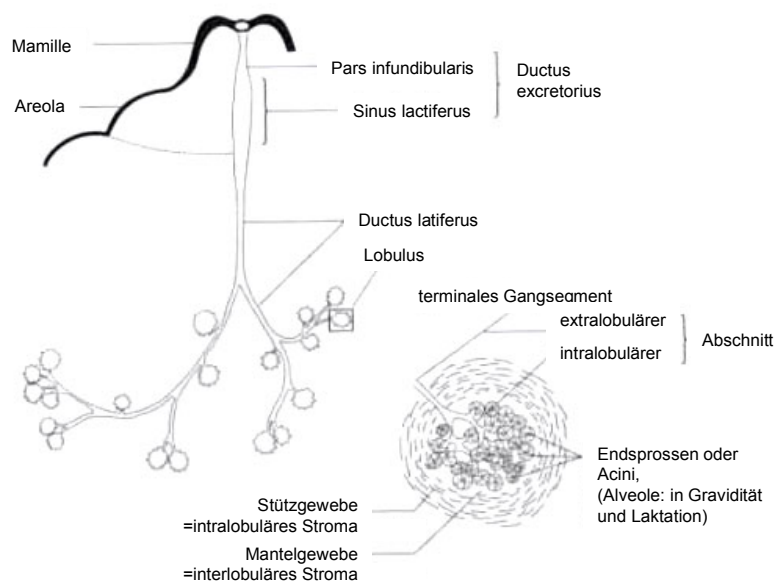


Abb. 1: Anatomie des Milchgangsystems der Mamma. Abbildung übernommen aus Meuret [1995].

Mammakarzinome sind Tumore der Brust mit epithelialeem Ursprung. Sie werden entsprechend der Invasivität sowie der Zellart aus der sie entstanden sind, unterschieden (duktal, d.h. aus Zellen des Gangsystems oder lobulär, d.h. aus Zellen der Lobuli). Bei nicht invasiven („*in situ*“) Tumoren bleibt die Basalmembran der Epithelzellen intakt und die Tumorzellen dringen nicht in das umliegende Stroma ein [Meuret, 1995]. Durch die immer weiter verbreitete Anwendung der Mammographie stellen mittlerweile bis zu 30% aller diagnostizierten Karzinome *in situ* Tumore dar [Baker, 1982]. Wenn diese Tumore vom Gangsystem des Brustepitheliums abstammen gehören sie zur Klasse der dukalen Karzinoma *in situ* (DCIS). DCIS werden je nach dem pathologischem

Erscheinungsbild in die Subgruppen der mikropapillären, papillären, soliden, kribiformen oder komedotypischen Tumore unterteilt [Meuret, 1995]. In einigen Fällen entwickelt sich ein DCIS in eine invasive Tumorform [Ueno *et al.*, 1997]. Die wesentlich homogenere Gruppe der lobulären Karzinoma *in situ* (LCIS), die ungefähr genauso häufig auftritt wie die DCIS, leitet sich vom Epithel der Lobuli ab.

Im Gegensatz zu *in situ* Karzinomen durchbrechen invasive Tumore die Basalmembran und dringen in das umliegende stromale Gewebe ein [Meuret, 1995]. Invasiv duktales Karzinome (IDC) bilden mit einem Anteil von 65%-80% die größte Gruppe der invasiven Mammakarzinome [Rosen, 1991]. Sie stellen eine heterogene Gruppe von Karzinomen dar, die keine spezifischen Charakteristiken aufweist („not otherwise specified“, NOS). Diese Tumore haben unter den Mammakarzinomen die schlechteste Prognose [Bast *et al.*, 2000]. Es war bisher nicht möglich die morphologisch und biologisch heterogenen IDCs in weitere Untergruppen mit bestimmten Merkmalen einzuteilen.

Invasiv lobuläre Karzinome (ILC) sind immer im oberen äußeren Quadranten der Mamma lokalisiert [Meuret, 1995]. Mit einer Häufigkeit von 3%-7% sind sie wesentlich seltener als IDCs. Mischformen aus invasiven lobulären Karzinomen und anderen Komponenten wie z.B. tubulären, soliden oder trabekulären Anteilen treten in ca. 10%-14% der invasiven Mammakarzinome auf [Meuret, 1995]. Andere invasive Mammakarzinomtypen sind medulläre Karzinome (5%-9% aller invasiven Mammatumore) oder muzinöse Tumore, die ca. 3% aller invasiven Mammakarzinome darstellen [Bast *et al.*, 2000]. Selten auftretende Formen sind invasiv papilläre (<1%) und invasiv tubuläre (2%) Tumore [Meuret, 1995].

1.2.4 Tumorgraduierung

Da eine Verbindung zwischen dem Differenzierungsgrad und der Aggressivität von Brusttumoren besteht [Bast *et al.*, 2000], werden Mammakarzinome in der klinischen Routine in drei histologische Grade eingeteilt. Diese Einteilung berücksichtigt die zytologischen Differenzierung und das Wachstumsmuster des Tumors. Kriterien sind die Bildung von Tubuli, der nukleäre Grad der Zellen und die Mitoserate. Der nukleäre Grad beschreibt die Morphologie des Zellkerns. Große, pleomorphe Kerne, Hyperchromasie und Nukleolen gelten als Zeichen geringer Differenzierung. Bei dem histologischen und auch dem nukleären „Grading“ gilt: Grad 1 bedeutet gut differenziert, Grad 2 intermediäre Differenzierung und Grad 3 kennzeichnet geringe Differenzierung [Meuret, 1995]. In den USA ist das histologische System nach Scarff-Bloom Richardson zur Bestimmung des histologischen Grades weit verbreitet, wohingegen in Europa meistens die Elston-Ellis Modifikation dieses Systems Anwendung findet [Bloom & W.W., 1957; Elston & Ellis, 1991; Scarff & Torloni, 1968].

1.2.5 Tumorstadien

Das „American Joint Committee on Cancer“ hat ein so genanntes TNM System entwickelt, mit denen Patienten in Gruppen unterschiedlicher Prognosen eingeteilt werden können [Woodward *et al.*, 2003]. Dadurch kann nicht nur eine bessere Voraussage des Krankheitsverlaufs gemacht werden, sondern auch eine bessere Beurteilung der Effektivität neuer Therapeutika erfolgen, da Patienten des gleichen Stadiums verglichen werden können. Die Stadien (0, I, IIa, IIb, IIIa, IIIb und IV) berücksichtigen die Tumorgröße („T“), den Lymphknotenstatus („N“) und das Vorhandensein von entfernten Metastasen („M“). Dabei korreliert die Höhe des Stadiums umgekehrt mit der Länge des krankheitsfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens [Woodward *et al.*, 2003].

Die Größe des Primärtumors wird wie folgt unterteilt: T_{is}: *in situ* Karzinom, T₁: 2 cm oder kleiner, T₂: von 2 cm bis 5 cm, T₃: größer als 5 cm, T₄: Tumor jeder Größe mit Ausläufern in den Brustkorb oder die Haut. T₀ bedeutet es ist kein primärer Tumor auffindbar. Für die Einschätzung des Lymphknotenstatus werden folgende Gruppen unterteilt: N₀: keine Metastase in regionalen Lymphknoten, N₁: Metastasen in beweglichen ipsilateralen Lymphknoten der Achselhöhlen, N₂: Metastasen in 1-3 Lymphknoten, N₃: Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten. Das Auftreten von entfernten Metastasen wird mit M₀ für nicht vorhanden und M₁ für vorhanden angegeben.

1.2.6 Prognostische Marker

Prognostische Marker werden benutzt, um den Krankheitsverlauf sowie das Ansprechen auf bestimmte Therapien des primären invasiven Mammakarzinoms vorherzusagen. Die Prognose eines Tumors ist entscheidend um zwischen potentiellen Nebenwirkungen bestimmter Therapien und deren Erfolgsaussichten abwägen zu können. Außer den bereits erwähnten pathologischen Faktoren wie Lymphknotenstatus und Tumorgröße werden dafür üblicher Weise noch der histologische Tumortyp, der histologische Grad und der Hormonrezeptorstatus herangezogen [Schnitt, 2001].

Der Lymphknotenstatus ist der bei weitem wichtigste Parameter. Das Gesamtüberleben und die Länge des krankheitsfreien Intervalls nehmen mit steigender Anzahl tumorpositiver Lymphknoten ab [Page *et al.*, 1998]. So haben Brustkrebspatienten ohne Lymphknotenmetastasen eine 70%-80%-ige Wahrscheinlichkeit eines Langzeitüberlebens, während für Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine 80%-ige Wahrscheinlichkeit besteht, dass entfernte Metastasen und somit eine unheilbare Erkrankung auftritt [Collan *et al.*, 1994; Dorr, 1993; Goldhirsch *et al.*, 1995].

Auch die Tumorgröße hat eine starke prognostische Relevanz für das Mammakarzinom [Carter *et al.*, 1989]. Meistens ist sie bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen der ausschlaggebende Faktor für die Entscheidung über eine systemische adjuvante Behandlung [Bast *et al.*, 2000]. In Patienten mit Lymphknotenmetastasen hingegen trägt die Tumorgröße nicht viel zur ohnehin schlechten Prognose bei [Bast *et al.*, 2000].

Viele Studien haben die prognostische Relevanz des histologischen Grades beschrieben, wobei ein niedriger Grad mit besserer Prognose verbunden ist [Contesso *et al.*, 1987; Henson *et al.*, 1991; Le Doussal *et al.*, 1989]. Einige Arbeiten deuten auch auf ein besseres Ansprechen von Tumoren mit niedrigerem Grad auf bestimmte Chemotherapeutika hin [Fisher *et al.*, 1983; Pinder *et al.*, 1998].

In den letzten 20 Jahren wurde intensiv nach neuen biologischen und molekularen Prognosemarkern gesucht [Chang *et al.*, 2004; Rudolph *et al.*, 1999; Schnitt, 2001; Sorlie *et al.*, 2001; van 't Veer *et al.*, 2002]. Allerdings liefern diese Studien oft gegensätzliche Ergebnisse oder sind schwer zu vergleichen, weil Unterschiede im Krankheitsstadium, der Behandlung, der statistischen Methoden o. ä. bestehen [Schnitt, 2001]. Daher ist weiterhin ein Bedarf an neuen Markern vorhanden, der Patienten entweder genauer nach ihrer Prognose gruppiert oder das Ansprechen auf bestimmte Therapieformen vorhersagt [Schnitt, 2001].

1.2.7 Therapie

Für Therapieentscheidungen werden Patienten entsprechend der erwähnten prognostischen Marker in Risikoklassen (niedrig, mittel, hoch) eingeteilt [NCI, 2003]. Standardtherapie ist derzeit die operative Entfernung des Tumors kombiniert mit Strahlen-, Chemo- oder Hormontherapie je nach Risikoklasse [NCI, 2003]. Es wird möglichst brusterhaltend operiert. Bei allen Östrogenrezeptor- α (ÖR)- und Progesteronrezeptor (PR)-positiven Tumoren wird üblicher Weise Tamoxifen oder ein anderes Antiöstrogen als adjuvante anti-hormonale Therapie verabreicht [Bettag *et al.*, 2004]. Aufgrund des Risikos schwerer Nebenwirkungen werden Patienten ohne Lymphknotenmetastasen normaler Weise nur mit Chemotherapie behandelt, wenn sie einer mittleren oder hohen Risikogruppe angehören [Bettag *et al.*, 2004]. Patienten mit Lymphknotenmetastasen hingegen erhalten meistens Chemotherapie. Als Chemotherapeutika kommen u.a. zytotoxische Substanzen aus der Klasse der Anthracycline (z.B. Doxorubicin), der Taxane (z.B. Paclitaxel), der Fluoropyrimidine (z.B. 5-Fluorouridin) und alkylierender Substanzen (z.B. Cyclophosphamide) zur Anwendung [Bettag *et al.*, 2004]. Auf die sehr vielfältigen Behandlungsregime soll im Folgenden nicht weiter eingegangen werden (für eine Übersicht siehe [Bettag *et al.*, 2004]). Als gesonderte Klasse in Hinblick auf die Behandlung ist das Mammakarzinom mit entfernten Metastasen zu betrachten. Da eine Heilung derzeit nicht möglich ist, steht neben Hormon-, Chemo- und Strahlentherapie die Palliativmedizin im Vordergrund [Bettag *et al.*, 2004].

In den letzten Jahren bzw. Jahrzehnten hat sich zwar die frühzeitige Diagnose des Mammakarzinoms durch Einführung von Vorsorgeprogrammen verbessert, trotzdem liegt die 10-Jahresüberlebensrate nur bei 50%, insofern zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Fernmetastasen vorhanden waren [Statistisches Bundesamt, 2002]. Diese Zahl macht den Bedarf an neuen, innovativen Medikamenten und Behandlungsstrategien für das Mammakarzinom deutlich.

1.2.8 Tumorwachstum, Östrogenrezeptor und Tamoxifenbehandlung

Der Östrogenrezeptor ist ein Regulator für die Differenzierung und Proliferation von Brustgewebe. Es wurden zwei Formen des Östrogenrezeptors beschrieben [Shao & Brown, 2004]. Da die Funktion der β -Form im Brustgewebe noch nicht vollständig geklärt ist, soll im Folgenden nur auf den Östrogenrezeptor- α (ÖR) eingegangen werden.

Die biologische Aktivität des Steroidhormons Östrogen wird durch die hochaffine Bindung an den ÖR vermittelt, welcher zur Familie der Liganden-induzierbaren nukleären Rezeptoren gehört [Evans, 1988; Wahli & Martinez, 1991]. Einige Studien weisen darauf hin, dass östrogenabhängige Brustkrebszellen eigene Wachstumsfaktoren bilden können und damit autokrin bzw. parakrin auf das umliegende Stroma wirken [Lippman *et al.*, 1987]. Potentielle autokrine / parakrine Faktoren sind dabei EGF („epidermal growth factor“), TGF- α („transforming growth factor- α “), PDGF („platelet derived growth factor“), bFGF („basic fibroblast growth factor“), IGF-1 und IGF-2 („insulin like growth factor-1 und -2“) [Bast *et al.*, 2000; Ronnov-Jessen *et al.*, 1996]. Trotz des wachstums-stimulierenden Effekts von Östrogen haben ÖR positive Tumore eine bessere Prognose. Dies ist wahrscheinlich auf die Assoziation des ÖR mit einem höheren Differenzierungsgrad, DNA-Diploidie und einem niedrigeren Proliferationsindex dieser Tumore zurückzuführen [Battaglia *et al.*, 1988; Gago *et al.*, 1998].

Ungefähr 60%-80% der diagnostizierten Mammakarzinome sind sowohl positiv für den ÖR als auch für den vom ÖR regulierten Progesteronrezeptor [Bast *et al.*, 2000]. Dieser Patientengruppe werden Antiöstrogene als adjuvante Standardtherapie verabreicht. Derzeit ist Tamoxifen das am häufigsten eingesetzte Antiöstrogen. Tamoxifen ist ein nichtsteroidaler ÖR-Inhibitor, der genau wie Östrogen an der hormonbindenden Domäne des ÖR angreift, aber eine andere Konformationsänderung induziert, so dass die transaktivierende Funktion der Domäne und damit die Transkription ÖR induzierter Gene herabgesetzt wird [Bast *et al.*, 2000].

Allerdings profitieren nur 70% der ausgewählten Patienten von einer Tamoxifen Behandlung und fast alle Tumore, die anfangs auf das Antiöstrogen angesprochen haben, entwickeln schließlich Resistenzen gegenüber diesem ÖR-Antagonisten [Clarke *et al.*, 2001b]. Diese Resistenzen werden zu einem Großteil den nicht nur antagonistischen, sondern auch agonistischen Eigenschaften von Tamoxifen zugeschrieben. Deswegen werden weitere ÖR-Inhibitoren geprüft, die ausschließlich antagonistische Eigenschaften haben oder andere Schritte des ÖR-Signalweges angreifen. So befinden sich zum Beispiel Aromataseinhibitoren, welche die Östrogensynthese hemmen, in der klinischen Prüfung [Johnston & Dowsett, 2003]. Als mögliche molekulare Mechanismen der Resistenzentwicklung wurden Veränderungen in der Transkription und/oder posttranslationalen Modifikation von Korepressoren bzw. Koaktivatoren des ÖRs postuliert [Ali & Coombes, 2002]. Auch der ÖR selbst kann z.B. durch gesteigerte Aktivität des EGF Rezeptor-Signalweges östrogenunabhängig phosphoryliert und somit aktiviert werden [Kurokawa & Arteaga, 2003].

Mutationen des ÖRs treten hingegen relativ selten auf [Ali & Coombes, 2002]. Aufgrund der hohen Anzahl von Patienten, die nicht auf eine Tamoxifentherapie ansprechen und der möglichen Nebenwirkungen wie Thrombosen oder Tumoren des Endometriums, besteht der Bedarf an neuen Markern, die in der Lage sind frühzeitig das Ansprechen auf eine anti-hormonelle Therapie vorherzusagen.

1.3 Neue Ansätze in der Tumortherapie

In der Entwicklung neuer Tumortherapeutika geht der Trend weg von relativ unspezifischen zytotoxischen Medikamenten hin zu einer neuen Generation von molekularen therapeutischen Mitteln, die gezielt Schlüsselmoleküle der Tumorprogression angreifen. Dadurch soll die Erfüllung einer oder mehrerer der erwähnten sechs Charakteristika von Krebszellen verhindert werden [Workman, 2000]. Es wird zunehmend deutlich, dass diese selektiven Inhibitoren sowohl in präklinischen Modellen als auch in Tumorpatienten eine biologische und therapeutische Wirkung zeigen. Eines der wohl erfolgreichsten Beispiele ist der monoklonale Antikörper Herceptin™ (Trastuzumab™), der in erbB2-positiven Mammakarzinomen eingesetzt wird und diesen für die Tumorprogression entscheidenden Wachstumsfaktorrezeptor hemmt [Fischer *et al.*, 2003]. Auch Glivec™ (Gleevec™, STI571) wurde spezifisch zur Inhibition der Tyrosinkinase bcr-abl entwickelt und wird erfolgreich für Philadelphia-chromosom-positive chronische myelogene Leukämie verabreicht [Fischer *et al.*, 2003]. Ein weiteres Beispiel ist Iressa™ (ZD1839), ein Inhibitor der Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), welcher im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom Anwendung findet [Garrett & Workman, 1999; Herbst & Kies, 2002]. Alle aufgeführten Medikamente richten sich gegen Gene, die im Tumorgewebe überexprimiert sind.

Um neue potentielle Onkogene zu finden, steht derzeit die genomweite mRNA Expressionsanalyse mittels Genchips zur Verfügung [Butte, 2002]. Auch wenn die Proteinmengen durch posttranskriptionale Regulationsmechanismen von den mRNA Expressionshöhen abweichen können [Gygi *et al.*, 1999], ist aufgrund unzureichender proteinchemischer Methoden die Analyse des Transkriptoms die derzeit beste Strategie potentiell tumorrelevante Gene zu identifizieren [Clarke *et al.*, 2001a; Sager, 1997]. Für die Entwicklung neuer Therapien werden Moleküle bevorzugt, die als Onkogene fungieren, da für diese ein Inhibitionsansatz entwickelt werden kann. Tumorsuppressoren könnten theoretisch auch für einen Therapieansatz benutzt werden, indem die Aktivität dieser Gene mittels Gentherapie wiederhergestellt werden würde [Verma & Somia, 1997]. Allerdings konnte diese Methode bisher aufgrund fehlender Spezifität, niedriger Effizienz der Transduktion bzw. Genexpression und der unerwünschten Immunantwort der Patienten (noch) nicht erfolgreich in der Tumorbiologie angewendet werden [McNeish *et al.*, 2004].

1.4 Der putative Zinktransporter LIV-1

1.4.1 Assoziation mit dem Mammakarzinom

LIV-1 ist ein Beispiel für ein Gen, welches auf mRNA Ebene im Mammakarzinom überexprimiert wird [Manning *et al.*, 1995]. Die cDNA wurde ursprünglich durch differentielle Hybridisierung von Brusttumorzellen, die mit und ohne Östrogen behandelt wurden, isoliert [Manning *et al.*, 1988]. Die in dieser Studie verwendete östrogenabhängige Zelllinie ZR-75-1 exprimiert unter Hormoneinfluss 4-fach höhere Mengen an *LIV-1* mRNA verglichen mit Zellen, die ohne Östrogen kultiviert werden. Auch in MCF-7 Zellen, einer weiteren östrogenabhängigen Brustkrebszelllinie, wird *LIV-1* durch Östrogen induziert [El-Tanani & Green, 1997]. Außerdem wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass die *LIV-1* Transkription durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren erhöht werden kann. Diese Expressionserhöhung ist zumeist abhängig von dem Vorhandensein eines funktionellen ÖRs [el-Tanani & Green, 1996a; el-Tanani & Green, 1996b; El-Tanani & Green, 1997]. Die beiden Hormone 5-Dihydroxytestosteron und Dexamethason hingegen können *LIV-1* unabhängig vom ÖR regulieren [el-Tanani & Green, 1995] (Abb. 2).

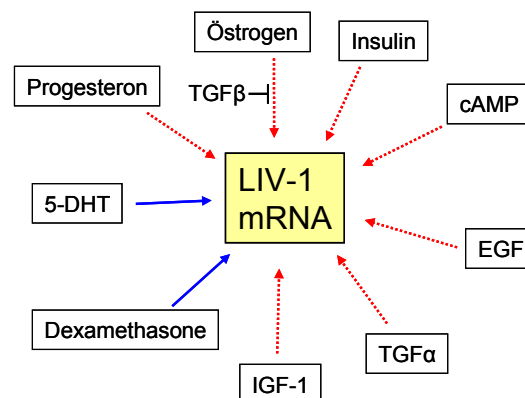


Abb. 2: Regulation der *LIV-1* mRNA durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Hormone. Unterbrochene Pfeile symbolisieren eine ÖR abhängige Regulation. Durchgehende Pfeile stehen für eine ÖR unabhängige Regulation. TGF- β inhibiert die Östrogeninduktion von *LIV-1*. TGF: „tumor growth factor“, EGF: „epidermal growth factor“, IGF-1: „insulin like growth factor-1“, 5-DHT: 5-Dihydroxytestosteron

Auch *in vivo* korreliert die *LIV-1* mRNA Expression mit der Anwesenheit des ÖRs, d.h. 49% der ÖR positiven Tumore sind *LIV-1* positiv, hingegen zeigen nur 8% der ÖR negativen Tumore eine *LIV-1* Expression [Manning *et al.*, 1995; McClelland *et al.*, 1998]. Dementsprechend wurde ein Zusammenhang zwischen der *LIV-1* Expression und dem Ansprechen auf eine anti-hormonale Therapie in verschiedenen Arbeiten untersucht. Es konnte eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von *LIV-1* Transkripten und dem Ansprechen auf eine endokrine Therapie gezeigt werden [McClelland *et al.*, 1998]. Allerdings war die prognostische Relevanz verglichen mit der des ÖR-Status relativ gering. Es wurde außerdem gezeigt, dass eine kurzzeitige Behandlung mit Antiöstrogenen vor einer Operation keinen Effekt auf die detektierte *LIV-1* Menge in den

entnommenen Tumoren hat [McClelland *et al.*, 1996]. Weiterhin ist aber unbekannt, wie sich eine Langzeittherapie von Brustkrebspatienten mit Antiöstrogenen auf die *LIV-1* Expression auswirkt.

In einer Arbeit von Manning und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass die *LIV-1* mRNA Expression mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen korreliert, wobei diese Korrelation in ÖR positiven bzw. kleinen Tumoren am stärksten war [Manning *et al.*, 1994]. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine mögliche funktionelle Beteiligung von LIV-1 in der Metastasierung des Mammakarzinoms postuliert.

1.4.2 Struktur- und Funktionsanalysen

Die 758 Aminosäure lange Sequenz von LIV-1 beinhaltet acht vorhergesagte Transmembrandomänen, von denen zwei Transmembrandomänen nur mit geringer Wahrscheinlichkeiten auftreten (TMHMM 2.0 [Krogh *et al.*, 2001]). Außerdem werden insgesamt sechs N-Glykosilierungsstellen postuliert (NetNGlyc 1.0 Server [Gupta *et al.*, 2002]). Aufgrund der gezeigten Lokalisation von LIV-1 in der Plasmamembran wurde ein Proteinmodell vorgeschlagen, in dem der N- und C-Terminus des Proteins in den extrazellulären Raum zeigt [Taylor & Nicholson, 2003].

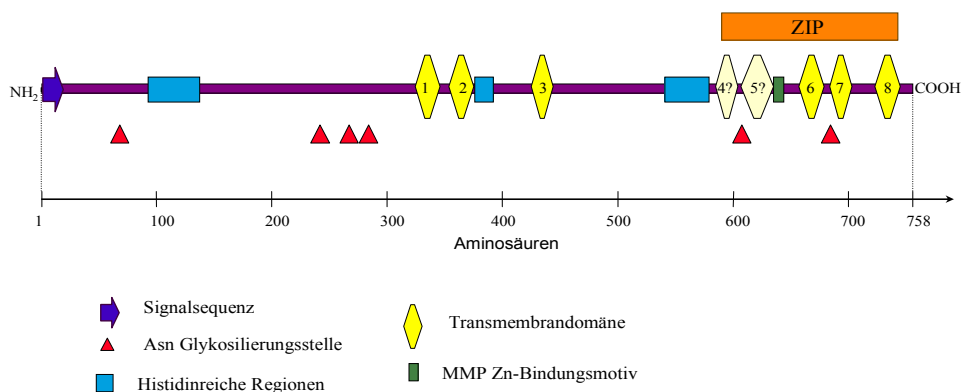


Abb. 3: Schematische Proteinstruktur von LIV-1. Der blaue Pfeil symbolisiert die Signalsequenz des LIV-1 Proteins. Dreiecke markieren potentielle N-Glykosilierungsstellen. Gelbe Vierecke stehen für die 8 putativen Transmembrandomänen, wobei das Vorhandensein der Domänen 4 und 5 mit einer geringen Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wird. Die blauen Rechtecke markieren histidinreiche Regionen innerhalb der LIV-1 Sequenz. Das grüne Rechteck nach Transmembrandomäne 5 symbolisiert die homologe Region zu Zinkbindungsstellen in Matrix-Metalloproteasen. Außerdem ist im C-terminalen Bereich ein für Zinktransporter typisches ZIP Motiv vorhanden.

Charakteristisch für die Proteinsequenz von LIV-1 ist der hohe Prozentsatz an Histidinen, die zumeist gehäuft auftreten und somit histidinreiche Abschnitte bilden (36 Histidine in 3 histidinreichen Bereichen, siehe Abb. 3 bzw. [Taylor, 2000]). Im C-terminalen Bereich des Proteins befindet sich ein ZIP- Motiv (ZRT („zinc regulated transporter“) und IRT-1 („iron regulated transporter-1“) ähnliches Protein). Aufgrund dieser Sequenzcharakteristika von LIV-1 wurde das Protein einer neuen Unterfamilie der ZIP Transporter zugeordnet, welche LZT genannt wurde (LIV-1 Unterfamilie der ZIP Zinktransporter) [Taylor, 2000]. In diese Unterfamilie wurden bisher 9

humane Sequenzen eingeordnet, von denen LIV-1 am besten charakterisiert ist [Taylor & Nicholson, 2003]. Für einige nicht LZT-Mitglieder der ZIP-Familie wurde gezeigt, dass sie für die Aufnahme von Zink aus dem extrazellulären Bereich sowie für die Mobilisierung von gespeichertem Zink aus intrazellulären Kompartimenten verantwortlich sind [Guerinot, 2000]. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten von LIV-1 zu bekannten Zinktransportern wurde postuliert, dass LIV-1 für den Transport von Zinkionen in die Zelle verantwortlich ist [Taylor *et al.*, 2003]. Entsprechend wurde gezeigt, dass eine Überexpression von LIV-1 zu einem erhöhten intrazellulärem Zinkspiegel führt [Taylor *et al.*, 2003].

Das Spurenelement Zink hat zahlreiche physiologische Funktionen. Es wird zur strukturellen Stabilisierung vieler Proteine benötigt, die z.B. an der Transkription sowie dem Proteintransport beteiligt sind. Außerdem sind mehr als 300 Metalloenzyme bekannt, die Zink für ihre enzymatische Aktivität benötigen (für einen Übersichtsartikel siehe [Vallee & Auld, 1990]). Beispiele für solche Proteine sind die alkalische Phosphatase, verschiedene Dehydrogenasen sowie die Superoxiddismutase. Dadurch spielt Zink eine wichtige Rolle in so unterschiedlichen Prozessen wie der Transkription, dem Zellwachstum, der Apoptose sowie der Differenzierung von Zellen [Cousins, 1998; Fuchs *et al.*, 2003]. Eine Störung des normalen Ablaufs dieser Prozesse könnte zur Tumorentstehung führen bzw. die Tumorentwicklung fördern (siehe Abschnitt 1.1). Die physiologische Funktion von LIV-1 und die Bedeutung des Proteins im Mammakarzinom sind aber bisher noch ungeklärt.

1.5 Die Matrix-Metalloprotease Stromelysin-3 (SL-3)

Auch Stromelysin-3 (*SL-3*) ist ein Beispiel für ein im Mammakarzinom überexprimiertes Gen [Basset *et al.*, 1990]. Es wurde in die Familie der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) eingeordnet, die derzeit 24 humane Mitglieder umfasst [Overall & Lopez-Otin, 2002]. Die MMPs werden anhand ihrer Struktur bzw. Substratspezifität in die Gruppe der Kollagenasen, Stromelysine, Matrilysine, Gelatinasen, membranverankerten MMPs und andere MMPs eingeteilt (Abb. 4). In einigen Arbeiten wird die Gruppe der Konvertase-aktivierten MMPs separat unterschieden [Overall & Lopez-Otin, 2002]. MMPs spalten Komponenten der extrazellulären Matrix, wobei jede dieser Proteasen normalerweise mehrere Komponenten erkennt und jede Komponente von mehreren MMPs gespalten werden kann [Stamenkovic, 2000]. Zusammen ist die Familie der MMPs in der Lage alle Bestandteile der extrazellulären Matrix abzubauen [Stamenkovic, 2000]. Für die Tumorgenese spielt neben der Beseitigung physikalischer Barrieren auch die Freisetzung immobilisierter Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β („tumor growth factor- β “) oder VEGF („vascular endothelial growth factor“) durch MMPs eine entscheidende Rolle [Bergers *et al.*, 2000; Yu & Stamenkovic, 2000]. Außerdem können kryptische Proteinbereiche für die Oberflächenproteine von Tumorzellen zugänglich gemacht werden. Zum Beispiel wird bei der

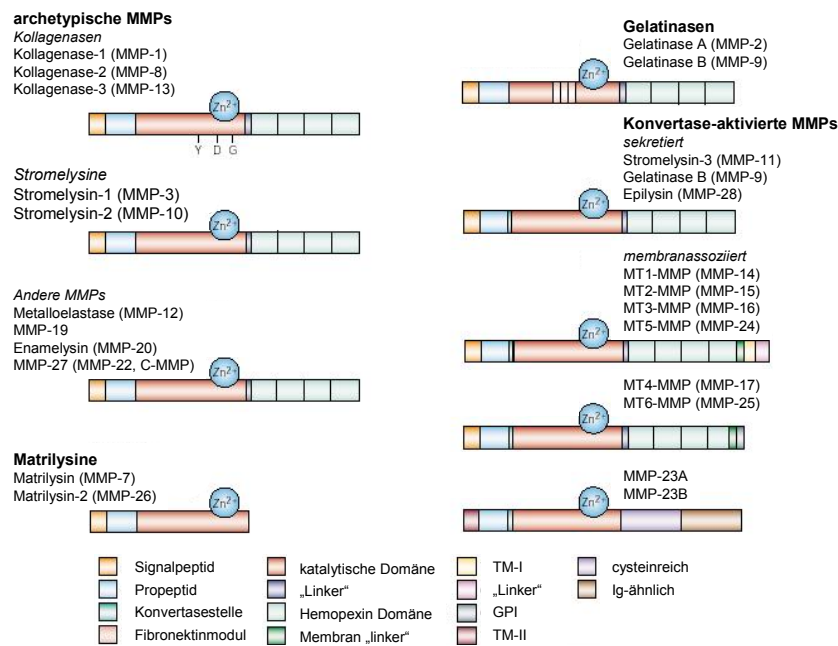


Abb. 4: Schematische Darstellung der humanen MMP-Familie. Die 24 Mitglieder der humanen MMP-Familie werden anhand Ihrer Proteinstruktur in 5 Klassen unterteilt (archetypische, Matrilysine, Gelatinasen, Konvertase-aktivierte MMPs sowie andere MMPs). TM-I: Transmembrandomäne Typ I, TM-II: Transmembrandomäne Typ II, GPI: Glycosylphosphatidylinositol, Ig: Immunglobulin Abbildung in Anlehnung an [Overall & Lopez-Otin, 2002]

Spaltung von Kollagen IV die Migration von Tumorzellen durch solch einen Mechanismus gefördert [Xu *et al.*, 2001]. Aufgrund dieser Eigenschaften sind MMPs an allen Hauptschritten der Tumorgenese (Proliferation, Schutz vor Apoptose, Invasion, Angiogenese, Metastasierung) beteiligt.

Die Etablierung des kausalen Zusammenhangs zwischen der bekannten MMP Überexpression in Tumoren und der Tumorprogression führte zur Entwicklung von MMP Inhibitoren als potentielle neue Krebstherapeutika [Coussens *et al.*, 2002]. Allerdings zeigten diese Inhibitoren in klinischen Studien keine oder sogar gegenteilige Effekte [Sternlich & Bergers, 2000]. Dies wurde u.a. auf die Testung der Substanzen in späten anstelle von frühen Krankheitsstadien zurückgeführt. Außerdem stellte sich in den letzten Jahren heraus, dass MMPs die Tumorgenese nicht nur fördern, sondern auch inhibieren können. So kann z.B. die Spaltung von Plasminogen durch MMP-7 oder MMP-9 zur Freisetzung von Angiostatin führen, welches die Angiogenese hemmt [Pozzi *et al.*, 2000]. Aus diesen Gründen geht der Trend zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren gegen einzelne, tumorrelevante MMPs im Gegensatz zu den Breitspektrum MMP-Inhibitoren, die in diesen ersten Studien eingesetzt wurden [Overall & Lopez-Otin, 2002].

1.5.1 Assoziation mit dem Mammakarzinom

SL-3 (MMP-11) wurde ursprünglich als Gen beschrieben, welches in 90% der invasiven Brustkarzinome überexprimiert ist [Basset *et al.*, 1990]. *SL-3* wird besonders stark von Fibroblasten

an der Invasionsfront von Brusttumoren exprimiert. In einer später erschienen Arbeit [Ahmad *et al.*, 1998] wurden zusätzlich zu Fibroblasten auch Karzinomzellen, die eine epitheliale-mesenchymale Transition durchlaufen haben, als *SL-3* exprimierende Zellen identifiziert. In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass *SL-3* nicht nur im Mammakarzinom, sondern in fast allen anderen humanen Karzinomen, wie z.B. der Lunge, der Haut oder des Pankreas überexprimiert ist [Basset *et al.*, 1997]. Auch in diesen Tumorentitäten wurde die *SL-3* Expression hauptsächlich in invasiven Karzinomen detektiert. Wenn *in situ* Karzinome *SL-3* exprimieren, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass diese sich zu invasiven Tumoren entwickeln [Basset *et al.*, 1994]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass eine hohe *SL-3* Expression in Brusttumoren mit einem kürzeren krankheitsfreien Intervall sowie einem kürzerem Gesamtüberleben korreliert [Ahmad *et al.*, 1998].

1.5.2 Expression in Normalgeweben

SL-3 wurde in Uterus- und Plazentagewebe [Basset *et al.*, 1990], in Brustgewebe während der Involution der Brustdrüsen nach dem Stillen [Lefebvre *et al.*, 1992], im Endometrium [Rodgers *et al.*, 1994] und während der Wundheilung [Okada *et al.*, 1997; Wolf *et al.*, 1992] detektiert. Auch während der Implantation von Mausembryos und im Laufe der Neurogenese, Osteogenese und embryonalen Morphogenese von Gliedmaßen, Schnauze und Schwanz von Mäusen wird *SL-3* exprimiert [Lefebvre *et al.*, 1995]. Trotz dieser anscheinend vielseitigen Bedeutung von *SL-3* für Prozesse im erwachsenen Organismus und während der embryonalen Entwicklung wurden bei *SL-3* „knock out“ Mäusen mit verschiedenen genetischen Hintergründen keinerlei Unterschiede in Verhalten und Erscheinung festgestellt [Masson *et al.*, 1998]. Die *SL-3* negativen Mäuse entwickeln sich normal, sind fertil und zeigen eine normale Wundheilung. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde spekuliert, dass die *SL-3* Aktivität in physiologischen Prozessen durch andere Proteine ersetzt werden kann [Masson *et al.*, 1998]. Diese Kompensation scheint allerdings während der Tumorgenese nicht aufzutreten, da in *in vivo* Tumormodellen ein *SL-3* spezifischer Effekt beobachtet werden kann (siehe Abschnitt 1.5.3).

1.5.3 Struktur- und Funktionsanalysen

SL-3 wurde aufgrund der Sequenzhomologien zu Stromelysin-1 (MMP-3) als Stromelysin in die Familie der MMPs eingeordnet [Basset *et al.*, 1990]. Allerdings ist diese Homologie mit 40% Übereinstimmung relativ niedrig. Stromelysin-1 und Stromelysin-2 (MMP-10) zum Beispiel zeigen eine Homologie von 79% [Basset *et al.*, 1990]. Trotzdem weist die Stromelysin-3 Proteinsequenz typische Merkmale von Matrix-Metalloproteasen auf (Abb. 4). *SL-3* besitzt eine Hemopexindomäne im C-terminalen Bereich des Proteins, welche in anderen MMPs die Spezifität der Proteasen und deren Inhibitorbindung beeinflusst [Murphy & Knäuper, 1997]. Im mittleren Teil des Proteins liegt die katalytische Domäne, die sich durch eine Zinkbindungsstelle auszeichnet. Außerdem befindet sich im N-Terminus ein Signalpeptid, welches das zu translatierende Protein in das

endoplasmatische Retikulum dirigiert. C-terminal schließt sich an das Signalpeptid das Propeptid an, welches während der Reifung des Proteins im endoplasmatischen Retikulum durch die Endoprotease Furin abgespalten wird [Pei & Weiss, 1995].

Trotz dieser MMP-ähnlichen Primärstruktur wurde für SL-3 bisher keine Komponente der extrazellulären Matrix identifiziert, die von dieser Protease gespalten wird [Pei *et al.*, 1994]. Allerdings wurden die Proteine α 1-Proteaseinhibitor, α 2-Makroglobulin sowie IGFBP-1 als *in vitro* Substrate identifiziert [Manes *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1994]. Das α 2-Makroglobulin ist der Hauptinhibitor von Matrix-Metalloproteasen in Gewebeflüssigkeiten [Baker *et al.*, 2002]. Die Inhibierung wird durch einen Mechanismus vermittelt, in dessen ersten Schritt die Protease eine „bait“ Region des α 2-Makroglobulin erkennt und spaltet. Eine dadurch induzierte Konformationsänderung des α 2-Makroglobulins verankert die Protease, welche schließlich kovalent an α 2-Makroglobulin gebunden und damit inaktiviert wird [Baker *et al.*, 2002]. Die Funktion des zweiten bekannten Stromelysin-3 Substrates, dem α 1-Proteaseinhibitor wurde ursprünglich ausschließlich in der Inaktivierung der Elastase von Leukozyten vermutet [Weiss, 1989]. Mittlerweile ist bekannt, dass dieser Serinproteaseinhibitor auch Einfluss auf die Tumorgenese von Zellen haben kann. Zum Beispiel kann er die Proliferation von Fibroblasten beeinflussen und Wachstum von MCF-7 Zellen in Softagar vermindern [Finlay *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1989]. Bei der Spaltung des dritten SL-3 Substrates, dem IGFBP-1 wird der Wachstumsfaktor IGF-1 freigesetzt, der u. a. die Proliferation von Tumorzellen fördert und Apoptose unterdrückt [Kawamura *et al.*, 1994; Surmacz, 2000]. Sowohl α 1-Proteaseinhibitor als auch α 2-Makroglobulin werden von fast allen anderen MMPs gespalten [Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Pei *et al.*, 1994] und http://www.clip.ubc.ca/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtml). Auch IGFBP-1 wird von einigen anderen MMPs als Substrat erkannt, so zum Beispiel von Stromelysin-1 (MMP-3), Matrilysin-2 (MMP-26) und Gelatinase A (MMP-2) [Coppock *et al.*, 2004; Manes *et al.*, 1997]. Ein spezifischer Effekt von SL-3 ist demnach aus der Spaltung dieser Substrate nicht abzuleiten. In einem „phage display“ Ansatz wurden allerdings weitere potentielle SL-3 spezifische Substrate gefunden, zu denen z.B. der ÖR, pro-TNF α und einige Integrine gehören [Pan *et al.*, 2003]. Somit wäre es möglich, dass SL-3 über die Spaltung dieser Moleküle die Tumorgenese beeinflusst.

Obwohl SL-3 seit über 10 Jahren als brusttumorassoziiertes Gen bekannt ist, wurde erst vor einigen Monaten ein SL-3 spezifischer Effekt in *in vitro* Experimenten publiziert [Fromigue *et al.*, 2003]. In der Arbeit wird gezeigt, dass eine SL-3 Überexpression in MCF-7 Zellen zum Schutz vor Apoptose durch Wachstumsfaktorentzug führt. Die Bedeutung von SL-3 für das Mammakarzinom und der funktionelle Mechanismus dieser Protease sind allerdings weiter unklar.

Es wurden verschiedene *in vivo* Studien durchgeführt, die den Einfluss von SL-3 auf die Tumorgenese untersuchen. Zum Beispiel wurde in Xenograft Tumormodellen gezeigt, dass eine SL-3 Überexpression in der Brustkrebszelllinie MCF-7 zu einem größeren Tumolvolumen und einem erhöhten Anwachsen der Tumore bei subkutaner Injektion der Zellen führt [Noel *et al.*, 2000;

Noel *et al.*, 1996]. Für diesen Effekt waren sowohl die proteolytische Aktivität von SL-3 als auch die Anwesenheit von komplettem Matrigel notwendig [Noel *et al.*, 2000]. Allerdings wurde in diesen *in vivo* Studien keine veränderte Apoptose, Proliferation oder Invasivität der Zellen beobachtet.

In Xenograft Tumormodellen in *SL-3* „knock out“ Mäusen hingegen zeigten Tumore einen erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu Tumoren in Wildtypmäusen [Boulay *et al.*, 2001]. Außerdem entwickelten in dem Modell *SL-3* negative Mäuse weniger und kleinere Tumore. Auch *SL-3* „knock out“ Mäuse, in denen durch die Gabe von 7,12-Dimethylbenzanthrazen Tumorbildung induziert wurde, bildeten weniger und kleinere Tumore im Vergleich zu den Wildtyptieren [Masson *et al.*, 1998]. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Induktion von Tumoren mittels des *RAS*-Onkogens in *SL-3* „knock out“ Mäusen [Andarawewa *et al.*, 2003]. Allerdings wurde in dieser kürzlich erschienen Arbeit auch gezeigt, dass die fehlende SL-3 Expression zu einer höheren Metastasenanzahl und früheren Bildung von Metastasen führt. Wenn diese Ergebnisse nicht auf Grund des benutzten Modellsystems hervorgerufen wurden, könnten sie eine duale Funktion von SL-3 während der Tumorgenese reflektieren. SL-3 würde demnach die Bildung von Primärtumoren fördern, aber gleichzeitig die Metastasierung von Tumorzellen hemmen.

1.5.4 Regulation der Expression und Aktivität

Die Transkription von *SL-3* kann durch unterschiedliche Faktoren induziert werden. So führt TGF- β („transforming growth factor- β “) in Osteoblasten und Fibroblasten zu einer erhöhten *SL-3* Transkriptmenge [Delany & Canalis, 1998; Delany & Canalis, 2001]. Außerdem stimulieren die Wachstumsfaktoren PDGF („platelet derived growth factor“) und bFGF („basic fibroblast growth factor“) die *SL-3* Expression in Fibroblasten [Anderson *et al.*, 1995; Basset *et al.*, 1990]. Der im Brustkarzinom bedeutsame Wachstumsfaktor EGF („epidermal growth factor“) führt ebenfalls zu einer erhöhten *SL-3* Expression [Ahmad *et al.*, 1997; Basset *et al.*, 1990].

Die biochemische Aktivität von SL-3 kann durch Breitspektrum MMP-Inhibitoren wie Batismatat oder auch durch das natürlich vorkommende Protein TIMP-2 („tissue inhibitor of MMPs“) gehemmt werden [Manes *et al.*, 1997]. Da beide Inhibitoren keine Spezifität für SL-3 gegenüber anderen Matrix-Metalloproteasen zeigen, wurden von Kannan und Mitarbeitern 140.000 Substanzen auf SL-3 hemmende Aktivität analysiert [Kannan *et al.*, 1999]. Es wurde ein inhibitorisches Molekül aus der Klasse der Cephalosporine identifiziert, welches allerdings auch inhibitorische Aktivität gegenüber anderen MMPs aufweist. Hingegen wurde von Matziari und Mitarbeitern ein spezifischer SL-3 Inhibitor auf Basis von Phosphinpeptiden beschrieben [Matziari *et al.*, 2004].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *SL-3* zwar als tumorassoziertes Gen seit über 10 Jahren bekannt ist, aber trotzdem die Funktion dieser Protease in der Tumorgenese weitestgehend unverstanden ist.

1.6 Problem- und Zielstellung der Arbeit

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die rationale Medikamentenentwicklung, welche sich spezifisch gegen Proteine richtet, die funktionell in der Tumorprogression beteiligt sind, eine viel versprechende Strategie zur Entwicklung neuer Tumorthapien ist [Workman, 2000]. Dabei ist die Inhibierung von Onkogenen derzeit besser realisierbar als eine Aktivierung von Tumorsuppressoren [McNeish *et al.*, 2004].

Da das Mammakarzinom die häufigste tumorbedingte Todesursache für Frauen in Industrieländern darstellt, werden dringend innovative Therapieansätze benötigt [Bast *et al.*, 2000]. Ein zweiter wichtiger Punkt ist die Identifizierung von neuen prognostischen Markern um den Krankheitsverlauf frühzeitig vorhersagen und dementsprechend wirkungsvolle Therapieentscheidungen treffen zu können [Schnitt, 2001]. Um neue potentielle Onkogene des Mammakarzinoms identifizieren zu können, wurden in der metaGen Pharmaceuticals GmbH mittels Affymetrix™ Genchip Hybridisierungen von Tumor- und Normalgeweben der Brust Gene gesucht, deren Transkripte im Mammakarzinom überexprimiert vorliegen. Es wurden jene Gene für weitere Validierungsschritte ausgewählt, deren Expression in $\geq 25\%$ der Patienten im Tumor mindestens doppelt so hoch wie im Normalgewebe und deren Genprodukt putativ sekretiert oder membranständig war. Diese Bedingungen sollten eine signifikante Überexpression sowie die Möglichkeit der extrazellulären Lokalisation gewährleisten. Letzteres ist eine Voraussetzung zur Entwicklung funktioneller Antikörper für eine potentielle *in vivo* Inhibierung. Die Gene LIV-1 und Stromelysin-3 erfüllten diese Kriterien. Sie wurden zur Analyse innerhalb der vorliegenden Arbeit ausgewählt, da ihre Funktion bzw. Tumorrelevanz noch nicht in *in vitro* Modellen gezeigt worden war. Zur weiteren Charakterisierung der Gene sollten folgende Aufgaben realisiert werden:

1. Überprüfung der mRNA Expressionsdaten der Genchip Hybridisierungen mittels einer unabhängigen Methode
2. Herstellung und Validierung eines LIV-1 spezifischen Antikörpers
3. Untersuchung des Proteinexpressionsmusters im Mammakarzinom
4. Aufklärung der subzellulären Lokalisation
5. Analyse der Expression in verschiedenen humanen Normalgeweben, um mögliche Nebenwirkungen einer *in vivo* Inhibierung abschätzen zu können
6. Funktionelle *in vitro* und *in vivo* Analysen mit überexprimierenden Zellklonen, wenn 1.) -5.) ein mögliches therapeutisches Fenster vermuten lassen
7. Statistische Analyse der prognostischen Relevanz anhand der mRNA- und Proteinexpressionsdaten

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten im Hinblick auf die mögliche Funktion der Proteine im Mammakarzinom und deren potentielle klinische Anwendung diskutiert werden.

2 Material, Methoden

2.1 Oligonukleotide

Alle Primer wurden bei Invitrogen, Karlsruhe synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt.

Tab. 1: *Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung, Sequenzierung und RT-PCR.*

| Name | Sequenz | "annealing" Temp. in der PCR |
|-------------|---|------------------------------------|
| MMP11_down | 5'-GAG GGC ATC CAA GCC ATG GTC AGA GG-3' | 67°C |
| MMP11_up | 5'-CCA GCA GCC CCG GGG CGG ATG GCT-3' | 67°C |
| LIV1-klonf | 5'-CCG TGT GGA ACC AAA CCT-3' | 53°C |
| LIV1-klonr | 5'-CGC TGC ATA GTA CAG CAT ACA A-3' | 53°C |
| LIV-1r | 5'-ACC ATG GCG AGG AAG TTA TCT-3' | 50°C |
| LIV-1f-long | 5'-GCC GCC AGG ATG GCG AGG AAG TTA TCT G-3' | 50°C |
| BGH | 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG CTG-3' | 56°C |
| T7-dT24 | 5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG T24-3' | -- |

2.2 Biologisches Material

Die humanen Brustzelllinien MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1, MDA-MB-453, MDA-MB-468, T47-D und MCF-10A wurden freundlicher Weise von der Schering AG, Berlin zur Verfügung gestellt.

Primäre humane Brusttumorfibroblasten (PF37) wurden freundlicher Weise von Dr. Bernhard Tetu (Universitätskrankenhaus Quebec, Kanada) zur Verfügung gestellt

E. coli: TOP10, chemisch kompetent (Invitrogen, Karlsruhe, genetischer Hintergrund: DH10B)

Brusttumorgewebe wurde freundlicher Weise von Dr. Arndt Hartmann (Pathologie der Universität Regensburg) bereitgestellt.

2.3 Medien und Zusätze

Zellkulturmedien

Alle Medien wurden von Gibco, Karlsruhe bezogen und ohne zusätzliche Antibiotika verwendet.

- für MCF-10A: DMEM/F12, 5% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Gibco, Karlsruhe), 20 ng/ml EGF, 100 ng/ml Cholera-toxin, 0.002 U/ml Insulin, 500 ng/ml Hydrocortison
- für MCF-7, T47-D und ZR-75-1: RPMI 1640 ohne Phenolrot, 10% FBS, 2 mM Glutamin, 0.002 U/ml Insulin, 0.1 nM E₂
- für MDA-MB-231 und MDA-MB-453: DMEM/F12, 10% FBS, 2 mM Glutamin
- für MDA-MB-468: RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM Glutamin

Wachstumsfaktoren, Hormone, FBS u. ä.

Alle Substanzen wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gelöst und gelagert.

- EGF: Sigma-Aldrich, München, Lagerung: 50 µg/ml
- HGF, Sigma-Aldrich, München, Lagerung: 1 mg/ml
- Cholera-toxin: Sigma-Aldrich, München, Lagerung: 100 µg/ml
- Hydrocortison: Sigma-Aldrich, München, Lagerung: 5 mg/ml
- Insulin, Sigma-Aldrich, München, Lagerung: 50 U/ml
- IGF-1: Sigma-Aldrich, München, Lagerung 2 mg/ml
- E₂ (Östrogen) wurde freundlicher Weise von der Schering AG, Berlin zur Verfügung gestellt, Lagerung: 10⁻⁶ M
- FBS: Charge 3135881S, Gibco, Karlsruhe, wurde bei -20°C aufbewahrt und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut
- Glutamin: Invitrogen, Karlsruhe
- G418: Sigma-Aldrich, München, Lagerung: 1 mg/ml

Inhibitoren

- I-OMe AG 538: Merck, Darmstadt
- humanes TIMP-2: Chemicon, CA

weitere allgemeine Lösungen für die Zellkultur

- PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺: Gibco, Karlsruhe
- Trypsin: 0.05% in 0.02% BSA/PBS, Biochrom, Berlin

Medium zur Bakterienanzucht („LB-Medium“)

- 1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl; für Agarplatten Zugabe von 1.5% Agar
- zur Selektion auf Ampicillinresistenz wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben

2.4 Enzyme

Taq Polymerase: Quiagen, Hilden

„proof reading“ Taq Polymerase: Quiagen, Hilden

Restriktionsenzyme: Roche, Mannheim

T7 und SP6 Polymerase: Roche, Mannheim

RNase und RNase Inhibitor: Roche, Mannheim

RNase A: Sigma-Aldrich, München

Superscript II reverse Transkriptase: Roche, Mannheim

2.5 Antikörper

Alle Antikörper wurden entsprechend den Angaben des Herstellers aufbewahrt.

Tab. 2: *Verwendete Antikörper und deren Verdünnung in verschiedenen Anwendungen.*

| Antikörper | Firma | Verdünnung | | |
|--|---------------------------------------|-----------------|--------------|--------------|
| | | Western Blot | IHC | ICC |
| Ziege α -(humanes Calnexin) | Santa Cruz, Heidelberg | -- | -- | 1:100 |
| Maus α -(humanes E-Cadherin) | Transduction Laboratories, Heidelberg | -- | -- | 1:200 |
| Maus α -(humanes Golgin-97) | Molecular Probes, Leiden | -- | -- | 1:10 |
| Maus α -(humanes IGFBP-1) | Sigma-Aldrich, München | -- | -- | -- |
| rabbit α -(humanes Panzytokeratin) | Novocastra, Newcastle | --1:500 | 1:100 | 1:100 |
| Maus α -(humanes Stromelysin-3) | Neomarkers, CA | 1:300 | 1:50 | 1:50 |
| Ziege α -(humanes Vimentin) | Santa Cruz, Heidelberg | -- | 1:30 | 1:30 |
| rabbit α -(humanes LIV-1) | Serum von Eurogentec, Seraing | 0.2 ng/ μ l | 1ng/ μ l | 1ng/ μ l |
| Esel α -(Maus IgG)Rhodamin Red | Dianova, Hamburg | -- | 1:100 | 1:100 |
| Esel α -(Ziege IgG)Alexa594 | Molecular Probes, Leiden | -- | -- | 1:500 |
| Esel α -(Ziege IgG)Cy5 | Dianova, Hamburg | -- | 1:400 | 1:400 |
| Esel α -(Kaninchen IgG)Alexa488 | Molecular Probes, Leiden | -- | 1:500 | 1:500 |
| Esel α -(Kaninchen IgG)biotinyliert | Dianova, Hamburg | -- | 1:500 | 1:500 |
| Esel α -(Kaninchen IgG)Peroxidase | Amersham, Freiburg | 1:50.000 | -- | -- |
| Esel α -(Kaninchen IgG)Peroxidase | Amersham, Freiburg | 1:30.000 | -- | -- |

2.6 Puffer, Lösungen, Chemikalien

Antifade PDA500: 500 mg 1,4-phenylendiamin (PDA) in 2 ml Tris-Puffer lösen, auf 9 ml mit Tris-Puffer auffüllen, pH 8.0 einstellen, auf 10 ml mit PBS auffüllen, 1:10 mit 100% Glycerol mischen, aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

Hybridisierungspuffer: 25 ml Formamid, 7.5 ml 5M NaCl, 5 ml PE 10x, 0.5 ml 10 mg/ml tRNA (Sigma-Aldrich, München), 0.25 ml 10% (w/v) Heparin (Sigma-Aldrich, München), 0.5 ml 10% (w/v) BSA, 2.5 ml 20% (w/v) SDS, Puffer sterilfiltrieren

Hybridisierungsmix: 50 ml deionisiertes Formamid (4° C), 5 ml 20 x SSC, 25 ml steriles Aqua dest., pH auf 7.0 einstellen, 20 ml 50% Dextransulfat zugeben, mischen, autoklavieren und bei 4°C lagern

20 x SSC-Puffer: 175.32 g NaCl, 88.23 g NaCitrat auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen, pH 7.0 mit HCl einstellen, DEPC behandeln, autoklavieren

10 x NT-Puffer: 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA, mit sterilem Aqua dest. auf 1 ml auffüllen, aliquotieren, bei -20°C aufbewahren

NTE-Puffer: 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.5 mM EDTA

NTMT-Puffer: 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween-20

Puffer A: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% NP40, 2 mM EDTA pH 8.0

Puffer B: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.2% NP40, 2 mM EDTA pH 8.0

Puffer C: 10 mM Tris pH 7.5

Solubilisierungspuffer: 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 4 μ g/ml PMSF/ Proteaseinhibitoren

TBE-Puffer(10x): 108.9 g Tris-Base, 27.5 g Borsäure, 20 ml 0.5M EDTA pH 8.0, mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

TBS-Puffer: 0.15 M NaCl in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4

Tris-Puffer: 24.2 g Tris in 1 l Aqua dest. lösen

Tris-Glycin-Puffer: 24.2 g Tris-Base, 15.0 g Glycin, mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen, pH mit HCl auf 7.0 einstellen, autoklavieren

Puffer, die nicht aufgeführt sind, wurden nach Standardrezeptur angesetzt [Maniatis *et al.*, 1989].

Chemikalien u.ä.

Agarose: Gibco, Karlsruhe

Ampicillin: Sigma, München

dNTPs: Amersham Bioscience, Freiburg

G418: Gibco, Karlsruhe

Größenstandards:

- Proteinmarker: "Full range Rainbow Marker" (Amersham Bioscience, Freiburg)
- RNA-Marker: „0.24-9.5 kb RNA Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe)
- DNA-Marker: „1 kb DNA Extension Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe)

Hämatoxilin: Biocarta, Hamburg

Matrigel: BD Bioscience, CA

Milchpulver: Spinnrad, Norderstedt

RNase / DNase freies Wasser. Gibco, Karlsruhe

Chemikalien, die nicht aufgelistet sind, wurden im Allgemeinen von Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2.7 Geräte, Zellkulturmaterialien

Digitalkamera: „MPEGMOVIE EX digit still camera DSC-S85“ (Carl Zeiss, Oberkochen)

konfokales Mikroskop: „TCS SL“ (Leica, Solms)

alle Plastikware für die Zellkultur wurde von Corning, NY bezogen.

2.8 DNA-basierte Methoden

2.8.1 Klonierung

Standard PCR Bedingungen:

Temperaturprotokoll: 1x (94°C: 60 sek), 40x (94°C: 30 sek, „annealing“ Temperatur (siehe 2.1): 30 sek, 72°C: 180 sek), 1x (70°C: 10 min)

Ansatz: „Template“: 1 ng, Primer: je 200 pMol, dNTPs: je 200 µM, 2.5 mM MgCl₂, 1xPCR-Puffer (Gibco, Karlsruhe), *Taq*-Polymerase: 1 U, Reaktionsvolumen: 25µl.

Mittels genspezifischer Primer und Standard PCR mit „proof reading“ *Taq*-Polymerase wurde der entsprechende kodierende Bereich einschließlich des Start- und Stopkodons amplifiziert. Im Falle von *LIV-1* wurde 1 µl der ersten PCR, die mit den Primern *LIV-1*-klonf und *LIV-1*-klonr durchgeführt wurde, in einer zweiten PCR mit den Primern *LIV-1*f-long und *LIV-1*r eingesetzt. Für *SL-3* wurden die Primer *MMP-11*up und *MMP-11*down verwendet. Anschließend an den letzten Amplifikationsschritt wurden die Proben für 10 min bei 70°C mit *Taq* Polymerase ohne

„proof reading“ Aktivität inkubiert, damit 3'-A-Überhänge synthetisiert werden. Die PCR-Produkte wurden mittels „PCR-Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und entsprechend den Vorschriften des Herstellers in den pcDNA3.1V5HisTOPO Vektor eingebracht. Das Konstrukt wurde durch chemischer Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen eingebracht [Maniatis *et al.*, 1989] und über Nacht bei 37°C auf Agarplatten mit Ampicillin auf das Vorhandensein des Expressionsplasmides selektiert. Mittels eines Zahnstochers wurde am nächsten Tag von 20-30 Kolonien etwas Zellmaterial abgenommen und in einer PCR unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese in einem 1.2%-igen Agarosegel anhand des DNA-Markers auf ihre Größe analysiert [Maniatis *et al.*, 1989]. Das restliche Zellmaterial von 5 Klonen, deren Plasmid DNA die richtige Produktgrößen im Agarosegel zeigte, wurde zum Animpfen von jeweils 200 ml LB-Medium benutzt. Nach einer über Nacht Inkubation bei 37°C wurden die Kulturen einer Maxipräparation mittels des „DNeasy Maxi-Kit“ (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte Plasmid DNA wurde zur Sequenzierung eingesetzt und die erhaltene Sequenz mit öffentlichen „EST-“ und genomischen Daten auf ihre Richtigkeit überprüft (Sequenzen von: <http://genome.ucsc.edu/>, Stand: 2003).

2.8.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der enzymatischen Kettenabbruchmethoden [Sanger *et al.*, 1977] mittels fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide. Es wurde der „DYEnamic ET terminator cycle sequencing premix kit“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach den Angaben des Herstellers verwendet, d.h. es wurden 500 ng Plasmid DNA mit 6 µl ET-mix und 5 pMol Primer in der Sequenzierreaktion eingesetzt (1x 95°C: 60 sek., 25x (95°C: 60 sek., 50°C: 30 sek., 60°C: 240 sek), 1x 18°C: 60 sek.). Die Produkte wurden über Sephadexsäulen (C50, Amersham Bioscience, Freiburg) aufgereinigt und mit 2 µl Formamid Ladepuffer gemischt und auf ein 5.25%-iges Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff [Maniatis *et al.*, 1989] aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente und Detektion mittels Laser wurde automatisiert auf Sequenziermaschinen des Typs ABI 377 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt [Adams *et al.*, 1994]. Die Auswahl der Primer und die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm GAP4 [Bonfield *et al.*, 1995]. Die Sequenzierung wurde gegebenenfalls wiederholt, bis der gesamte zu sequenzierende Bereich mindestens doppelt abgedeckt war. Es wurden entweder vektorspezifische Primer (T7 und BGH) oder genspezifische Primer verwendet (siehe Abschnitt 2.1)

2.8.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Für die Sondenpräparation wurde eine „nick translation“ Reaktion durchgeführt. Dafür wurden 2 µg der Plasmid-DNA, 1 x NT Puffer, dNTPs (jeweils 0.5 mM), 0.01 M β-Mercaptoethanol, 2 nmol Biotin-dUTP (Roche, Mannheim), 240 ng/ml DNase I (Sigma-Aldrich, München), 2 U DNA-Polymerase I (Roche, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 1.5 h bei 15°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestellt und 5 µl wurden in einem 1.2%-igen Agarosegel [Maniatis *et al.*, 1989] auf die entstandene Fragmentgröße überprüft. Wenn die Fragmente größer als 300-600 bp waren, wurde die Reaktion für 15-20 min weitergeführt und erneut 5 µl in einem Agarosegel analysiert. Die Reaktion wurde schließlich durch eine 10-minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt und die Sonden bei -20°C gelagert. 200 ng der so hergestellten Sonde wurde zusammen mit 10 µg Heringssperma DNA (Sigma-Aldrich, München) und 10 µg humaner Cot-DNA (Roche, Mannheim) durch eine Ammoniumacetat/Ethanol fällung [Maniatis *et al.*, 1989] gefällt. Das Pellet wurde in 12 µl Hybridisierungsmix gelöst und danach im Wasserbad (80°C, 5 min) denaturiert. Diese Sondenpräparation wurde für das „annealing“ eingesetzt (siehe unten).

Zur Präparation von Metaphasenchromosomen wurden die Zellen für 5 h mit 10 µg/ml Colcemid (Roche, Mannheim) behandelt. Die Zellen wurden mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) und ohne Verwendung von Trypsin abgelöst, um eine Anreicherung von Zellen in der Metaphase zu erreichen. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 5 ml 0.075 KCl (hypotonischer Puffer) aufgenommen und für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden ca. 500 µl Fixierungslösung (3:1 Methanol:Essigsäure) zugegeben und die Zellen abermals zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit der Fixierungslösung gewaschen und die Zellen in der Fixierungslösung bei 4°C gelagert. Für die Präparation der

Objektträger wurden die Zellen abzentrifugiert, in ca. 400 µl Fixierungslösung aufgenommen und auf Objektträger, die über ein 65°C warmes Wasserbad gehalten wurden, aufgetropft. Die Objektträger wurden mittels Lichtmikroskopie auf das Vorhandensein von Metaphasenchromosomen überprüft und nach der Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe getrocknet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 400 x g für 5 min ausgeführt.

Die Zellen wurden rehydriert und in 2 x SSC äquilibriert bevor sie mit 100 µg/ml RNase A (Roche, Mannheim) in 2 x SSC behandelt wurden (37°C, 45 min). Danach wurden die Zellen in 2 x SSC gewaschen (3 x 5 min), bevor sie mit 10 µg/ml Pepsin (Sigma-Aldrich, München) in 0.01M HCl (pH 2.0, 37°C) inkubiert wurden (5 min, 37°C). Das Beseitigen des Zytoplasmas wurde nach einem Waschen in PBS unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls die Pepsinbehandlung wiederholt. Die Objektträger wurden in PBS (2 x 5 min), PBS/MgCl₂ (50 mM MgCl₂ in PBS, 1 x 5 min) sowie in PBS/MgCl₂/1% Formaldehyd (10 min) inkubiert. Nach einem PBS-Waschschritt (5 min) wurden die Zellen durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und getrocknet. Zur Denaturierung der DNA wurde 70% Formamid in 0.6 x SSC (37°C) zu den Objektträgern gegeben und die Objektträger 1.5 min bei 73°C auf einer Metallplatte inkubiert, gefolgt von einer 3-minütigen Inkubation in eiskaltem 70%-igen Ethanol. Die Objektträger wurden danach in 90% und 100% Ethanol (aufsteigende Ethanolreihe) inkubiert und getrocknet. Für das „annealing“ wurde die präparierte Sonde (siehe oben) zu den Objektträgern gegeben, mit „rubber cement“ (Fixogum) abgedichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Objektträger in FA/SSC Lösung (1 x SSC, 50% Formamid, pH 7.0) 3 x 5 min bei 45°C gewaschen, gefolgt von 3 x 5 min in 0.1 x SSC (60°C). Die Objektträger wurden in 4 x SSC/ 0.1% Tween-20 getaucht, bevor die Blocklösung (3% Bovines Serumalbumin in 4 x SSC / 0.1% Tween-20) zugegeben wurde (37°C, 30 min). Nach kurzem Eintauchen in 4x SSC/ 0.1% Tween-20 wurden die Objektträger mit Avidin-FITC (Jackson Immunoresearch, Hamburg, 1:200 in 4 x SSC/ 0.1% Tween) inkubiert (60 min, 37°C). Die Objektträger wurden 3 x 5 min in 4 x 0.1% Tween-20 gewaschen, mit 10 ng/ml DAPI Lösung in 2 x SSC inkubiert (10 min). Die Objektträger wurden abschließend in sterilem Aqua dest. gewaschen, nach einer aufsteigenden Ethanolreihe getrocknet und mit „Antifade PDA500“ eingedeckelt. Die Objektträger wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

2.9 mRNA- und cDNA basierte Methoden

2.9.1 Isolation von mRNA und cDNA Synthese

Die mRNA Isolation wurde mittels des „PolyATtract 1000“ Kit (Promega Corporation, Mannheim) nach den Empfehlungen des Herstellers ausgeführt. Dafür wurden Zellen einer 70% konfluenten Kultur von einer 25 cm² Kulturfläche in 4 ml GTC-Puffer lysiert und weiter bearbeitet. Die Konzentration der erhaltenen mRNA wurde photometrisch bestimmt (OD_{260nm}). Für die Erststrang cDNA Synthese wurden 500 ng mRNA in 10 µl H₂O und 250 ng T7-dT₂₄-Primer in 1 µl H₂O für 10 min bei 70°C inkubiert, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 4 µl Erststrangpuffer (Gibco, Karlsruhe), 2 µl 0.1M DTT, 1 µl dNTP-Gemisch (20 mM dUTP, dATP, dCTP und dGTP), 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen einzelsträngigen cDNAs wurden bei -20°C gelagert. Es wurde ausschließlich mit RNase/DNase freiem Wasser gearbeitet

2.9.2 Mikrodissektion und Hybridisierung von Affymetrix Genchips

Die Laser-gestützte Mikrodissektion wurde von der Abteilung „Pathologie“ der metaGen Pharmaceuticals GmbH mittels „laser capture microdissection system“ (SL, Jena, Germany) durchgeführt. Die anschließende mRNA Isolation und cDNA-Synthese bzw. –Markierung wurde von der Abteilung „Gynäkologische Tumore der metaGen Pharmaceuticals GmbH nach der Methode von Luo und Mitarbeitern ausgeführt [Luo *et al.*, 1999]. Es wurde eine Biotinmarkierung der cDNAs und der auf der Sequenzauswahl der metaGen Pharmaceuticals GmbH beruhende OligoChip „metaGen1“ (Affymetrix, CA) benutzt und nach den Empfehlungen von Affymetrix hybridisiert bzw. die Signale detektiert. Für die Auswertung wurden nur Hybridisierungssignale mit einem p-Wert <0.01 gegenüber dem

Hintergrundsignal einbezogen. Für die Expressionsanalyse von *LIV-1* wurden die Hybridisierungssignale des Oligosets BBB3504_at und für Stromelysin-3 die des Oligosets OK_3348_s_at ausgewertet.

2.9.3 quantitative RT-PCR („TaqMan™“)

Zu dem 2x“TaqMan Universal PCR-Mastermix“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) wurde 1 ng Erststrang cDNA, 300 nM Primer und entsprechende Mengen an Sonden zugegeben und mit Aqua dest. auf 25 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion (2 min: 50°C, 10 min: 95°C, 40x (15 sek: 95°C, 60 sek: 60°C)) und parallel verlaufende Detektion der Produkte wurde mit dem „GenAmp 5700 Sequencing Detektion System“ (Applied Biosystems, Martinsried) durchgeführt. Um die Detektion zu ermöglichen wurden „ABI PRISM Optical Tubes and Caps“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) als Reaktionsgefäße benutzt.

Alle Sonden wurden in einem Konzentrationsbereich von 50 nM bis 200 nM getestet und die Konzentration ausgewählt, die ein Optimum aus frühem Fluoreszenzanstieg, hohem Endniveau und geringem Sondenverbrauch darstellte (Tab. 3). Alle Primer und Sonden wurden mittels des Programms „PrimerExpress“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewählt und von Metabion, Martinsried synthetisiert bzw. HPLC-aufgereinigt. Die Sonden waren 5'-Fam und 3'-TAMRA markiert. Die optimierte Sondenkonzentration wurde zur Überprüfung des linearen Messbereiches in TaqMan Reaktionen mit verschiedenen cDNA Konzentrationen eingesetzt. Das Signal nahm üblicher Weise über einen Bereich von mindestens 15 c_t -Werten linear mit der Konzentration zu.

Tab. 3: Sequenzen und Konzentrationen der im „TaqMan™“ verwendeten Primer und Sonden sowie deren Lokalisationsort innerhalb der cDNA des entsprechenden Gens.

| Name | Sequenz | Konzentration [nM] | Lokalisation [bp] |
|-------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------|
| LIV1-F: | 5'-AAAGATCCTAGAAACAGCCAGGG-3' | 300 | 585 |
| LIV1-R | 5'-TGTCCCTTGACATTCCTTCTACCAC-3' | 300 | 660 |
| LIV1-Sonde | 5'-AGGAGCTCACCGACCAGAACATGCC-3' | 150 | 611 |
| Sl3-F | 5'-GCCACGAATATCAGGCTAGAGAC-3' | 300 | 1517 |
| Sl3-R | 5'-GGGCTCAGTCCCATGCC-3' | 300 | 1586 |
| Sl3-Sonde | 5'-CCATCTTTGTGGCTGTGGGCACC-3' | 100 | 1546 |
| GAPDH-F | 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' | 300 | 108 |
| GAPDH-R | 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3' | 300 | 314 |
| GAPDH-Sonde | 5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3' | 200 | 86 |
| Vim-F | 5'-TTCTCTGCCTCTTCCAAACTTTTC-3' | 300 | 1355 |
| Vim-R | 5'-GGGTATCAACCAGAGGGAGTGA-3' | 300 | 1431 |
| Vim-Sonde | 5'-TCCCTGAACCTGAGGGAAACTAATCTGGA-3' | 100 | 1380 |

Die Signale der Reaktion wurden mittels eines Softwarepaketes („GeneAmp 5700 SDS Software, Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet. Als Quantifizierungsmaß wird der c_t -Wert definiert, der die Zyklenzahl bis zum Erreichen einer bestimmten Amplifikatmenge angibt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionshöhen ausschließlich als relative Werte angegeben, d.h. um unterschiedliche Proben vergleichen zu können, wurde die genspezifischen c_t -Werte auf die des so genannten „housekeeping“ Gens *GAPDH* bezogen. In den meisten Fällen wurden die so ermittelten Expressionshöhen auf eine Standardprobe (z.B. Normalgewebe der Brust) bezogen, um Vergleiche zwischen verschiedenen Experimenten zu ermöglichen. Es wurden standardmäßig Dreifachbestimmungen vorgenommen.

2.9.4 in situ Hybridisierung

Um die *LIV-1* spezifische („antisense“) Sonde und deren Gegenstrang („sense“) herzustellen, wurde das Plasmid AI620861 (RZPD, Berlin) mit *SmaI* (für „antisense“) bzw. *NotI* (für „sense“) geschnitten [Maniatis *et al.*, 1989]. Nach einer Phenol-Chloroformextraktion [Maniatis *et al.*, 1989] und anschließender Ammoniumacetat/Ethanol-fällung der DNA [Maniatis *et al.*, 1989] wurden die Produkte in einem 1% TBE-Agarosegel [Maniatis *et al.*, 1989] auf ihre

Größe entsprechend des DNA-Größenstandards überprüft. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt (OD_{260nm}). Die *in vitro* Transkription wurde mit dem „RNA labeling Kit“ (Roch, Mannheim) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt, d.h. 1 µg linearisierte DNA in 14 µl H₂O, 2 µl „labeling Mix“ (enthält u.a. Digoxigenin markiertes dUTP), 2 µl Transkriptionspuffer, 0,8 µl RNase Inhibitor und 1,2 µl RNA-Polymerase wurden für 3 h bei 37°C inkubiert. Für die „antisense“ Sonde wurde T7-Polymerase und für die „sense“ Sonde SP6 Polymerase verwendet. Danach wurde die RNA durch eine LiCl₂ / Ethanol-fällung [Maniatis *et al.*, 1989] gefällt, in einem 0,7%-igen RNA-Agarosegel [Maniatis *et al.*, 1989] auf ihre Größe überprüft und in Hybridisierungspuffer bei -20°C gelagert. Für die Arbeit mit RNA wurde ausschließlich RNase/DNase freies Wasser verwendet.

Paraffineingebettete Schnitte wurden durch Xylol (3 x 10 min) von Wachs befreit und mittels absteigender Ethanolreihe dehydriert. Danach wurden die Schnitte in 4% PFA (30 min) fixiert, mit PBS (5 min) gewaschen und mit Proteinase K (10 µg/ml in 20 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA, 10 min) behandelt. Nach Waschen in PBS (5 min) folgte eine nochmalige Fixierung (4% PFA, 30 min) gefolgt von einem Waschschriff in PBS (5 min) und Inkubation in 2xSSC (2 x 2 min) bzw. Tris-Glycin-Puffer (30 min). Die Hybridisierung der Sonde wurde über Nacht bei 65°C ausgeführt. Dafür wurde die RNA aus dem *in vitro* Transkriptionsansatz 1:400 in Hybridisierungspuffer verdünnt und pro Schnitt 100 µl zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in folgenden Lösungen inkubiert: 5xSSC (20 min, 37°C), Formamidlösung (20% Formamid, 0,5xSSC, 40 min, 60°C), NTE-Puffer (15 min, 37°C), NTE-Puffer+10 µg/ml RNase A (30 min, 37°C), NTE-Puffer (15 min, 37°C), Formamid-Waschlösung (40 min, 60°C), 2xSSC (15 min, 20°C). Danach wurden die Schnitte für 1 h in 1% „Blocking“-Lösung (Roche, Mannheim) abgesättigt bevor sie mit dem anti-Digoxigenin Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Roch, Mannheim, 1:5000 in „Blocking“-Lösung), über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Am folgenden Tag wurden die Schnitte in TBS/0,1% Tween-20 (7 x, insgesamt ca. 4 h) und NTMT-Puffer (3 x 10 min) gewaschen und 1000 µl der Substratlösung „BM-Purple“ (Roche, Mannheim) zugegeben. Nach einer 3-tägigen Inkubation (4°C) wurden die Schnitte mit NTMT (15 min), PBS (5 min) und Aqua dest. (5 min) gewaschen, mit Kernechtrot (10 min) gegengefärbt, mit Glycerin-Gelatine eingedeckelt und mittels Lichtmikroskopie analysiert. Alle verwendeten Lösungen waren RNase/DNase frei.

2.10 Proteinchemische Methoden

2.10.1 Herstellung von Proteinlysaten

Alle Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt. Die Zellen wurden gewaschen (2xPBS) und zu einer 70%-ig konfluenten Kultur auf 25 cm² Kulturfläche wurden 300 µl NP-40 Puffer (25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1% NP-40 (Sigma-Aldrich, München), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Pefabloc SC (Biomol, PA), „Proteaseinhibitor Cocktail Complete“ (Roche, Mannheim)) gegeben. Die Zellen wurden abgeschabt, 3-4 x auf- und abpipettiert und in Eppendorfgeläße überführt. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis, wurden Zelltrümmer u.ä. abzentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4°C). Die Lysate wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.10.2 SDS-PAGE und Western Blot

Es wurde das SDS-PAGE / Western Blot System „Novex“ (Invitrogen, Karlsruhe) mit den dazugehörigen Puffern („MOPS SDS running buffer“, Invitrogen, Karlsruhe) und Gelen („NuPAGE“, Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Angaben des Herstellers benutzt. Für die Detektion von LIV-1 wurden 7% Gele mit 12 Kammern, für Stromelysin-3 4%-12% Gradientengele mit 12 Kammern eingesetzt. Die SDS-PAGE wurde bei 180V durchgeführt, wobei 500 µl „Antioxidant Solution“ (Invitrogen, Karlsruhe) zur mittleren Gelkammer zugegeben wurde und der Transfer auf Nitrozellulosemembran (Invitrogen, Karlsruhe) bei 30 V für 1 h durchgeführt wurde. Als Ladepuffer wurde Lämmli-Puffer benutzt [Laemmli, 1970].

Nach dem Transfer wurde die Membran mit 5% Milchpulver/PBS blockiert (über Nacht, 4°C) und am nächsten Tag mit primärem Antikörper in 1% Milchpulver/PBS inkubiert (1 h, 20°C). Nach dem Waschen mit 0,1% Tween-20/PBS

(5 x, insgesamt 35 min) wurde mit dem sekundären Antikörper, an den Peroxidase gekoppelt war (siehe Abschnitt 2.5) in 1% Milchpulver/PBS inkubiert (1 h, 20°C). Nach nochmaligem Waschen in 0.1% Tween-20/PBS (5x, insgesamt 35 min) wurde die Antikörperbindung mittels ECL-Plus (Amersham, Bioscience, Freiburg, 0.1 ml/cm²) und Auflegen bzw. Entwicklung eines Röntgenfilms („Biomax MR Film“, Kodak, Stuttgart-Wangen) detektiert. Die Präinkubation des ersten Antikörpers mit entsprechenden Peptiden wurde wie für die Immunzytochemie beschrieben, durchgeführt (siehe Abschnitt 2.10.3), wobei sich das Antikörper/Peptidgemisch aber in 1% Milchpulver/PBS befand.

Zur gleichmäßigen Beladung der Proteingele wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Dafür wurde der „Bio-Rad Protein Assay“ (Bio-Rad, CA) nach Empfehlung des Herstellers benutzt, d.h. eine BSA-Standardlösung (Sigma-Aldrich, München) wurde auf Konzentrationen im Bereich 2000 µg/ml bis 0 µg/ml verdünnt und eingesetzt. 200 µl der Proben wurden mit 50 µl der „Bio-Rad Protein Assay Lösung“ versetzt, gemischt und nach 5-60 min die OD_{595nm} bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Standardkurve. Die gleichmäßige Beladung der Proteingele wurde außerdem durch eine Coomassie-Färbung überprüft, d.h. die Gele wurden nach dem Transfer mit „Coomassie-Stain“ (Bio-Rad, CA) für 1 h angefärbt und Proteine durch Entfärben mittels Coomassie-Destain (Bio-Rad, CA) sichtbar gemacht.

Um SI-3 in Zellkulturmedien detektieren zu können wurden die Zellkulturüberstände mittels „Biomax 5k centrifugal filter“ (Millipore, MA) nach den Empfehlungen des Herstellers 1:20 aufkonzentriert.

2.10.3 Immunzytochemie

Die Methode wurde nach dem Protokoll von Oft und Mitarbeitern durchgeführt [Oft *et al.*, 1996], d.h. Zellen wurden bis zu einer 60% - 70%-igen Konfluenz auf „cover slips“ (Roth, Karlsruhe) angezogen, mit PBS gewaschen (3x2min), und in 4% PFA (10 min) fixiert. Nach nochmaligen Waschen in PBS (3 x 2 min), wurden die Zellen mit 0.2% Triton-X100/PBS (5 min) permeabilisiert, mit PBS (3 x 5 min) gewaschen und mit 0.2% Gelatine/PBS (20 min) abgeblockt. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper (1 h), einem Waschen (3 x 5 min) und der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (1 h), wurden die Zellen nochmals gewaschen (3 x 5 min) und mit Aqua dest. gespült. Die „Cover slips“ wurden mittels „VectaShield+DAPI“ (Vector Laboratories, CA) auf Objektträger aufgebracht. Nach dem ersten Blockierungsschritt waren alle Lösungen in 0.2% Gelatine/PBS angesetzt. Zur Analyse mittels Lichtmikroskopie wurden die Schnitte nach der Inkubation mit biotinyliertem sekundären Antikörper gewaschen (PBS), mit „horseredish peroxidase konjugiertes Streptavidin“ (Vector Laboratories, CA) inkubiert (10 min) und wieder gewaschen (PBS, Aqua dest). Danach wurde die Substratlösung AEC Romulin (Biocarta, Hamburg) zugegeben und nach 2-5 min die Reaktion durch Aqua dest abgestoppt. Die Zellen wurden mit Hämatoxylin (2 min) gegengefärbt und mit Glycerin-Gelatine eingedeckelt. Als Negativkontrolle wurde anstelle des ersten Antikörpers Präimmenserum („universal negative control“ DAKO, Glostrup) benutzt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Präinkubation von Antikörpern mit Peptiden wurde der primäre Antikörper 1 h in 0.2% Gelatine/PBS mit einem ca. 30-fachen molaren Überschuss an Peptid inkubiert (LIV-1 Peptid: CPDHDSOSSGKDPRNS, Negativkontrollpeptid: PGASSREEPPEEPEQC). Für alle verwendeten Antikörper wurde in Vorexperimenten mittels Verdünnungsreihen die optimale Konzentration (d.h. bestes Signal/Hintergrundverhältnis) bestimmt (Antikörper, Konzentrationen usw. siehe Abschnitt 2.5).

2.10.4 Immunhistochemie

Die paraffineingebetteten Gewebeschnitte wurden durch Xylol entparaffiniert (3 x 3 min), in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert und durch 3% H₂O₂ (10 min) wurde die endogene Peroxidaseaktivität blockiert. Nach einem Spülen mit PBS wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6.0, Taqstura, CA) im Schnellkochtopf gekocht (5 min). Nach Abkühlen der Schnitte und Waschen mit PBS, wurden sie mit „Avidin- und Biotin Blockierungslösung“ (Vector Laboratories, CA, je 10 min) gefolgt von 5% Eseserum in 2% BSA/PBS (Jackson Immunoresearch, Hamburg, 15 min) abgeblockt. Danach wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper (1 h) und nach einem Waschschrift (PBS) mit

dem biotinyliertem sekundäre Antikörper (1 h) inkubiert. Zur Detektion wurden die Schnitte mit „horseredish peroxidase konjugiertem Streptavidin“ (Vector Laboratories, CA, 10 min) inkubiert, gewaschen (PBS) und das Substrat AEC Romulin (Biocarta, Hamburg) zugegeben. Nach 2-5 min wurde die Reaktion entsprechend der Färbeintensität der Positivkontrolle Zytokeratin durch Aqua dest gestoppt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin / Eosin gegengefärbt, durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und mit Pertex eingedeckelt. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels Lichtmikroskopie. Als Negativkontrolle wurde anstelle des ersten Antikörpers Präimmenserum („universal negative control“ DAKO, Glostrup) benutzt. Alle Antikörper wurden auf ihre optimale Konzentration (d.h. bestes Signal- zu Hintergrundverhältnis) durch Verdünnungsreihen in Vorexperimenten getestet (zu Antikörpern, Konzentrationen usw. siehe Abschnitt 2.5). Um Gewebe schlechter Qualität aus der Analyse auszuschließen, wurden ausschließlich Proben benutzt, deren Normalgewebe eine vergleichbare Intensität in der Kontrollfärbung mit Zytokeratin aufwiesen.

2.10.5 *in vitro* Transkription / Translation

Für die *in vitro* Transkription / Translation wurde das „TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System“ (Promega Corporation, Mannheim) nach Empfehlung des Herstellers benutzt. 40 µl des „TNT T7 Quick Master Mix“ (Promega Corporation, Mannheim), welcher Retikulozytenlysate enthält, wurden mit 1 µg Plasmid DNA in 8 µl H₂O (RNase/DNase frei) und 2 µl ³⁵S-Methionin (Amersham Bioscience, Freiburg) gemischt und 90 min bei 30°C inkubiert. 5 µl der Reaktion wurden mit 20 µl Lämmli-Puffer [Laemmli, 1970] versetzt, 2 min bei 90°C erhitzt, 5 min auf Eis inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anschließende Autoradiographie analysiert.

2.10.6 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden 500 µl „Protein A Sepharose Beads“ (Amersham, Bioscience, Freiburg) 3 x mit Puffer A gewaschen. 50 µl des *in vitro* Transkription / Translationsansatzes (siehe Abschnitt 2.10.5) wurden mit 200 µl Solubilisierungspuffer inkubiert (1 h, 4°C). Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 5 µg Antikörper versetzt und mit frischen „Protein A Sepharose Beads“ inkubiert (über Nacht, 4°C). Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgetrennt und die „beads“ gewaschen (3 x Puffer A, 2 x PufferB, 1 x PufferC). Der Überstand wurde wiederum abgetrennt und die „beads“ in 25 µl Lämmli Puffer [Laemmli, 1970] gelöst, 2 min bei 90°C erhitzt, 5 min auf Eis inkubiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 2000 rpm in einer Tischzentrifuge für 2 min ausgeführt.

2.11 Allgemeine Methoden der Säugerzellkultur

Alle Säugerzellen wurden bei 37°C in einer 5% CO₂ Atmosphäre angezogen. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Zur Kultivierung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70%-80% angezogen und dann trypsiniert (d.h. waschen der Zellen mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) und Inkubation mit Trypsin (1 ml/25 cm²) bei 37°C bis die Zellen sich ablösen, abstoppen der Reaktion mit Medium+10% FBS). 1/5 bis 1/10 der Kultur wurde auf eine neue Platte ausgesät. Zellen wurden höchstens über 10 Passagen kultiviert. Zur Aufbewahrung wurden die Zellen in 10% DMSO/FBS eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zellzahlbestimmungen von 2D Kulturen wurden mittels Neubauer Zählkammer und Trypanblau-Färbung durchgeführt. Einbetten der Zellen in Paraffin wurde von der Abteilung „Pathologie“ der metaGen Pharmaceuticals GmbH ausgeführt.

2.12 Methoden zur funktionellen Analyse

2.12.1 Herstellung stabil transfizierter Klone

Die Zellen wurden mittels „Fugene“ (Boehringer, Mannheim) nach Empfehlung des Herstellers mit dem

Expressionsplasmid transfiziert, d.h. 6 µl Fugene wurden mit 194 µl Optimem (Gibco, Karlsruhe) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 2 µg Plasmid DNA zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Dieses Gemisch wurde auf eine 60 % Kultur in einer 6-,„well“ Kulturschale gegeben, deren Medium mit 1.8 ml frischem Medium ersetzt worden war. Am nächsten Tag wurden die Zellen vereinzelt, so dass ca. 100.000 Zellen auf 25 cm² ausgesät wurden. Außerdem wurde dem Medium 750 µg/ml G418 (MDA-MB-231) bzw. 600 µg/ml G418 (MCF-7) zugegeben. Zellklone wurden bei einer Größe von ca. 100 Zellen trypsinisiert (das Trypsin wurde lokal mittels Eppendorfpipette aufgebracht und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst). Gelöste Zellklone wurden in 24-,„well“ Schalen überführt und getrennt weiterkultiviert.

2.12.2 Kokulturen

Zur gemeinsamen Kultivierung von Epithel- und Fibroblastenzellen wurden Brusttumorfibroblasten mit einer Zellzahl von 1×10^4 auf „cover slips“ in 24-,„well“ Schalen ausgesät. Nach 5 Tagen war die Kultur konfluent. Am folgenden Tag wurden die Epithelzellen auf diese Fibroblastenkultur ausgesät (Zellzahlen: MCF-10A: 1×10^4 , MDA-MB-468: 6×10^4 , MDA-MB-231: 1×10^4 , MCF-7 6×10^4). Nach Inkubation der Kokultur für weitere 3 Tage wurde 10 µg/ml Brefeldin A für 5 h zu der Kultur gegeben, um die Proteinsekretion zu unterdrücken und eine bessere Detektion in der anschließenden Immunzytochemie zu ermöglichen.

2.12.3 3D Matrigelkulturen

Der Boden von 12-,„well“ Schalen wurden mit 150 µl Matrigel beschichtet und bei 37°C für 30 min ausgehärtet. Die Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und ein Volumen entsprechend 7.5×10^5 Zellen pro Ansatz in ein Eppendorfgefäß oder Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (300 x g, 5 min) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in ca. 50 µl Medium durch leichtes Schütteln angelöst. Danach wurden 600 µl Matrigel zugegeben (auf Eis), die Suspension gut gemischt und auf die beschichteten Platten gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde 1 ml Medium zu den Kulturen gegeben. Die Aussaat gleicher Zellzahlen wurde am folgenden Tag in einer parallel ausgesäten Kultur mittels MTS-Test überprüft. Die Zellen wurden 7-10 Tage kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Um Zellen in 24-,„well“ oder 96-,„well“ Maßstab zu kultivieren wurden alle Volumen- und Zellzahlangaben proportional verringert.

2.12.4 MTS Test

Zur Bestimmung der Zellzahl in 3D Matrigelkulturen wurde der MTS-Test benutzt. Dafür wurden 42 mg „Cell Titer 96 Aqueous MTS Reagent Powder“ (Promega Corporation, Mannheim) in 21 ml PBS gelöst und der pH auf 6.5 mit 1 N HCl eingestellt. Außerdem wurden 0.92 mg PMS (Sigma-Aldrich, München) in 1 ml PBS gelöst. Die Lösungen wurden sterilfiltriert und lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. Vor der Anwendung wurden die beiden Lösungen 1:20 gemischt und 400 µl dieses Gemisches zu 2 ml Medium gegeben (MTS/Medium-Gemisch). Das Medium der zu analysierenden Kulturen wurde abgenommen und mit dem doppelten Volumen MTS/Medium Gemisch ersetzt. Die Zellen wurden für 1-2 h bei 37°C inkubiert und dann die optische Dichte (OD_{490nm}) des MTS/Medium Gemisches bestimmt. Standardmäßig wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.12.5 Softagartest

Es wurde zweifach konzentriertes DMEM/F12-Medium angesetzt: 15.6 g DMEM/F12 Pulver (Sigma-Aldrich, München) mit 1.2 g NaHCO₃ in 500 ml Aqua dest. lösen, einen pH zwischen 7.2-7.4 einstellen und sterilfiltrieren. Zu dem Medium wurde 20% FBS zugegeben und das Gemisch auf 37°C temperiert. 1.2% und 0.6% steriler Agar (in Aqua dest.) wurde verflüssigt und auf 48°C im Wasserbad temperiert. Pro Ansatz wurde 1 ml des 1.2% temperierten Agars mit 1 ml 2xDMEM/F12/20% FBS gemischt und damit 6-,„well“ Platten beschichtet. Der Agar wurde ca. 1 h bei

Raumtemperatur abgekühlt. Die zu analysierenden Zellen wurden trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und pro Ansatz ein Volumen entsprechend 1×10^4 Zellen abgenommen und abzentrifugiert (300 x g, 5 min). Das Zellpellet wurde in 500 ml temperiertem 2xDMEM/F12/20% FBS aufgenommen, mit 1 ml des temperierten 0.6% Agar gemischt und auf die beschichteten Platten gegeben. nach Abkühlung des Agars (5 min: 4°C, 10 min: Raumtemperatur) wurden 2 ml Standard Zellkulturmedium zugegeben und die Kulturen 5.5 Wochen inkubiert.

Zur Analyse wurden die Kulturen mit PBS gewaschen und mit 500 µl Neutralrotlösung (1.2 g Neutralrot auf 100 ml PBS) inkubiert gefolgt von 4-5 Waschschritten mit PBS (insgesamt 2-3 Stunden). Die Agarkulturen wurden auf Filterpapier getrocknet und mittels Binokular wurden positive Kolonien ausgezählt, d.h. Kolonien die größer als eine gewählte Standardkolonie waren. Die Standardkolonie bestand aus etwa 100 Zellen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.12.6 *in vivo* Xenograft Experimente

Zellen wurden trypsiniert, gezählt und ein Volumen entsprechend einer Zellzahl von 2 Millionen Zellen pro Tier abgenommen, abzentrifugiert (300 x g, 5 min) und das Pellet in 50 µl Matrigel aufgenommen und weiter auf Eis gehalten. Wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel wurde wie von Taub und Mitarbeitern beschrieben, hergestellt [Taub *et al.*, 1990]. Eiskaltes Matrigel wurde dafür mit 20% Ammoniumsulfat gefällt, zentrifugiert (13.000 g, 35 min, 4°C) und in TBS resuspendiert. Das Matrigel wurde 2 h gegen TBS/0.5% Chloroform, 2 h gegen TBS und abschließend 2 x 2 h gegen Medium dialysiert.

Die tierexperimentellen Tests wurden freundlicher Weise von Dr. Matthias Reule übernommen. Dafür wurden weibliche NMRI Nacktmäuse (Harlan & Winkelmann, Borcheln) im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Jede Versuchsgruppe enthielt standardmäßig 8 Tiere. Für Versuche mit MCF-7 Zellen wurden den Tieren eine Woche vor der Operation Östrogenpellets (IRA, FI) subkutan eingesetzt. Für das Einbringen der Zellen ins Fettgewebe der Brust wurde den Tieren unter Betäubung ein ca. 10 mm langer Schnitt in die Haut an der entsprechenden Stelle gesetzt und 50 µl Tumorzellsuspension injiziert. Der Schnitt wurde mit Wundclips verschlossen. Tumoranwachsen, Tumolvolumen und Gewicht der Tiere wurde alle 3-4 Tage bestimmt. Die Experimente wurden beendet, wenn die Tiere an Gewicht verloren oder anderweitige Anzeichen für einen schlechten Allgemeinzustand aufwiesen. Die Tiere wurden entsprechend den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes getötet.

2.13 statistische Methoden

2.13.1 Fehlerberechnung und Expressionsanalyse

In den Diagrammen wurde der Bereich der jeweils einfachen positiven sowie negativen Standardabweichung als Balken um den Mittelwert abgebildet. Bei Normalisierungen der Messwerte wurde die Standardabweichung nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz von Dörffel berechnet [Doerffel, 1984]. Für die statistischen Analysen der Expressionsdaten wurde das Programmpaket SPSS11.0 mit dem Zusatzmodul „advanced mode“ benutzt. Alle Expressionsdaten wurden aufgrund ihrer Verteilung in Boxplot Analysen als nicht-parametrisch angesehen. Um nicht-parametrische, abhängige Proben (z.B. Expressionshöhen in den jeweiligen Tumor- und Normalgeweben derselben Patienten) zu vergleichen, wurde der „Wilcoxon signed rank“ Test benutzt. Der „Mann-Whitney-Wilcoxon“ (U-) Test wurde benutzt um zwei nicht-parametrische, unabhängige Stichprobengruppen miteinander zu vergleichen (z.B. Expressionshöhen in Tumor- und Normalgeweben von unterschiedlichen Patienten). Die Weiterentwicklung dieses Tests, nämlich der Kruskal-Wallis (H-) Test [Kruskal & Wallis, 1952] wurde angewendet, wenn mehr als zwei nicht-parametrische, unabhängige Stichprobengruppen, die in einer logischen Reihenfolge angeordnet werden konnten, analysiert wurden (z.B. Expressionshöhen in Tumoren mit verschiedener Größe). In Boxplot Diagrammen sind als Box jeweils die oberen und unteren Quartilen dargestellt, wobei der Querbalken den Median repräsentiert. Längstbalken verdeutlichen den Bereich bis zum höchsten bzw. niedrigsten Messwert, der im Bereich der 1.5-fachen Boxenlänge liegt. Ausreißer (o) wurden als Werte definiert, die im Bereich der 1.5-fachen bis 3-fachen Boxenlänge liegen. Daten

außerhalb dieses Bereiches wurden als Extremwerte (*) dargestellt. Die Patientenanzahlen der Analyse sind in den Diagrammen angegeben.

2.13.2 Analyse der Überlebenszeiten

Auch für die Analyse der Überlebenszeiten wurde das Programmpaket SPSS11.0 mit dem Zusatzmodul „advanced mode“ benutzt. Überlebenskurven für die Bestimmung der Länge des krankheitsfreien Intervalls wurden mittels der Kaplan Meier Analyse berechnet. Diese Methode berücksichtigt die Informationen aller Beobachtungseinheiten so lange, wie diese beobachtet worden sind und zensiert Daten zu dem Zeitpunkt der letzten Messung. Zum Vergleich zweier Überlebenskurven wurde der „log-rank“ Test benutzt. Um die prognostische Relevanz einzelner Faktoren zu bestimmen, wurde eine univariante Analyse mittels des „Cox proportional Hazard“ Modells durchgeführt [Cox, 1972]. Zur Bestimmung der Unabhängigkeit dieser Faktoren wurden multivariate Analysen auf der Grundlage des „Cox Proportional Hazard“ Modells durchgeführt. Um die Annahme der Proportionalität, dass heißt, die einzelnen Variablen müssen unabhängig von der Zeit sein, zu verifizieren, wurde ein log minus log Plot berechnet. Es zeigte sich, dass für alle in der vorliegenden Arbeit benutzen Kovariablen die Annahme der Proportionalität gerechtfertigt ist, d.h. die Kurven der Variablen verlaufen im log minus log Plot parallel (Beispiele siehe Abb. 5).

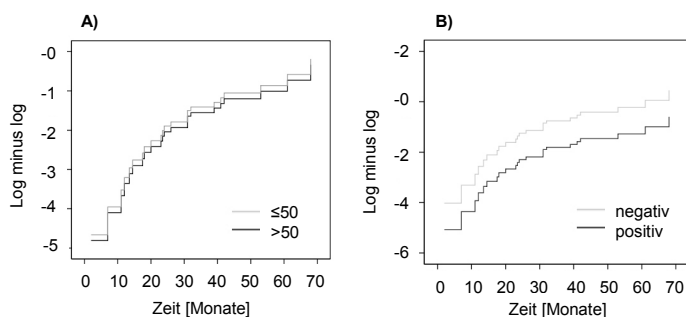


Abb. 5: Überprüfung der Proportionalitätsannahme des „Cox proportional hazard“ Modells. In einem log minus log Diagramm sind in A) die Verteilung der Patienten mit einem Alter über bzw. unter 50 Jahre bei Diagnose und in B) der Anteil der Östrogenrezeptor- α positiven und negativen Patienten jeweils über die Zeit dargestellt. Der parallele Verlauf der Kurven zeigt die Proportionalität der Faktoren über den betrachteten Zeitabschnitt.

2.14 Gewebeproben und Quantifizierungssystem

Die humanen Brusttumor- und Normalgewebeproben wurden freundlicher Weise von Dr. Arndt Hartmann, Pathologie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Die Patientenproben wurden im Zeitraum von Januar 1992 bis Dezember 1998 gesammelt. Die Diagnose wurde von zwei unabhängigen Pathologen gestellt. Die Einteilung der Tumore erfolgte nach der TNM-Klassifikation [Woodward *et al.*, 2003]. In der *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie wurden nur Gewebe verwendet, die in der Positivkontrolle (Zytokeratin) ähnlich starke Färbungen des entsprechenden Normalgewebes aufwiesen. Zur Evaluierung der Färbung wurde das Quantifizierungssystem von Allred und Mitarbeitern verwendet [Allred *et al.*, 1998]. Dafür wurde die Stärke der Färbung (S) bestimmt (0: keine, 1: schwach, 2: mittel, 3: stark). Außerdem wurde der Anteil (P) positiv gefärbten Zellen abgeschätzt (0%<P≤1%, 2:1%<P≤10%, 3:10%<P≤33%, 4:33%<P≤66%, 5:66%<P≤100%). Die Summe aus S und P entspricht der Färbeintensität mit der gewählten Einheit FI (Bereich: 0 FI-8 FI). Die Färbeintensitäten wurden von zwei unabhängigen Personen (Grit Kasper und Esmeralda Castaños-Vélez, metaGen Pharmaceuticals GmbH) bestimmt. Der Mittelwert der Färbungen zweier Proben desselben Gewebes wurde für die Analyse verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 LIV-1 mRNA Expression in Tumor- und Normalgewebe der Brust

Um zu klären, ob *LIV-1* auf mRNA Ebene differentiell in Tumorgewebe im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe exprimiert ist und somit als potentielles therapeutisches Zielmolekül in Frage kommt, wurden Genchip Hybridisierungen ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit Hilfe quantitativer RT-PCR und *in situ* Hybridisierung (*ISH*) bestätigt. Die Korrelation der *LIV-1* Expressionshöhe mit verschiedenen klinischen Markern diente dabei der näheren Charakterisierung des Expressionsmusters, um potentiell therapierbare Patientengruppen zu charakterisieren. Außerdem wurde die Expression in Tumorzelllinien analysiert, um diese als Modell für weitere Untersuchungen benutzen zu können.

3.1.1 Ergebnisse der Affymetrix Genchip Hybridisierungen

Für die Expressionsanalyse mittels Genchip Hybridisierung wurde der von metaGen Pharmaceuticals GmbH zusammengestellte Affymetrix Genchip „metaGen1“ verwendet. Die Hybridisierung der Chips wurde von der Abteilung „Gynäkologische Tumore“ der metaGen Pharmaceuticals GmbH durchgeführt und die Ergebnisse wurden innerhalb dieser Arbeit im Hinblick auf die *LIV-1* mRNA Expression ausgewertet.

3.1.1.1 Gewebeproben

Für 24 Brusttumorproben des Subtyps IDC wurde jeweils eine Chiphybridisierung mit cRNA durchgeführt, welche aus mRNA mikrodissertierter Epithelzellen des Normal- bzw. Tumorgewebes hergestellt wurde. Dadurch konnte das Expressionsverhältnis von Tumor- zu Normalgewebe des gleichen Patienten bestimmt werden. Außerdem wurden 59 mikrodissertierte Tumorproben analysiert, zu denen kein Normalgewebe erhältlich war. Diese Gruppe enthielt 5 DCIS, 4 ILC und 50 IDC.

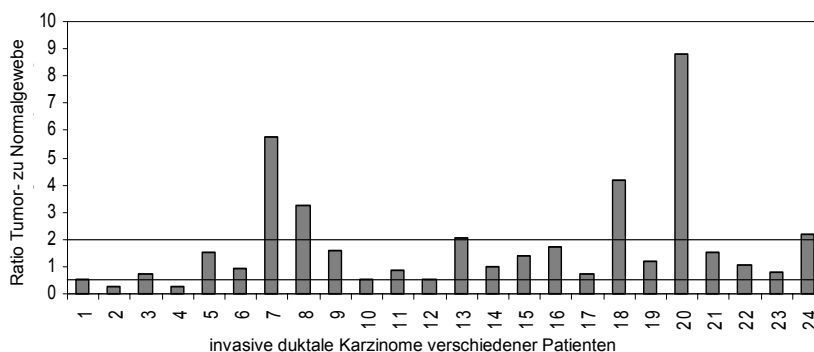


Abb. 6: *Differentielle Expression von LIV-1 mRNA in Brusttumorproben.* 24 mikrodissertierte Proben von Tumor- und Normalgewebe wurden auf Affymetrix Genchips hybridisiert. Dargestellt ist das Verhältnis der *LIV-1* spezifischen Hybridisierungssignale im Brusttumorgewebe bezogen auf das entsprechenden Brustnormalgewebe desselben Patienten. In 6 der 24 Tumore war *LIV-1* überexprimiert ($Tu/N \geq 2$) und in 2 unterexprimiert ($Tu/N \leq 0.5$).

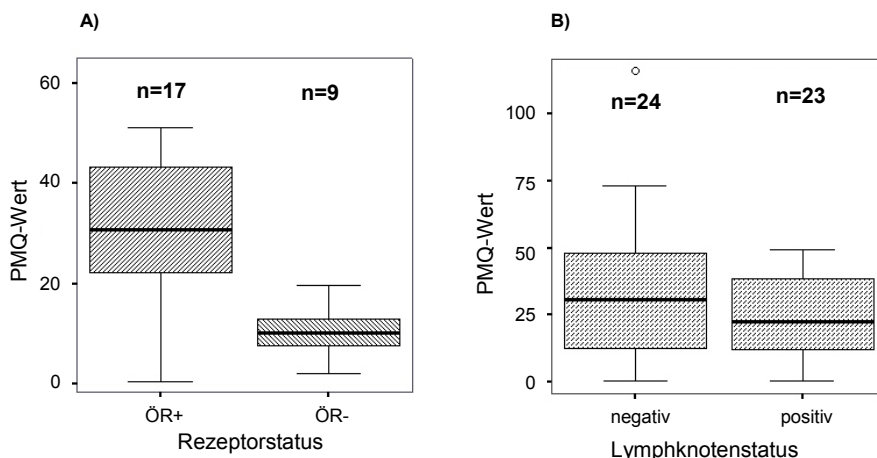


Abb. 7: *Korrelation der LIV-1 mRNA Expression mit dem ÖR-Status bzw. dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen.* Gezeigt ist die Verteilung der *LIV-1* spezifischen Hybridisierungssignale aus Genchip Experimenten (PMQ-Werte). A) Gruppierung der Tumoren nach ÖR-Status und B) Gruppierung der Tumore nach Lymphknotenstatus. Die Assoziation von hoher *LIV-1* Expression mit positivem ÖR war statistisch signifikant ($p=0.011$), hingegen gab es keine Korrelation mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen ($p=0.409$). ÖR=Östrogenrezeptor- α

LIV-1 mRNA war in 25% (6/24) der Tumorproben über- (d.h. Verhältnis $Tu/N \geq 2$) und in 8% (2/24) unterexprimiert (d.h. Verhältnis $Tu/N \leq 0.5$). Der Faktor der differentiellen Expression lag zwischen $Tu/N=8.8$ und $Tu/N=0.29$ und betrug durchschnittlich $Tu/N=1.2$. Der Median der Expression in Tumorgeweben lag bei $PMQ=45.9$ (Bereich $PMQ: 6.2-177.9$), wobei sich für die Expression in Normalgeweben ein Median von $PMQ=28.4$ (Bereich $PMQ: 12.5-84.1$) errechnete.

Zu 9 der 24 Tumorpaaire war der Östrogenrezeptor- α -(ÖR-) Status bekannt und es deutete sich an, dass *LIV-1* in ÖR positiven Tumoren häufiger überexprimiert ist (3/5) als in ÖR negativen Tumoren (0/4). Auf Grund der geringen Probenanzahl kann aber keine statistisch signifikante Aussage getroffen werden. Wenn allerdings alle Tumore, d.h. zusätzlich zu den neun bereits

erwähnten Tumorproben auch Tumorgewebe ohne dazugehöriges Normalgewebe, in die Analyse eingeschlossen wurden, zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen hoher absoluter *LIV-1* Expression und positivem ÖR-Status ($p < 0.001$, $n_{\text{ÖR}^+} = 17$, $n_{\text{ÖR}^-} = 9$) (Abb. 7A).

Anhand der Analyse aller Tumore mit und ohne entsprechendes Normalgewebe, von denen der Lymphknotenstatus bekannt war, zeigte sich keine Korrelation zwischen der absoluten Expressionshöhe von *LIV-1* in Primärtumoren und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen ($p = 0.409$, Abb. 7B). Dies traf auch zu, wenn nur ÖR positive Tumore betrachtet wurden ($p = 0.621$, $n_{\text{ÖR}^+/\text{LNK}^-} = 9$, $n_{\text{ÖR}^+/\text{LNK}^+} = 11$).

Die Ergebnisse der Genchip Hybridisierungen zeigen demnach, dass *LIV-1* mRNA in Tumor- im Vergleich zu Normalgewebe der Brust überexprimiert ist und dass die Expressionshöhen positiv mit dem ÖR-Status, aber nicht mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korrelieren.

3.1.1.2 Brustzelllinien

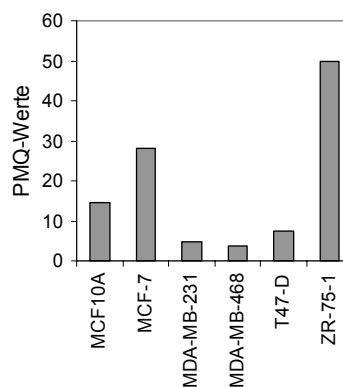


Abb. 8: mRNA Expression von *LIV-1* mRNA in Brusttumorzelllinien. Dargestellt sind die *LIV-1* spezifischen Hybridisierungssignale (PMQ-Werte) aus Genchipexperimenten für eine normale Brustzelllinie (MCF-10A) und 5 Brusttumorzelllinien. Die östrogenabhängigen Brusttumorzelllinien MCF-7 und ZR-75-1 zeigten die höchsten *LIV-1* Transkriptmengen.

Die cDNA von sechs verschiedenen humanen Brustzelllinien wurde für eine Quantifizierung der *LIV-1* mRNA mittels Genchip Hybridisierung untersucht. Die östrogenabhängigen Brustkrebszelllinien ZR-75-1 und MCF-7 zeigten die höchsten Expressionswerte von *LIV-1* (PMQ=49.8 bzw. PMQ=28.2) (Abb. 8). Auch die immortalisierte Brustnormalzelllinie MCF-10A, welche ÖR positiv ist, exprimierte relativ hohe Mengen *LIV-1* (PMQ=14.6). Die ÖR positive Brustkrebszelllinie T47-D hingegen exprimierte wenig *LIV-1* (PMQ=7.5). Allerdings ist für diese Zelllinie bekannt, dass auch andere östrogenregulierte Gene, z.B. pS2 niedrig exprimiert werden, so dass der ÖR in dieser Zelllinie wahrscheinlich nicht mehr transkriptionell aktiv ist. ÖR negative Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 zeigten Hybridisierungssignale von PMQ=4.8 bzw. 3.7. Damit bestätigte sich *in vitro* in Zelllinien die *in vivo* Assoziation von *LIV-1* Expression mit dem Östrogenrezeptor- α , wobei in Brustkrebszelllinien (Median PMQ=18.8)

durchschnittlich weniger *LIV-1* vorhanden war als in Brusttumorgewebe (PMQ=45.9, siehe Abschnitt 3.1.1.2).

3.1.2 Ergebnisse der quantitativen RT-PCR

Die unter Abschnitt 3.1.1.1 und 3.1.1.2 erzielten Ergebnisse sollten mittels quantitativer RT-PCR an einer unabhängigen Patientengruppe bestätigt werden. Um die *LIV-1* mRNA Expressionshöhen zu bestimmen, wurden die *LIV-1* spezifischen Signale auf die Signalhöhe des konstitutiv exprimierten Gens *GAPDH* (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase) der jeweiligen Probe normalisiert.

3.1.2.1 Gewebeproben

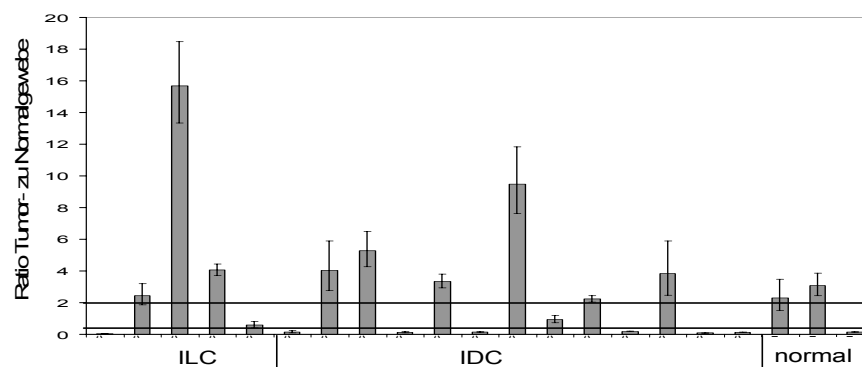


Abb. 9: *Differentielle Expression von LIV-1 mRNA in Brusttumoren.* Gezeigt ist das Expressionsverhältnis von *LIV-1* in Tumorgeweben (IDC und ILC) bezogen auf die durchschnittliche Expression von *LIV-1* in 3 unabhängigen Brustnormalgeweben („normal“). Die *LIV-1* Expressionshöhen wurden durch eine *LIV-1* spezifische quantitative RT-PCR und Normalisierung auf die *GAPDH* Signale der gleichen Probe ermittelt. *LIV-1* war in 9 der 18 Tumورproben überexprimiert (Tu/N \geq 2) und in 7 von 18 Tumورproben unterexprimiert (Tu/N \leq 0.5). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung gezeigt.

Die mRNA Expressionshöhe von *LIV-1* wurde in mikrodissertiertem Gewebe von 13 IDCs und 5 ILCs sowie in 3 Normalgeweben bestimmt und das Verhältnis der jeweiligen Tumore zur durchschnittlichen Expression in den Normalgeweben gebildet (Abb. 9). In 9 der 18 Tumore (50%) war *LIV-1* überexprimiert (d.h. Verhältnis Tu/N \geq 2). In 7/18 Fällen (39%) war die *LIV-1* unterexprimiert (d.h. Verhältnis Tu/N \leq 0.5). Die differentielle Expression lag in einem Bereich von Tu/N=9.5 und Tu/N=0.03 und betrug durchschnittlich Tu/N=2.9. Der Median der Expressionshöhen von *LIV-1* lagen bei $\text{Expression}_{LIV-1/GAPDH}=0.49$ im Tumorgewebe und $\text{Expression}_{LIV-1/GAPDH}=0.64$ im Normalgewebe. Die Expression von *LIV-1* in den drei verwendeten Normalgeweben war relativ heterogen ($\text{Expression}_{LIV-1/GAPDH}=0.12, 1.21$ und 1.62). Im Tumorgewebe lagen die Expressionshöhen von *LIV-1* zwischen $\text{Expression}_{LIV-1/GAPDH}=0.02$ und $\text{Expression}_{LIV-1/GAPDH}=8.34$. Durch die quantitative RT-PCR konnte demnach die Überexpression von *LIV-1* mRNA in Brusttumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe bestätigt werden.

3.1.2.2 Brustzelllinien

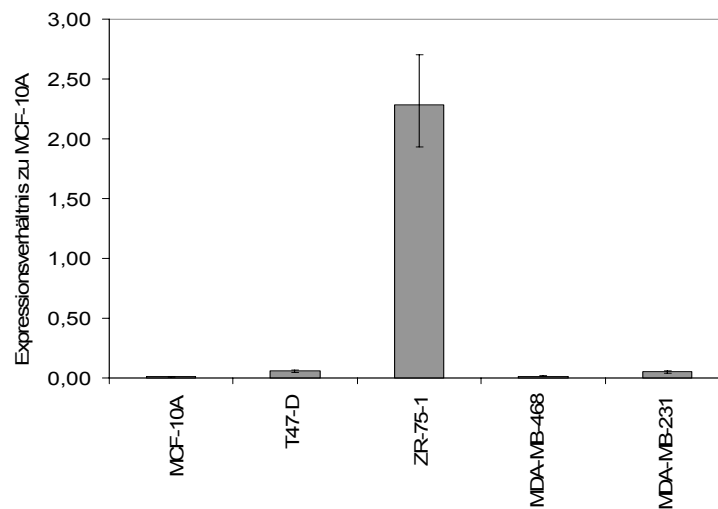


Abb. 10: *LIV-1 mRNA Expression in Brustzelllinien*. Die Expression von *LIV-1* in 4 Brusttumorzelllinien wurde mittels quantitativer RT-PCR ermittelt und auf die Brustnormalzelllinie MCF-10A bezogen. Die höchste Expression von *LIV-1* wurde in der östrogenabhängigen Tumorzelllinie ZR-75-1 beobachtet. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung gezeigt.

Fünf Brustzelllinien wurden hinsichtlich ihres Gehalts an *LIV-1* spezifischer mRNA analysiert. Die durch quantitative RT-PCR ermittelten Expressionshöhen wurden jeweils auf die Expressionshöhe in der Brustnormalzelllinie MCF-10A bezogen (Abb. 10). Bei einem Vergleich der Zelllinien untereinander weist die östrogenabhängigen Brusttumorzelllinie ZR-75-1 die höchsten Mengen an *LIV-1* Transkripten auf (ca. 2.5-fach höher als in MCF-10A). Hingegen lagen die *LIV-1* Expressionshöhen der östrogenunabhängigen Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-231 als auch die der ÖR positiven Zelllinie T-47D bezogen auf die Expression in MCF-10A in einem Bereich zwischen 0.014-fach bis 0.20-fach. Der Median der Expression lag in den Brusttumorzelllinien bei $Expression_{LIV-1/GAPDH} = 0.07$. Das heißt, *LIV-1* mRNA ist in Tumorzelllinien durchschnittlich weniger vorhanden als in mikrodissertiertem Brustgewebe (siehe Abschnitt 3.1.2.1). Die Ergebnisse stimmen somit mit denen aus Abschnitt 3.1.1.2 überein.

3.1.3 Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung

Die Ergebnisse der Abschnitte 3.1.1.1 und 3.1.2.1 sollten mittels *in situ* Hybridisierung (*ISH*) validiert und zusätzlich das *LIV-1* mRNA Expressionsmuster weitergehend durch Korrelation mit klinischen Markern untersucht werden. Dadurch sollten Charakteristika der Tumorgruppe mit hoher *LIV-1* Expression identifiziert werden, um Rückschlüsse auf die Patientengruppe ziehen zu können, die für eine potentielle *LIV-1* spezifische Therapie in Frage kommen würde.

3.1.3.1 Patientencharakteristik

Tab. 4: Patientencharakteristik.

| Parameter | Unterteilung | Anzahl | Prozent [%] |
|---------------------|-------------------|--------|-------------|
| Alter | <50 | 30 | 27 |
| | >=50 | 79 | 71,2 |
| | keine Information | 2 | 1,8 |
| histol. Typ | IDC | 73 | 65,8 |
| | ILC | 15 | 13,5 |
| | DCIS | 5 | 4,5 |
| | andere | 17 | 15,3 |
| | keine Information | 1 | 0,9 |
| TumorgroÙe | T ₁ | 28 | 25,2 |
| | T ₂ | 45 | 40,5 |
| | T ₃ | 12 | 10,8 |
| | T ₄ | 14 | 12,6 |
| | keine Information | 12 | 10,8 |
| histol. Grad | 1 | 3 | 2,7 |
| | 2 | 37 | 33,3 |
| | 3 | 66 | 59,5 |
| | keine Information | 5 | 4,5 |
| LNK-Status | N ₀ | 31 | 27,9 |
| | N ₁ | 50 | 45 |
| | N ₂ | 15 | 13,5 |
| | keine Information | 15 | 13,5 |
| Metastasen | ja | 81 | 73 |
| | nein | 8 | 7,2 |
| | keine Information | 22 | 19,8 |
| ÖR-Status | negativ | 34 | 30,6 |
| | positiv | 76 | 68,5 |
| | keine Information | 1 | 0,9 |

histol. = histologischer

LNK=Lymphknoten

Für die *LIV-1* Expressionsanalyse wurde ein von vorigen Experimenten unabhängiges Kollektiv von 111 Brusttumorpatienten analysiert. Außerdem wurden Lymphknotenmetastasen von 21 Patienten und Tamoxifen resistente Tumorrezidive von 19 Patienten untersucht. Die verwendeten Gewebearrays sowie Patientendaten wurden freundlicher Weise von Dr. Arndt Hartmann (Universität Regensburg, Pathologie) zur Verfügung gestellt. Pro Array waren 60 Proben aufgebracht, wobei von den meisten Patienten zwei Proben des Normal- und zwei des Tumorgewebes vorhanden waren.

Die Brusttumore unterteilten sich wie folgt: 66% IDC, 14% ILC und 5% DCIS. Die restlichen 15% der Tumore gehörten zu den medullären, muzinösen, papillären, kribiformen oder szirrhösen Karzinomen oder es war keine nähere Klassifizierung bekannt. Weitere klinische und pathologische Parameter sind in Tab. 4 angegeben. Der Median des Patientenalters betrug 59 Jahre (von 26 bis 83 Jahre). Der Median der Länge der Nachbeobachtung betrug 74 Monate (von 13 bis 140 Monate).

3.1.3.2 Gewebeproben

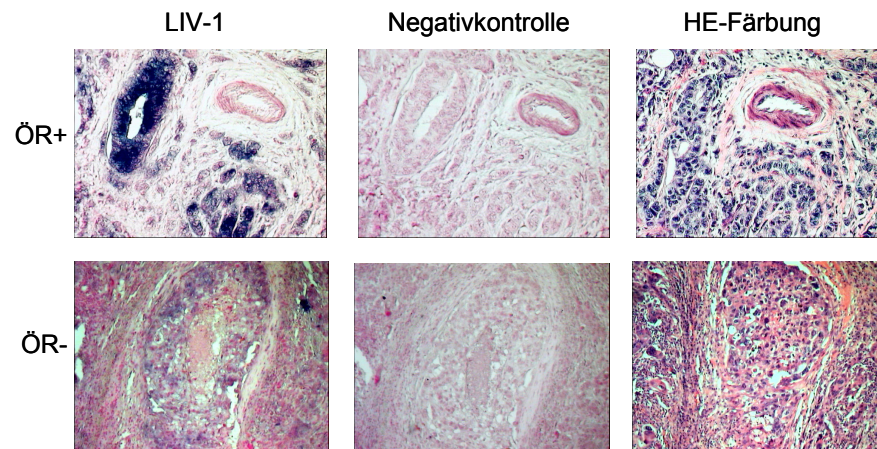


Abb. 11: *LIV-1* mRNA Expression in Tumoren mit und ohne Östrogenrezeptor- α (ÖR). Gezeigt sind zwei typische Beispiele für die *ISH* mit einer *LIV-1* spezifischen „antisense“ Sonde („*LIV-1*“) und der dazugehörigen „sense“-Sonde („Negativkontrolle“) an einem ÖR negativen und einem ÖR positiven Brusttumor. ÖR positive Tumore zeigen eine höhere *LIV-1* Expression als ÖR negative. Zur Verdeutlichung der Gewebestrukturen ist die Hämatoxilin / Eosin („HE-Färbung“) Färbung gezeigt. Für die Färbungen wurden jeweils Folgeschnitte verwendet.

Die *LIV-1* mRNA Expressionshöhen in der *in situ* Hybridisierung (*ISH*) wurden mittels einer *LIV-1* spezifischen „antisense“ Sonde und eines Quantifizierungssystems bestimmt, welches die Intensität der Färbung zwischen 0 FI (nicht exprimiert) und 8 FI (sehr stark exprimiert) angibt ([Allred *et al.*, 1998] sowie Erläuterungen im Abschnitt 2.14). In Karzinomzellen war zum Teil eine sehr starke *LIV-1* Expression zu beobachten (Färbung zwischen 0 FI bis zu 8 FI). In Epithelzellen des Normalgewebes hingegen zeigte sich im Allgemeinen eine schwächere Expression, die, wie bereits in Abschnitt 3.1.2.1 beschrieben, in ihrer Höhe patientenabhängig variierte (Färbung zwischen 0 FI und 4.5 FI). Ungefähr ein Viertel der Normalproben zeigten eine leichte *LIV-1* spezifische Färbung im stromalen Anteil der Gewebe (zwischen 1 FI und 3 FI). Es wurde keine *LIV-1* Expression in Endothelzellen detektiert. Die folgenden Auswertungen beziehen sich ausschließlich auf die Expression von *LIV-1* in Karzinomzellen bzw. Epithelzellen des Normalgewebes.

Zum direkten Vergleich von Tumor- und Normalgewebe eines Patienten, waren 80 Probenpärchen auswertbar. Bei den restlichen Proben waren entweder keine Gewebe auf dem Objektträger (z.B. durch Ablösen während der Färbung) oder keine Epithelzellen in der Probe vorhanden. *LIV-1* war in 54% der Tumore (43/80) höher (d.h. $Tu/N \geq 2$) und in 5% (4/80) niedriger (d.h. $Tu/N \leq 0.5$) exprimiert verglichen mit dem jeweiligen Normalgewebe desselben Patienten. Auch die durchschnittlich detektierte *LIV-1* mRNA Menge war im Tumor signifikant höher als im Normalgewebe ($\bar{\sigma}Tumor=2.43$ FI, $\bar{\sigma}Normal=0.29$ FI, $p < 0.001$). Es wurde keine statistisch signifikante Änderung der *LIV-1* Expressionshöhe in 21 analysierten Lymphknotenmetastasen gegenüber Primärtumoren errechnet. Die *ISH* bestätigt demnach die Überexpression der *LIV-1* mRNA in Tumor- verglichen mit Normalgewebe der Brust.

3.1.3.3 Korrelation mit klinischen Markern

Tab. 5: Korrelationen der *LIV-1* mRNA Expression mit verschiedenen klinischen Parametern.

| Parameter | Expressionswerte der <i>in situ</i> Hybridisierung | | |
|---------------------|--|--------|--------------|
| | Mittelwert | Median | p-Wert‡ |
| Alter | | | |
| <50 | 1,9 | 1,0 | 0,209 |
| >=50 | 2,6 | 2,5 | |
| histol. Typ | | | |
| IDC | 2,7 | 2,5 | 0,027 |
| ILC | 1,1 | 0,5 | |
| TumorgroÙe | | | |
| T ₁ | 2,9 | 2,5 | 0,637 |
| T ₂ | 2,4 | 1,0 | |
| T ₃ | 2,2 | 1,5 | |
| T ₄ | 2,4 | 2,5 | |
| histol. Grad | | | |
| 1 | 3,7 | 2,5 | 0,620 |
| 2 | 2,4 | 2,5 | |
| 3 | 2,4 | 2,3 | |
| LNK-Status | | | |
| N ₀ | 2,8 | 3,0 | 0,215 |
| N ₁ | 1,9 | 1,0 | |
| N ₂ | 3,1 | 3,0 | |
| Metastasen | | | |
| nein | 2,6 | 2,5 | 0,107 |
| ja | 1,0 | 0,0 | |
| ÖR-Status | | | |
| negativ | 1,4 | 0,3 | 0,010 |
| positiv | 2,9 | 1,0 | |

‡ p-Wert ermittelt durch Kruskal-Wallis Test

histol.=histologisch

LNK=Lymphknoten

Um das Expressionsmuster von *LIV-1* weiter zu charakterisieren, wurden die mittels der *ISH* ermittelten mRNA Expressionshöhen hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit bestimmten Tumoruntergruppen analysiert (Tab. 5). Dafür wurden Tests für nicht parametrische, unverbundene Stichproben verwendet.

Dadurch wurde die bereits publizierte Korrelation von hoher *LIV-1* Expression mit ÖR positiven Tumoren bestätigt ($p=0.01$). Außerdem war *LIV-1* in IDCs signifikant höher exprimiert als in ILCs ($p=0.027$). Es wurde jedoch keine Assoziation von *LIV-1* mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen festgestellt. Auch wenn nur Tumore mit positivem ÖR betrachtet wurden und diese in weitere Untergruppen entsprechend der TumorgroÙe (≤ 2 cm oder > 2 cm) oder dem Grad der Krankheit (Grad 2 oder 3) unterteilt wurden, zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen *LIV-1* Expression und dem Lymphknotenstatus. Weiterhin besteht kein Zusammenhang zwischen *LIV-1* Expressionshöhen und dem Alter der Patienten, dem Vorhandensein entfernter Metastasen, der TumorgroÙe oder dem Grad bzw. Stadium der Krankheit.

3.1.3.4 Tamoxifen resistenten Rezidive

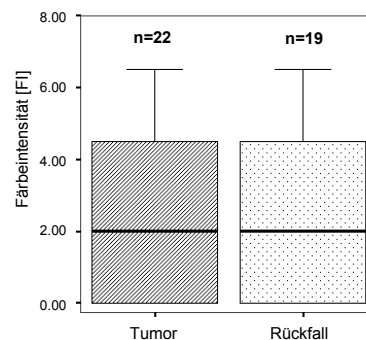


Abb. 12: *LIV-1 mRNA Expression in Tamoxifen resistenten Rezidiven und Primärtumoren.* Gezeigt ist die Verteilung der *LIV-1* spezifischen ISH-Färbung. Es ist keine Veränderung der *LIV-1* Expression in Tumorrezidiven, die unter einer Tamoxifenbehandlung auftraten und primären Brusttumoren zu erkennen.

Tamoxifen, welches als Agonist, aber auch schwacher Antagonist, des ÖRs wirkt, wird derzeit als adjuvante Standardtherapie für ÖR positive Mammakarzinome verwendet. Die *LIV-1* mRNA Expressionshöhe wurde in 19 Rezidiven, d.h. in wiederkehrenden Tumoren nach einer chirurgischen Entfernung des Primärtumors, mittels ISH untersucht. Diese Rezidive waren während einer Therapie mit Tamoxifen aufgetreten. Da keine zugehörigen Primärtumore der gleichen Patienten vorhanden waren, wurden als Vergleich 22 Primärtumore, die im gleichen Zeitraum in der gleichen Klinik für eine Tamoxifentherapie ausgewählt wurden, verwendet. Es war keine statistisch signifikante Veränderung der *LIV-1* Expression in Tamoxifen resistenten Rezidiven zu verzeichnen (durchschnittliche Färbeintensitäten: $\bar{\phi}$ Primärtumor=2.13 FI, $\bar{\phi}$ Rezidiv=2.31 FI, Abb. 12).

3.2 *LIV-1* mRNA Expression in Normalgeweben

Die Expression von *LIV-1* mRNA wurde mittels quantitativer RT-PCR in 26 Normalgeweben aus verschiedenen Organen analysiert. In der Reaktion wurden cDNAs eingesetzt, die aus einem Set kommerziell erhältlicher mRNAs (Clontech, CA) synthetisiert wurden (Abb. 13). Die höchsten Konzentrationen an *LIV-1* wurden in hormonabhängigen Geweben, wie z.B. Brust, Prostata und Plazenta detektiert, wobei eine maximale Expression im Brustgewebe zu finden war. In Herz, Skelettmuskel und Thymus hingegen war *LIV-1* nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Die *LIV-1* Expressionshöhen in den Organen bezogen auf die *GAPDH* Expression lagen im Bereich zwischen $\text{Expression}_{\text{Skelettmuskel}}=0.002$ und $\text{Expression}_{\text{Brust}}=0.96$.

LIV-1 zeigt höchste mRNA Expressionswerte in hormonabhängigen Organen, ist aber in allen 25 analysierten humanen Normalgeweben niedriger exprimiert als im Brustnormalgewebe.

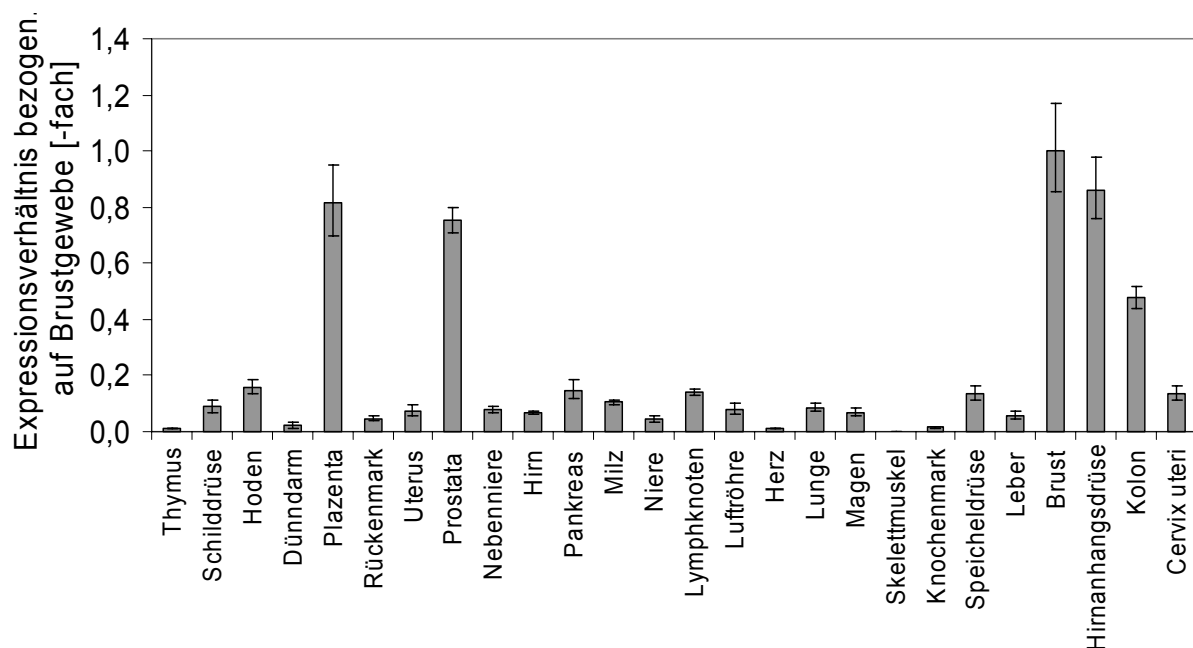


Abb. 13: *LIV-1 mRNA Expression in verschiedenen humanen Normalgeweben.* Die *LIV-1* Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR an cDNAs von 26 verschiedenen Normalgeweben bestimmt. Gezeigt sind die Expressionshöhen bezogen auf Brustnormalgewebe. Die höchsten Expressionswerte von *LIV-1* werden in hormonabhängigen Geweben wie Brust, Plazenta und Prostata beobachtet.

3.3 Klonierung der *LIV-1* cDNA

Um *LIV-1* in späteren Experimenten rekombinant herstellen zu können, sollte die entsprechende cDNA in einen humanen Expressionsvektor eingebracht werden. Die cDNA wurde aus isolierter mRNA der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 durch RT-PCR hergestellt. Der kodierende Bereich einschließlich des natürlichen Stopkodons wurde mittels PCR amplifiziert und in den pcDNA3.1V5HisTOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert.

3.3.1 Vergleich mit publizierten Sequenzen

Die resultierende cDNA Sequenz hatte im Vergleich zur genomischen Sequenz keine Basenaustausche, welche zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen (Sequenzdaten von „UCSC Genome browser“: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, Stand: Juli 2003, Bereich auf Chromosom 18: 31941185-31961192). Ein Vergleich mit exprimierten Sequenzabschnitten („ESTs“), die diese Region überspannen, zeigte, dass der bisher publizierten *LIV-1* cDNA Sequenz (NM_012319.2) zwischen Nukleotid 514 und 515 18 Basenpaare fehlen (Abb. 14). Da an den Übergangsstellen zu der ursprünglichen Sequenz keine konservierten Spleißstellen vorhanden sind, resultieren diese zusätzlichen Nukleotide wahrscheinlich nicht aus einem alternativen Spleißereignis.

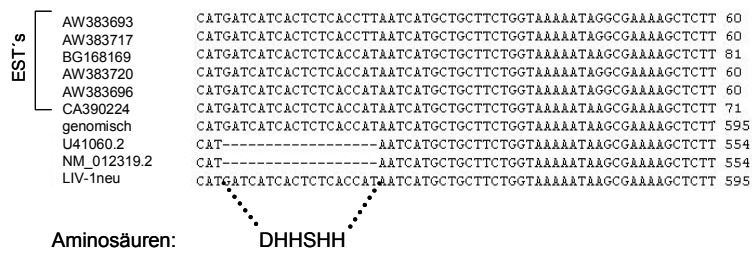


Abb. 14: Überarbeitete LIV-1 cDNA Sequenz. Gezeigt ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleiches der in dieser Arbeit klonierten LIV-1 cDNA („LIV-1neu“) mit exprimierten Sequenzabschnitten („EST's“) und der genomischen Sequenz dieser Region. Der bisher publizierte LIV-1 Sequenz (U41060.2 bzw. NM_012319.2) fehlen an Position 514 18 Nucleotide, was in einem Verlust der Aminosäuren DHHSHH auf Proteinebene resultiert.

Die 18 neu gefundenen Nucleotide führen auf Proteinebene zu dem Vorhandensein von 6 zusätzlichen Aminosäuren (DHHSHH) zwischen Aminosäure 126 (H) und 127 (N) der ursprünglich publizierten Sequenz (NP_036451). Diese Aminosäuren liegen in einer histidinreichen Region, die sich durch die Wiederholung des Motivs H(H/S)(D/H)H(E/D/N)(H/R) auszeichnet. Das Motiv ist somit in 7-facher anstelle von 6-facher Wiederholung vorhanden und könnte bedeutend für die Funktion von LIV-1 als putativer Zinktransporter sein. Es wurde gezeigt, dass ähnliche Motive für die Zinkbindung verantwortlich sind [Murgia *et al.*, 1999].

In der vorliegenden Arbeit wird somit eine überarbeitete cDNA Sequenz von LIV-1 beschrieben, die mit „EST's“ der entsprechenden Region sowie der genomischen Sequenz übereinstimmt.

3.3.2 Überprüfung des Expressionsplasmides

Das erstellte Expressionsplasmid LIV-1STOP/pcDNA3.1V5His sollte auf die Expression des LIV-1 Proteins getestet werden. Dafür wurde eine *in vitro* Transkription / Translation in Retikulozytenlysaten durchgeführt. Das so hergestellte Protein war durch den Einbau von ³⁵S radioaktiv markiert und wurde nach einer Auftrennung in einer SDS-PAGE mittels Autoradiogramm detektiert (Abb. 17). Eine spezifische Bande bei ca. 85 kDa, welche dem vorhergesagten Molekulargewicht von LIV-1 entspricht (Vorhersageprogramm: DNA-Star) zeigt, dass rekombinantes LIV-1 mit diesem Plasmid exprimiert werden kann.

3.4 Validierung eines LIV-1 spezifischen Antikörpers

Um LIV-1 Protein immunologisch detektieren zu können, sollte ein polyklonaler Antikörper in Kaninchen hergestellt werden. Für eine Immunisierung wurde ein LIV-1 spezifisches Peptid (liva) aus dem N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz (Aminosäuren 146-161) verwendet. Das Antiserum wurde über eine Affinitätsäule aufgereinigt, an welche das Peptid liva gekoppelt war. Diese Arbeiten wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) in Zusammenarbeit mit der Abteilung „Proteinchemie“ der metaGen Pharmaceuticals GmbH durchgeführt. Im Folgenden sollte die Spezifität dieses polyklonalen Antikörpers LIV-1a geprüft werden.

3.4.1 Testung in Western Blot Analysen und in der Immunzytochemie

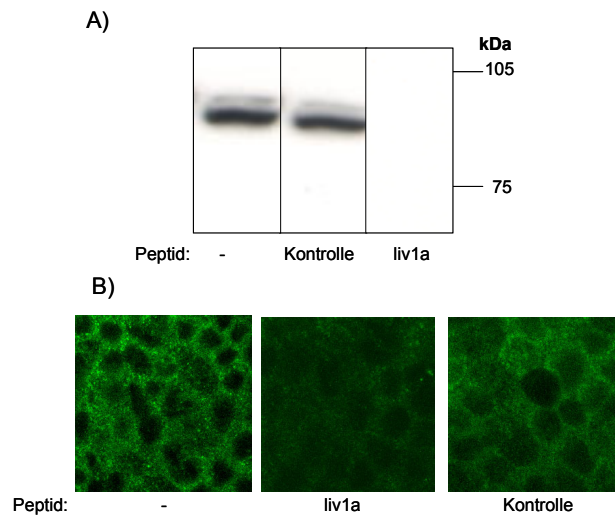


Abb. 15: *Kompetition des LIV-1a Antikörpers mit dem Peptid liv1a*. Die Signale des Antikörpers LIV-1a (hergestellt durch Immunisierung mit Peptid liv1a) wurden mit und ohne Vorinkubation mit liv1a an ZR-75-1 Zellen analysiert. A) Western Blot Analyse von Gesamtzelllysät und B) Immunzytochemie an fixierten, permeabilisierten Zellen. Bei beiden Methoden ist eine Abnahme der Signalintensitäten nach einer Inkubation mit dem Peptid liv1a, aber nicht nach Inkubation mit dem zufällig ausgewählten Kontrollpeptid („Kontrolle“) zu erkennen. Die im Western Blot detektierte Hauptbande bei ca. 85kDa entspricht dem Molekulargewicht von LIV-1. Das Peptid liv1a wurde zur Kompetition in 30-fachem molarem Überschuss eingesetzt.

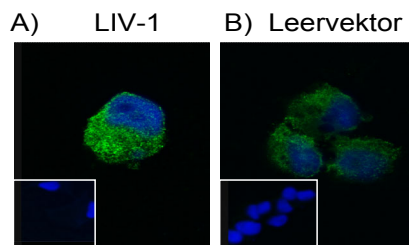


Abb. 16: *Detektion von überexprimiertem LIV-1 Protein*. ZR-75-1 Zellen wurden mit A) einem Expressionsplasmid für LIV-1 und B) dem Leervektor transfiziert und einer Immunzytochemie mit LIV-1a als primären Antikörper unterzogen. Der sekundäre Antikörper war fluoreszenzmarkiert. Eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals in A gegenüber dem Signal für endogenes LIV-1 in B deutet auf eine spezifische LIV-1 Erkennung hin. Negativkontrollen, die mit Präimmenserum anstelle des LIV-1a Antikörpers behandelt wurden, sind jeweils links unten im Bild gezeigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegen gefärbt. Originalvergrößerung: 630x.

In Western Blot Analysen von Lysaten der Brusttumorzelllinie ZR-75-1 detektierte der Antikörper LIV-1a eine Hauptbande von ca. 85 kDa, welche mit dem vorhergesagtem Molekulargewicht von LIV-1 überein stimmt (Vorhersageprogramm: DNA-Star, Abb. 15A). Außerdem wurde eine schwächere Bande bei ca. 90-95 kDa detektiert, welche der glykosilierten Form des Proteins entsprechen könnte (siehe Abschnitt 3.4.2). Beide Banden waren nicht mehr erkennbar, wenn der LIV-1a Antikörper mit dem Peptid liva vorinkubiert wurde. Das zufällig ausgewählte Kontrollpeptid („Kontrolle“) hingegen änderte das Bandenmuster von LIV-1a nicht (Abb. 15A).

Entsprechende Ergebnisse wurden in immunzytochemischen Experimenten an ZR-75-1 Zellen

erzielt (Abb. 15B). Eine Färbung mit dem LIV-1a Antikörper sowie Visualisierung durch einen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper resultierte in einem LIV-1 spezifischen Signal. Durch eine vorherige Inkubation des Antikörpers mit dem Peptid liv1 konnte dieses Signal deutlich abgeschwächt werden. Eine Inkubation mit dem Kontrollpeptid („Kontrolle“) hingegen hatte keinen Einfluss auf die Detektion durch den Antikörper LIV-1a.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Überexpression von LIV-1 durch LIV-1a detektiert werden kann. Dazu wurden ZR-75-1 Zellen transient mit dem Expressionsplasmid LIV-1STOP/pcDNA3.1V5His bzw. mit dem Leervektor pcDNA3.1V5His transfiziert und mittels Immunzytochemie analysiert (Abb. 16). Die LIV-1 überexprimierenden Zellen zeigten eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals verglichen mit Zellen, die nur mit dem Leervektor transfiziert wurden. Letztere wurden im Vergleich zur Negativkontrolle, in der Präimmunsereum anstelle des ersten Antikörpers verwendet wurde, schwach angefärbt. Dies ist auf die endogene Expression von LIV-1 in ZR-75-1 Zellen zurückzuführen (siehe Abschnitt 3.6.2).

Damit wurde gezeigt, dass der Antikörper LIV-1a endogenes und überexprimiertes LIV-1 Protein spezifisch detektiert und sowohl in Western Blot Analysen als auch für die Immunzytochemie verwendet werden kann.

3.4.2 Testung in der Immunpräzipitation

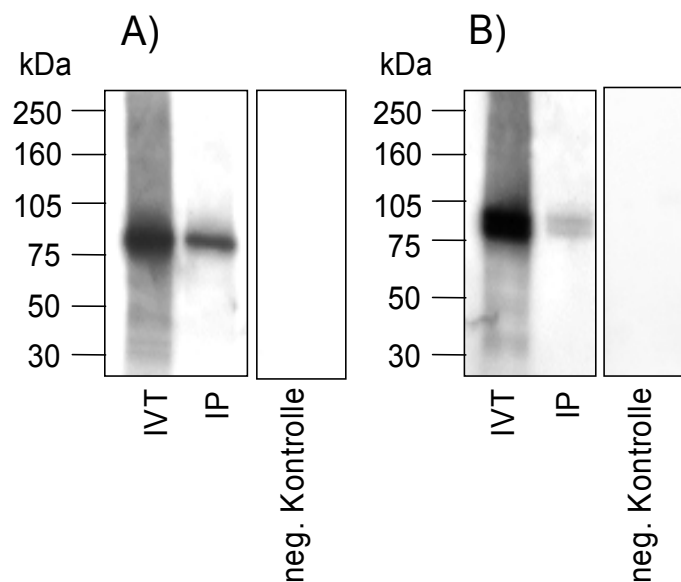


Abb. 17: Immunpräzipitation von rekombinant hergestelltem LIV-1 Protein. LIV-1 wurde mittels *in vitro* Transkription / Translation (IVT) hergestellt und das ³⁵S-Methionin markierte Protein wurde nach der Auftrennung in einer SDS-PAGE durch Autoradiographie detektiert. A) IVT ohne Mikrosomen B) IVT mit Mikrosomen. „IVT“: Überstand der IVT; „IP“: Überstand der Immunpräzipitation mit dem Antikörper LIV-1a; neg. Kontrolle: Überstand der Immunpräzipitation mit Präimmunsereum anstelle des Antikörpers LIV-1a. Die Ergebnisse zeigen, dass der Antikörper LIV-1a auch in der Immunpräzipitation das Protein LIV-1 erkennt.

Außerdem sollte getestet werden, ob der Antikörper LIV-1a auch für eine Immunpräzipitation geeignet ist. Dafür wurde eine *in vitro* Transkription/Translation von dem Expressionsplasmid LIV-1STOP/pcDNA3.1V5His mit anschließender Immunpräzipitation durchgeführt (Abb. 17). Eine Expression in Abwesenheit von Mikrosomen resultierte in einer Bande von ca. 85 kDa. Hingegen führte die Verwendung von Mikrosomen, welche Enzymen des endoplasmatischen Retikulums enthalten und somit posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung ermöglichen, zu einer zusätzlichen Bande bei 90-95 kDa. Diese Bande wurde bereits in Western Blot Experimenten von Zellysaten beobachtet (siehe Abschnitt 3.4.1).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Antikörper LIV-1a natives LIV-1 in der Immunpräzipitation spezifisch erkennt und dass die Bande mit höherem Molekulargewicht das posttranslational veränderte, wahrscheinlich glykosylierte, LIV-1 darstellt.

3.4.3 Testung der Paraffingängigkeit

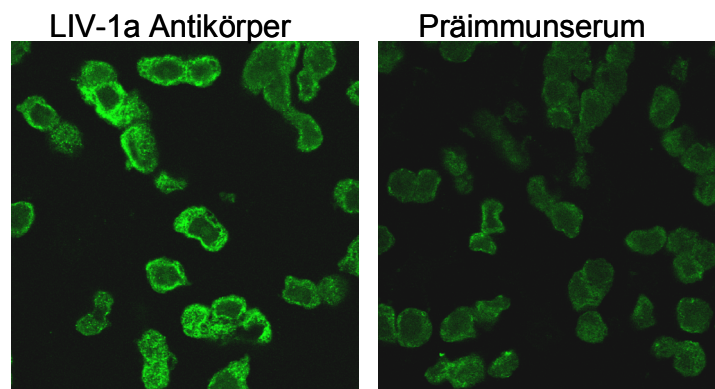


Abb. 18: *Detektion von LIV-1 in paraffineingebetteten Brusttumorzellen.* Paraffineingebettete T47-D Zellen wurden mittels Immunzytochemie angefärbt. Eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals bei Verwendung des LIV-1a Antikörpers im Vergleich zur Hintergrundfärbung des Präimmunserums zeigt die Paraffingängigkeit des LIV-1a Antikörpers hin. Ursprüngliche Vergrößerung: 400x.

Um die Paraffingängigkeit des Antikörpers LIV-1a zu überprüfen, wurde eine Immunfärbung von paraffineingebetteten T47-D Zellen durchgeführt. Ein stärkeres Fluoreszenzsignal von LIV-1a gefärbten Zellen verglichen mit der Negativkontrolle, welche mit Präimmunserum anstelle des ersten Antikörpers inkubiert wurde (Abb. 18), zeigt eine Detektion von LIV-1 in paraffineingebettetem Material.

Aus diesen Experimenten konnte geschlussfolgert werden, dass der hergestellte polyklonale Kaninchen-Antikörper LIV-1a das LIV-1 Protein sowohl in denaturierter Form im Western Blot, als auch in seiner nativen Form in der Immunzytochemie bzw. Immunpräzipitation erkennt und dass dieser Antikörper für eine Detektion von LIV-1 in paraffineingebetteten Materialien geeignet ist.

3.5 Untersuchung der subzelluläre Lokalisation von LIV-1

Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen ist entscheidend für die Wahl der *in vivo* Inhibitionsstrategie. So kann z. B. die Funktion von extra- aber nicht von intrazellulären Proteinen mit Antikörpern inhibiert werden. Deswegen wurde im Folgenden die Lokalisation von LIV-1 analysiert.

3.5.1 Computergestützte Vorhersagen

Das Programm PsortII (<http://psort.nibb.ac.jp>, [Horton & Nakai, 1997]), welches die subzelluläre Lokalisation von Proteinen vorhersagt, erkannte ein Signal für die Retention von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum im N-terminalen Bereich der LIV-1 Sequenz (Aminosäuren 2-5: ARKL). Dementsprechend wurde die Wahrscheinlichkeit einer Lokalisation von LIV-1 im endoplasmatischen Retikulum mit 56.5% angegeben, wohingegen die Wahrscheinlichkeit einer Plasmamembran Assoziation bei 30.4% lag. Diese *in silico* Vorhersage für die Lokalisation sollte experimentell überprüft werden.

3.5.2 Kolokalisation mit Markerproteinen

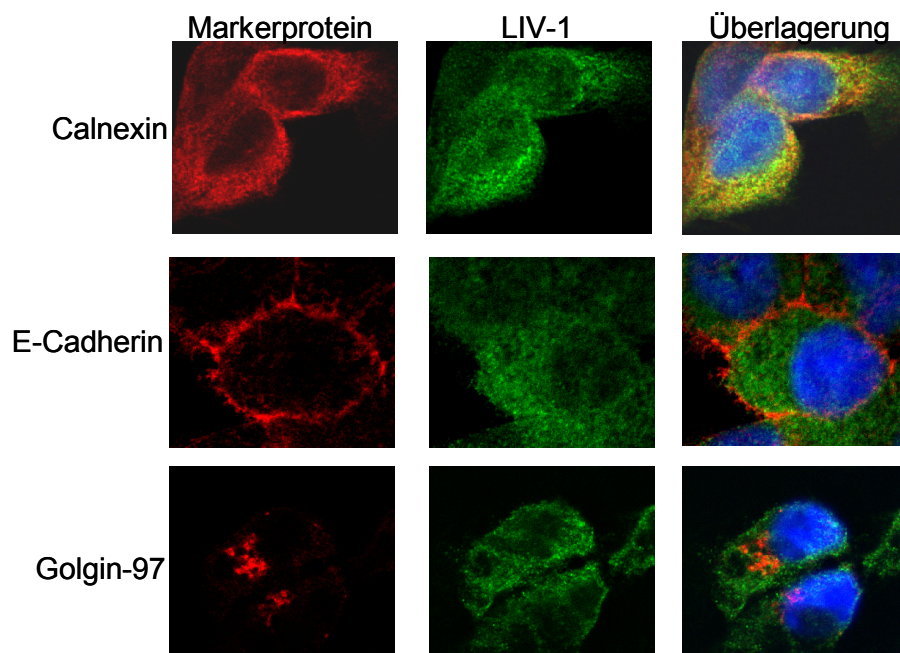


Abb. 19: Kolokalisation von LIV-1 mit Markerproteinen für verschiedene subzelluläre Kompartimente. Immunzytochemische Doppelfärbungen wurden an ZR-75-1 Zellen mit dem LIV-1a Antikörper (grün) und Antikörpern gegen Calnexin (Marker für das endoplasmatische Retikulum, rot), E-Cadherin (Marker für die Plasmamembran, rot) sowie Golgin-97 (Marker für den Golgiapparat, rot) durchgeführt. Eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale (gelb) zeigt, dass nur Calnexin mit LIV-1 kolokalisiert ist. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegen gefärbt (blau). Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie. Ursprüngliche Vergrößerung: 630x.

Zur experimentellen Bestimmung der Lokalisation von LIV-1 wurde eine immunzytochemische Anfärbung von ZR-75-1 Zellen mit dem LIV-1a Antikörper und gleichzeitig mit einem Antikörper gegen ein Markerprotein für ein subzelluläres Kompartiment durchgeführt. Die Expressionsmuster wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (Abb. 19). Calnexin, ein Protein des endoplasmatischen Retikulums, und LIV-1 zeigten eine deutliche Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Keine gemeinsame Lokalisation konnte für LIV-1 und E-Cadherin (Markerprotein für die Plasmamembran) sowie Golgin-97 (Markerprotein für den Golgiapparat) detektiert werden. Die Ergebnisse wurden in der Zelllinie MCF-7 bestätigt.

Diese Daten zeigen, dass endogenes LIV-1 in Brustzelllinien intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist.

3.6 LIV-1 Proteinexpression in Tumor- und Normalgewebe der Brust

Der Antikörper LIV-1a sollte für die Untersuchung des LIV-1 Proteinexpressionsmusters in Tumorgeweben und Zelllinien verwendet werden, um die auf mRNA Ebene beobachtete Assoziation von LIV-1 Expression mit Brusttumoren zu validieren.

3.6.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

111 Proben von Brusttumoren und entsprechenden Normalgeweben wurden mittels Immunhistochemie (IHC) untersucht. Die Patientengruppe sowie das Bewertungssystem entsprachen der in der ISH verwendeten (siehe Abschnitt 3.1.3 und Tab. 4). Alle Proben wurden zusätzlich einer Immunfärbung mit dem Antikörper gegen Zytokeratin als Positivkontrolle und einer Negativkontrolle (Präimmunsereum anstelle des ersten Antikörpers) unterzogen.

3.6.1.1 Gewebeproben

LIV-1 Protein wurde in Epithelzellen des Normalgewebes ($\sigma_{\text{normal}}=5.9$ FI) sowie in Karzinomzellen ($\sigma_{\text{Tumor}}=5.5$ FI) detektiert. Außerdem wurde in fast der Hälfte der Gewebeschnitte, in denen Blutgefäße vorhanden waren, eine LIV-1 Expression in Endothelzellen beobachtet. Die Expression von LIV-1 in Endothelzellen war etwas niedriger als in Epithelzellen ($\sigma_{\text{Endothel}}=4.3$ FI). Es war kein Unterschied in der LIV-1 Expression in den Endothelzellen von Tumor- und Normalgewebe zu erkennen. In ca. 30% der Gewebe war ebenfalls eine stromale Expression von LIV-1 zu verzeichnen, welche aber wesentlich niedriger als in Epithel- bzw. Karzinomzellen war (Intensitäten bis maximal 4 FI). In den folgenden Analysen wird nur die Expression von LIV-1 in Epithel- bzw. Karzinomzellen betrachtet.

Es zeigte sich eine relativ starke Expression des LIV-1 Proteins im Normalgewebe. Dementsprechend war LIV-1 in den 82 auswertbaren Paaren von Tumor- und Normalgewebe nur

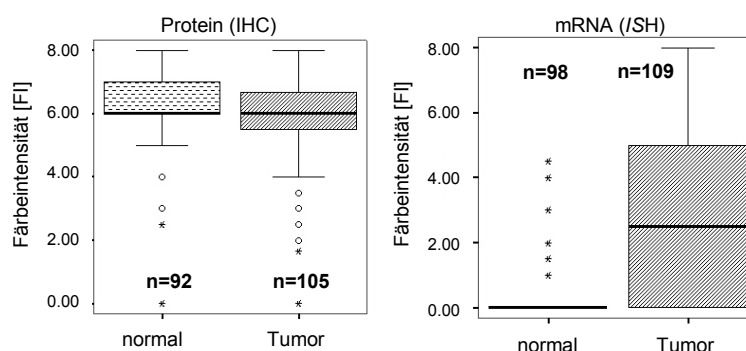


Abb. 20: Zusammenhang zwischen LIV-1 Protein- und mRNA-Expressionshöhen. Gezeigt ist die Verteilung der LIV-1 spezifischen Färbeintensitäten in der Immunhistochemie (IHC) und *in situ* Hybridisierung (ISH). Es ist keine Korrelation der Menge an vorhandenem LIV-1 Protein und mRNA zu erkennen.

in 28% der Fälle (23/82) im Tumor überexprimiert, hingegen in 41% (34/82) unterexprimiert. Die durchschnittliche LIV-1 spezifischen Färbeintensitäten waren in den Normalgeweben tendenziell höher als die der Tumorgewebe ($\bar{\sigma}_{\text{normal}}=5.9$ FI, $\bar{\sigma}_{\text{Tumor}}=5.5$ FI, $p=0.083$).

Diese offensichtliche Abweichung der Expressionshöhen von Protein- und mRNA wurde statistisch analysiert. Ein Pearstest für abhängige Messgrößen, zeigte, dass die Höhe der Proteinexpression sowohl im Normalgewebe ($p=0.761$) als auch im Tumorgewebe ($p=0.135$) nicht mit der entsprechenden mRNA-Expressionshöhe korreliert (Abb. 20). Dieses Ergebnis deutet auf das Vorhandensein von posttranskriptionalen Regulationsmechanismen von LIV-1 hin.

Es war kein Unterschied zwischen der LIV-1 Expression in 21 untersuchten Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu der in Primärtumoren zu erkennen ($p=0.936$).

3.6.1.2 Korrelation mit klinischen Markern

Um das Expressionsmuster von LIV-1 weiter zu charakterisieren, wurden die jeweiligen Expressionshöhen des Proteins in den Karzinomzellen mit verschiedenen Parametern korreliert, die zur Charakterisierung von Tumoren und damit zur Erstellung einer Prognose bzw. zur Auswahl von Therapieansätzen benutzt werden. Für diesen Zweck wurden Tests für nicht-parametrische, unverbundene Stichproben verwendet.

Die für die mRNA-Expression beschriebene starke Assoziation von *LIV-1* mit dem ÖR (siehe Abschnitt 3.1.1.1 und 3.1.3.3) konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden ($p=0.714$). Ebenfalls wurde kein Unterschied in der Expressionshöhe von LIV-1 Protein in IDCs gegenüber ILCs beobachtet ($p=0.160$). Interessanter Weise korrelierte die Höhe der LIV-1 Proteinexpression umgekehrt mit dem Grad des Tumors ($p=0.018$) bzw. der Tumorgroße ($p=0.002$). Wenn die Expressionshöhe von LIV-1 in Brusttumoren mit der in Brustnormalgeweben verglichen wurde, zeigte sich eine statistisch

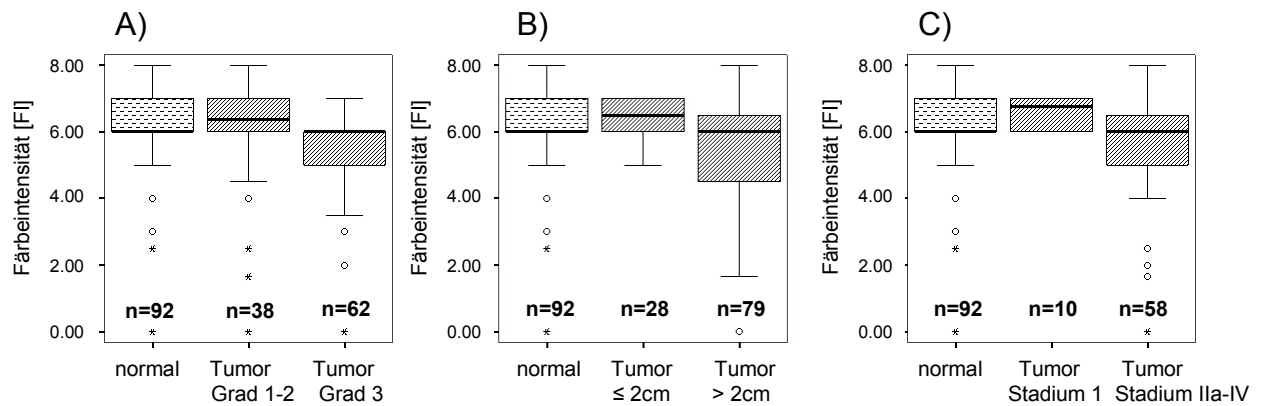


Abb. 21: *Differentielle LIV-1 Proteinexpression in Brusttumoren mit verschiedenem Grad, Größe und Stadium.* Gezeigt ist die Verteilung der LIV-1 Expressionshöhen, die mittels IHC bestimmt wurden, im Brustnormalgewebe sowie in verschiedenen Brusttumorgruppen. A) LIV-1 ist in Tumoren mit Grad 3 unterexprimiert (p=0.004) B) LIV-1 ist in Tumoren >2 cm unterexprimiert (p=0.002). C) LIV-1 ist in Tumoren mit einem Stadium von ≥ IIa unterexprimiert (p=0.031). Eine hohe LIV-1 Proteinexpression ist demnach mit weniger aggressiven Tumoren assoziiert.

Tab. 6: *Korrelation der LIV-1 Proteinexpression mit verschiedenen klinischen Markern*

| Parameter | Expressionswerte der Immunhistochemie | | |
|---------------------|---------------------------------------|--------|--------------|
| | Mittelwert | Median | p-Wert‡ |
| Alter | | | |
| <50 | 6,0 | 6,0 | 0,075 |
| ≥50 | 5,1 | 6,0 | |
| histol. Typ | | | |
| IDC | 5,6 | 6,0 | 0,163 |
| ILC | 5,1 | 6,0 | |
| Tumorgroße | | | |
| T ₁ | 6,5 | 6,5 | 0,002 |
| T ₂ | 5,3 | 6,0 | |
| T ₃ | 5,1 | 6,0 | |
| T ₄ | 4,7 | 6,0 | |
| histol. Grad | | | |
| 1 | 6,8 | 7,0 | 0,018 |
| 2 | 5,8 | 6,0 | |
| 3 | 5,4 | 6,0 | |
| LNK-Status | | | |
| N ₀ | 5,5 | 6,0 | 0,949 |
| N ₁ | 5,5 | 6,0 | |
| N ₂ | 5,6 | 6,0 | |
| Metastasen | | | |
| nein | 5,5 | 6,0 | 0,384 |
| ja | 4,7 | 5,3 | |
| ÖR-Status | | | |
| negativ | 5,9 | 6,0 | 0,714 |
| positiv | 5,5 | 6,0 | |

‡ p-Wert ermittelt durch Kruskal-Wallis Test
 histol.=histologisch
 LNK=Lymphknoten

signifikante Unterexpression von LIV-1 in Tumoren mit einem Grad 3 ($p=0.004$), in Tumoren die größer als 2 cm waren ($p=0.003$) oder ein TNM-Stadium von IIa und höher hatten ($p=0.031$) (Abb. 21, zur TNM-Klassifikation siehe Abschnitt 1.2.5). LIV-1 Expression korreliert weder mit dem Alter der Patienten, dem Lymphknotenstatus noch dem Vorhandensein von entfernten Metastasen.

Die Ergebnisse der statistischen Tests sind in Tab. 6 zusammengefasst und deuten an, dass niedrige LIV-1 Expression mit aggressiven Tumoren assoziiert ist.

3.6.1.3 Expression in Tamoxifen resistenten Rezidiven

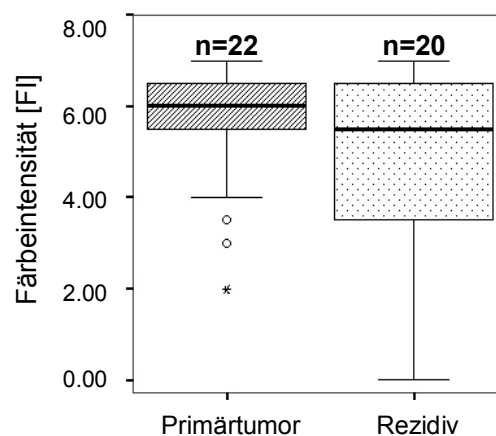


Abb. 22: LIV-1 Proteinexpression in Tamoxifen resistenten Rezidiven. Dargestellt ist die Verteilung der LIV-1 Färbeintensitäten, die in der IHC ermittelt wurden. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der LIV-1 Expression in Primärtumoren und Rezidiven, die während einer Tamoxifenbehandlung entstanden sind ($p=0.186$).

Wie bereits beschrieben wird Tamoxifen als anti-hormonale Therapie gegen Mammakarzinome eingesetzt. In dieser Arbeit wurden 20 Tumorproben von Patienten mit Tamoxifen resistenten Tumorrezidiven hinsichtlich der LIV-1 Expression untersucht. Da zu den Rezidiven keine Primärtumore des gleichen Patienten erhältlich waren, wurden die Expressionshöhen mit Primärtumoren ($n=22$) verglichen, die in dem gleichen Zeitraum von der gleichen Klinik für eine Tamoxifenbehandlung ausgewählt wurden (Abb. 22). Es war kein signifikanter Unterschied der LIV-1 Proteinexpressionshöhe in Tamoxifen resistenten Rezidiven im Vergleich zu der in den Primärtumoren zu beobachten ($p=0.186$, durchschnittliche Färbeintensitäten: \bar{o} Primärtumor=5.7 FI, \bar{o} Rezidiv=5.0 FI)

Diese Resultate, wie auch die mRNA Daten aus Abschnitt 3.1.3.4, legen nahe, dass die Expression von LIV-1 durch eine Langzeitbehandlung mit Tamoxifen nicht verändert wird.

3.6.2 Western Blot Analyse von Zelllysaten

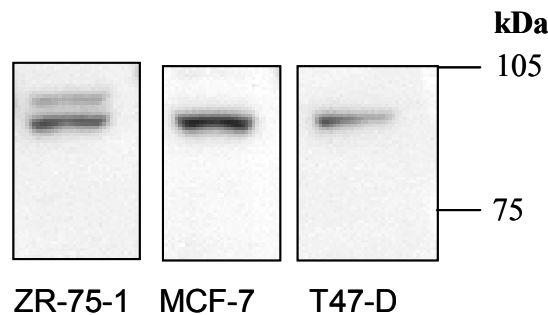


Abb. 23: *LIV-1* Proteinexpression in 3 Brustkrebszelllinien. 5 µg Gesamtzelllysat der ÖR positiven Zelllinien ZR-75-1, MCF-7 und T47-D wurden mittels Western Blot analysiert. Die *LIV-1* Expression war in allen 3 Zelllinien ähnlich hoch, wobei ZR-75-1 eine Doppelbande bei 85 und 90-95 kDa aufwies.

Die Western Blot Analysen von Gesamtzelllysate dreier ÖR positiver Brustzelllinien zeigten, dass *LIV-1* Protein in diesen Zelllinien in ähnlich hohen Mengen exprimiert wurde (Abb. 23). Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit den gezeigten heterogenen mRNA Expressionshöhen (siehe Abschnitt 3.1.1.2 sowie 3.1.2.2) und bestätigen die bereits beschriebene Beobachtung, dass *LIV-1* Protein- und mRNA-Expressionshöhen nicht korrelieren (Abschnitte 3.6.1 und 3.7). Nur die östrogenabhängige Zelllinie ZR-75-1, in der die höchsten *LIV-1* mRNA Mengen detektiert wurde, zeigte die bereits beschriebene *LIV-1* spezifische Doppelbande bei 85 bzw. 90-95 kDa (siehe Abschnitt 3.3.2). Es könnte vermutet werden, dass posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierung am *LIV-1* Protein von der mRNA-Menge abhängig sind.

3.7 *LIV-1* Proteinexpression in Normalgeweben

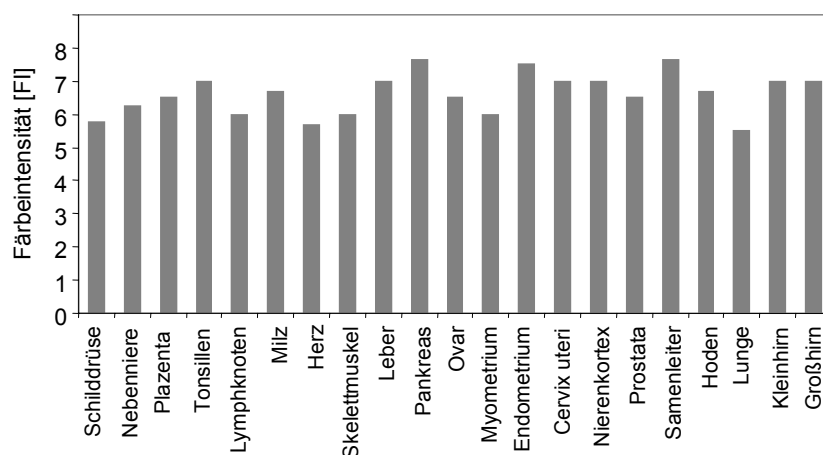


Abb. 24: *LIV-1* Proteinexpression in 21 humanen Normalgeweben. Die *LIV-1* Expression in Epithelzellen wurde mittels IHC bestimmt. *LIV-1* ist in allen Normalgeweben im Vergleich zur Positivkontrolle Zytokeratin relativ hoch exprimiert (Färbeintensitäten zwischen 5.5 FI-7.7 FI).

Abschließend wurde das Expressionsmuster von LIV-1 Protein in 21 unterschiedlichen Normalgeweben untersucht, die auf einem kommerziell erhältlichen Gewebearray (Ambion, Texas, USA) aufgebracht waren. Zytokeratin wurde als Positivkontrolle und interner Standard zum Vergleich der Expressionshöhen in verschiedenen Geweben benutzt. Im Gegensatz zu der heterogenen mRNA Expression (siehe Abschnitt 3.2) war das Protein LIV-1 in allen untersuchten Normalgeweben relativ gleichmäßig und hoch exprimiert (Intensitäten zwischen 5.5 FI-7.7 FI) (Abb. 24). Zusätzlich zu der epithelialen Färbung wurde eine schwächere stromale Färbung im Bereich von 3 FI-4.5 FI in folgenden Organen beobachtet: Ovar, Endometrium, Prostata und Hoden. Das Stroma der anderen Organe zeigte keine LIV-1 Expression. Außerdem wurde eine starke Färbung von Endothelzellen beobachtet (Färbeintensitäten zwischen 5.7 FI-7 FI), insofern Blutgefäße in den analysierten Gewebeschnitten vorhanden waren (z.B. bei Milz und Tonsillen). Die LIV-1 Färbung war ausschließlich intrazellulär lokalisiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Protein LIV-1 in allen untersuchten Normalgeweben stark exprimiert war und dass keine Korrelation zu den mRNA Transkriptmengen bestand, die nur in hormonabhängigen Organen erhöht waren.

3.8 Prognostische Relevanz von LIV-1

Da im klinischen Alltag dringend neue Marker zur Prognoseabschätzung von Brusttumoren benötigt werden, wurde die Relevanz von LIV-1 mRNA- sowie Proteinexpression zur Vorhersage der Länge des krankheitsfreien Intervalls (KFI) untersucht. Dafür wurden die mittels *ISH* bzw. *IHC* analysierten Tumore anhand eines Schwellenwertes der Expression, dessen Festlegung noch näher beschrieben wird, in positive und negative Tumore eingeteilt und das KFI der beiden Gruppen verglichen.

Um Korrelationen mit der Länge des KFI zu analysieren, wurden uni- und multivariate Analysen mittels des „Cox proportional Hazard“ Modells herangezogen. Die Annahme der Proportionalität wurde zuvor geprüft und für alle in dieser Arbeit benutzen Kovariablen bestätigt (2.13.2). Der Vergleich verschiedener Überlebenskurven, welche durch eine Kaplan-Meier Analyse errechnet wurden, wurde mittels eines „log-rank“ Tests durchgeführt (zur Erläuterung der statistischen Methoden siehe Abschnitt 2.11).

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Patientengruppe (siehe Abschnitt 3.1.3.1) waren von den bekannten Markern der Lymphknotenstatus ($p < 0.001$) sowie die Tumorgroße ($p = 0.050$) prognostisch für die Länge des KFI.

3.8.1 *LIV-1* mRNA Menge als Marker eines funktionellen Östrogenrezeptors

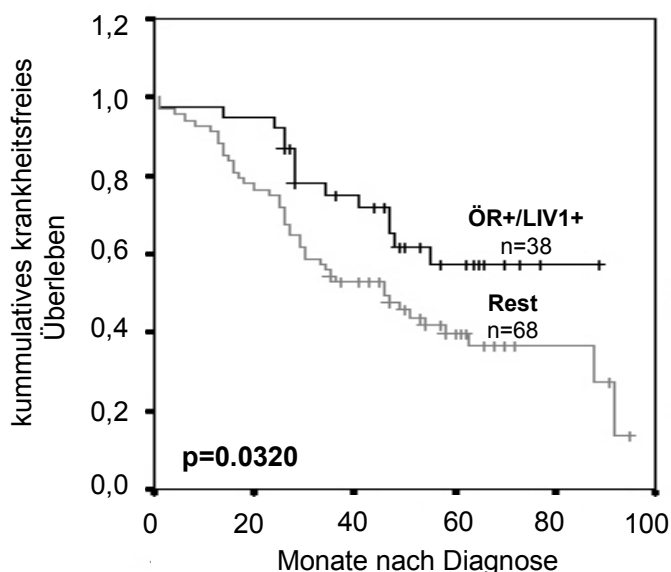


Abb. 25: Korrelation zwischen funktionellem ÖR und Länge des KFI. Dargestellt ist eine Kaplan-Meier Überlebenskurve. *LIV-1* mRNA Expression wurden als Kriterium eines funktionellen ÖRs benutzt. Patienten mit Tumoren mit funktionellem ÖR (ÖR+/*LIV-1*+) zeigten ein signifikant längeres KFI im Vergleich zu allen anderen Tumoren. *LIV-1* Expressionsdaten stammen aus *ISH* Experimenten.

Tab. 7: Univariate Analyse zur prognostischen Signifikanz des ÖRs.

| Untergruppen | RF (95%KI) | p-Wert‡ |
|---------------------------|------------------|--------------|
| ÖR+ versus ÖR- | 0,92 (0,78-1,06) | 0,554 |
| PR+ versus PR- | 0,91 (0,78-1,05) | 0,489 |
| <i>LIV1</i> + versus Rest | 0,67 (0,40-0,94) | 0,135 |
| ÖR+/PR+ versus Rest | 0,74 (0,48-1,01) | 0,271 |
| ÖR+/PR+/LIV1+ versus Rest | 0,52 (0,19-0,84) | 0,044 |
| ÖR+/LIV1+ versus Rest | 0,52 (0,21-0,83) | 0,036 |

RF = Risikofaktor; KI = Konfidenzintervall
 ‡ p-Werte aus univariater Analyse mittels "Cox proportional hazard" Modell (zweiseitiger Wald-Test)

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die *LIV-1* mRNA Expressionshöhen als Marker für die Funktionalität des ÖR herangezogen werden können. Dies war möglich, da eine starke Assoziation von *LIV-1* mRNA Expressionshöhen im Tumor mit dem jeweiligen Östrogenrezeptor- α (ÖR)-Status bereits beschrieben und in dieser Arbeit bestätigt wurde (siehe Abschnitt 3.1.1.1 sowie 3.1.3.3). Dafür sollte geprüft werden, ob die prognostische Relevanz des ÖR verbessert wird, wenn die *LIV-1* Expressionshöhe als Marker der transkriptionellen Aktivität des Rezeptors benutzt wird.

Der ÖR-Status war für die verwendete Patientengruppe nicht prognostisch für die Länge des KFI ($p=0.554$, $n_{\text{ÖR-}}=34$, $n_{\text{ÖR+}}=72$, Tab. 7). Auch wenn der Progesteronrezeptor (PR-)-Status, welcher

transkriptionell vom ÖR reguliert wird, als Marker für einen funktionellen ÖR mit in die Analyse einbezogen wurde, d.h. die Gruppen ÖR+/PR+ gegen alle anderen Tumore verglichen wurden, gab es keine Korrelation mit der Länge des KFI ($p=0.271$, $n_{\text{ÖR+/PR+}}=62$, $n_{\text{Rest}}=44$).

Trotz Variation des Schwellenwertes von 0.5 FI bis 6 FI zur Unterscheidung von *LIV-1* positiven (*LIV-1*⁺) von *LIV-1* negativen (*LIV-1*⁻) Tumoren, zeigten die *LIV-1* mRNA Expressionshöhen keine prognostische Relevanz für das KFI. Allerdings war bei einem Schwellenwert von 2.0 FI der p-Wert am niedrigsten, so dass die folgenden Analysen mit diesem Schwellenwert durchgeführt wurden ($p_{2.0\text{ FI}}=0.135$, $n_{\text{LIV-1}^+}=51$, $n_{\text{LIV-1}^-}=56$).

Wenn *LIV-1* mRNA Mengen als Marker für einen funktionellen ÖR in die Analyse eingeschlossen wurden (Tumoruntergruppe ÖR⁺/*LIV-1*⁺ im Vergleich zu allen anderen Tumoren) erreichte die Korrelation zwischen positivem ÖR und längerem KFI das 5% Niveau für die statistische Signifikanz ($p=0.036$, $n_{\text{ÖR}^+/\text{LIV-1}^+}=38$, $n_{\text{Rest}}=68$). Wenn ein positiver PR-Status als zusätzlich notwendiges Kriterium für einen aktiven ÖR betrachtet wurde (Untergruppe ÖR⁺/PR⁺/*LIV-1*⁻ verglichen mit allen anderen Tumoren), zeigte sich keine Verbesserung der prognostischen Eigenschaften ($p=0.044$, $n_{\text{ÖR}^+/\text{PR}^+/\text{LIV-1}^+}=34$, $n_{\text{Rest}}=72$). Die Relevanz von *LIV-1* für die Unterteilung der einzelnen Tumorgruppen zeigte sich außerdem darin, dass 34% (25/73) der ÖR⁺ Tumore bzw. 35% (22/63) der ÖR⁺/PR⁺ Tumore *LIV-1*⁻ waren. Außerdem waren 50% der ÖR⁻ (17/34) bzw. 53% der ÖR⁻/PR⁻ (16/30) positiv für *LIV-1*. Die Erhöhung der prognostischen Kapazität des ÖR durch Berücksichtigung der *LIV-1* Expressionshöhen resultiert wahrscheinlich aus der verbesserten Unterscheidung von Tumoren mit transkriptionell aktivem und inaktivem ÖR.

Mit diesen Analysen konnte demnach gezeigt werden, dass durch Betrachtung der *LIV-1* mRNA Expression als Marker eines funktionellen ÖR die prognostische Relevanz des ÖR stark erhöht wurde. Dies konnte nicht mit dem derzeit in der klinischen Diagnostik benutzten PR-Status erreicht werden und stellt demnach eine entscheidende Verbesserung in der ÖR Charakterisierung in Tumorpatienten dar.

3.8.2 *LIV-1* Proteinmenge als prognostischer Marker

Da gezeigt wurde, dass die Höhe der *LIV-1* Proteinexpression umgekehrt mit der Aggressivität von Tumoren korreliert (siehe Abschnitt 3.6.1.2), sollte nun untersucht werden, ob die Proteinexpression auch mit einem günstigeren klinischen Verlauf der Erkrankung verbunden ist.

Durch die Testung verschiedener Schwellenwerte im Bereich von 3.0 FI bis 6.5 FI für die Unterteilung der Tumore in *LIV-1* positive (*LIV-1*⁺) und *LIV-1* negative (*LIV-1*⁻) wurde deutlich, dass Patienten mit *LIV-1*⁺ Tumoren tendenziell ein längeres KFI hatten. Dieser Trend erreichte aber nicht das 5% Signifikanzniveau. Wenn allerdings die Tumorgruppe der IDCs separat in

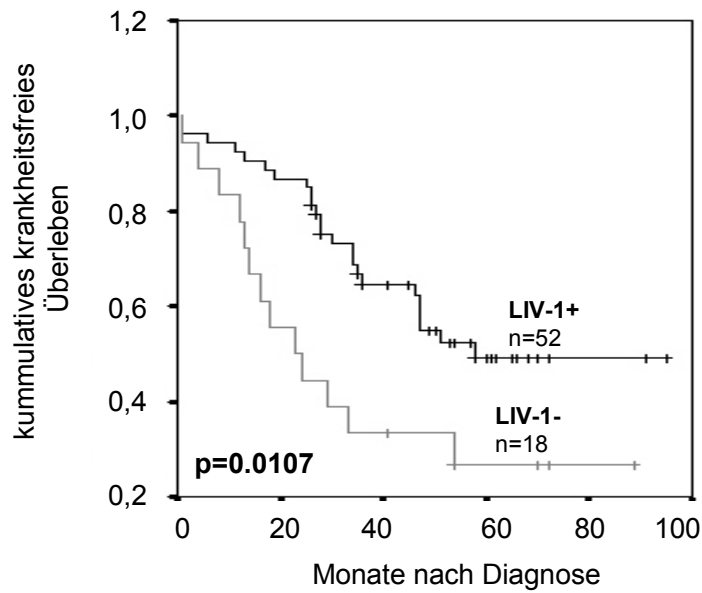


Abb. 26: Korrelation von LIV-1 Proteinexpression und Länge des KFI. Dargestellt ist eine Kaplan-Meier Überlebenskurve für die Länge des KFI. IDCs wurden in Untergruppen je nach LIV-1 Expression eingeteilt (LIV-1 positiv („LIV-1+“) bzw. LIV-1 negativ („LIV-1-“)). Patienten mit LIV-1+ Tumoren haben ein statistisch signifikant längeres KFI. Die Proteinexpressionsdaten wurden aus IHC-Färbungen ermittelt.

Tab. 8: Univariate und multivariate Analyse zur prognostischen Signifikanz verschiedener Marker

| Untergruppen | univariant | | multivariant | |
|--------------------------------------|------------------|---------------|-------------------|---------------|
| | RF (95%KI) | p-Wert‡ | RF (95%KI) | p-Wert‡ |
| LIV-1high versus LIV-1low | 1,35 (1,66-3,32) | 0,0138 | 5,29 (2,56-10,95) | 0,0219 |
| N ₁ versus N ₀ | 0,09 (0,04-0,19) | 0,0013 | 0,02 (0,01-0,06) | 0,0004 |
| N ₂ versus N ₁ | 0,38 (0,22-0,65) | 0,0741 | 0,18 (0,08-0,42) | 0,0404 |
| T ₂ versus T ₁ | 0,30 (0,17-0,53) | 0,0319 | 2,67 (0,95-7,50) | 0,3402 |
| T ₃ versus T ₂ | 0,54 (0,34-0,86) | 0,1829 | 3,02 (1,31-6,95) | 0,1841 |
| T ₄ versus T ₃ | 0,66 (0,35-1,24) | 0,5126 | 2,89E-07 (k.A.) | 0,9902 |
| Alter >50 versus Alter <50 | 0,83 (0,58-1,20) | 0,6121 | 3,06 (1,57-5,98) | 0,0943 |
| Grad 2 versus Grad 1 | 2,27E-06 (k.A.) | 0,9815 | 4,73E-06 (k.A.) | 0,9920 |
| Grad 3 versus Grad 2 | 1,32 (0,93-1,89) | 0,4294 | 1,56 (0,83-2,91) | 0,4772 |

RF = Risikofaktor; KI = Konfidenzintervall

‡ p-Werte aus "Cox proportional hazard" Modell

k.A. = keine Aussage möglich, da Standardabweichung zu hoch

gleicher Weise analysiert wurde, war die Korrelation in einem Bereich von 4.0 FI-5.5 FI des Schwellenwertes signifikant. Der Schwellenwert mit der besten Korrelation betrug 4.5 FI Einheiten ($p_{4.5\text{FI}}=0.0085$, $n_{\text{LIV-1+}}=52$, $n_{\text{LIV-1-}}=18$). Aus diesen Gründen wurden die folgenden statistischen Analysen nur an der Subgruppe der IDCs und mit einem Schwellenwert von 4.5 FI durchgeführt. Da die Gruppe der ILCs nur 15 Proben enthielt, konnte keine separate Untersuchung dieses zweithäufigsten Typs des Mammakarzinoms durchgeführt werden.

Eine univariante Analyse mittels des „Cox proportional Hazard“ Modells bestätigte die Ergebnisse des „log-rank“ Tests, d.h. die LIV-1 Proteinexpression war prognostisch für die Länge des KFI ($p=0.0138$). Außerdem galt für die Gruppe der IDCs wie auch für die gesamten Tumore, dass der Lymphknotenstatus (N_0/N_1 : $p=0.0013$) sowie die Tumorgroße (T_1/T_2 : $p=0.031$) mit der Länge des KFI korrelieren. Um zu untersuchen, ob die LIV-1 Expression ein von bereits bekannten prognostischen Markern unabhängiger prognostischer Faktor des Mammakarzinoms ist, wurde eine multivariante Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt und machen deutlich, dass sowohl die LIV-1 Proteinexpression als auch der Lymphknotenstatus signifikante, unabhängige, prognostische Faktoren für diese Patientengruppe darstellen (LIV-1: $p=0.0219$, Lymphknotenstatus: N_0/N_1 : $p=0.004$, N_1/N_2 : $p=0.0404$).

Diese statistischen Analysen zeigen, dass die Expression von LIV-1 Protein ein neuer, unabhängiger prognostischer Marker für die Länge des KFI darstellt.

3.9 SL-3 mRNA Expression in Tumor- und Normalgewebe der Brust

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die sekretierte Matrix-Metalloprotease Stromelysin-3 (SL-3) auf ihre Eignung als potentielles Zielmolekül einer Medikamentenentwicklung untersucht. Dafür sollte zuerst, wie für das im ersten Teil analysierte Gen LIV-1, das mRNA- und Proteinexpressionsmuster im Mammakarzinom und in Normalgeweben untersucht werden. Dadurch kann das Vorhandensein eines möglichen therapeutischen Fensters abgeschätzt werden.

3.9.1 Ergebnisse der Affymetrix Genchip Hybridisierungen

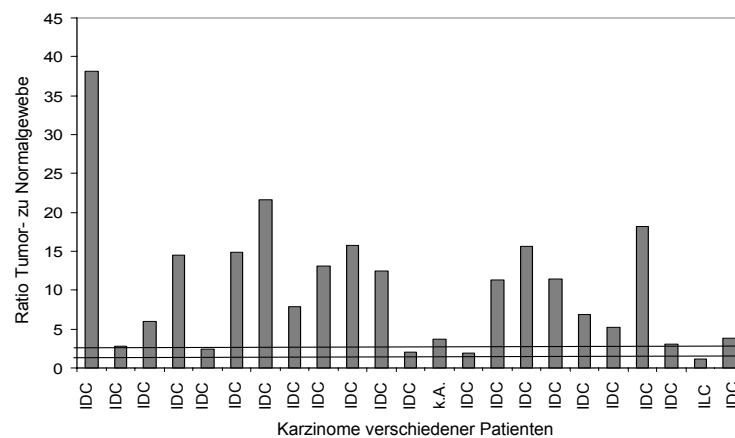


Abb. 27: *Differentielle Expression von SL-3 mRNA in Brusttumorproben.* Mikrodissertierte Proben von Tumor- und dazugehörigem Normalgewebe von 23 Patienten wurden mittels Affymetrix Genchips analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis der SL-3 spezifischen Hybridisierungssignale in Brusttumoren bezogen auf das entsprechende Brustnormalgewebe. In 22 der 23 Tumore war SL-3 überexprimiert ($Tu/N \geq 2$) und in keinem der Tumore unterexprimiert ($Tu/N \leq 0.5$).

Die von der Abteilung „Gynäkologische Tumore“ der metaGen Pharmaceuticals GmbH durchgeführten Genchip Hybridisierungen wurden hinsichtlich der SL-3 mRNA Expression ausgewertet. Pro Patient wurde jeweils mikrodissertierte Tumor- und Normalgewebe der Brust für die mRNA Isolation bzw. Hybridisierung der Chips verwendet. Die Probengruppe umfasste 23 Karzinome verschiedener Patienten (21 IDC, 1 ILC sowie 1 nicht charakterisiertes Karzinom).

Die Expressionshöhen des Tumorgewebes wurden mit denen des Normalgewebes des gleichen Patienten verglichen (Abb. 27) und in 96% (22/23) der Tumore war SL-3 überexprimiert (d.h. Verhältnis $Tu/N \geq 2$). In keinem der Tumore wurde eine Unterexpression (d.h. Verhältnis $Tu/N \leq 0.5$) von SL-3 beobachtet. Der Faktor der differentiellen Expression schwankte zwischen $Tu/N=1.2$ und $Tu/N=38.1$ und lag bei durchschnittlich $\sigma Tu/N=10.2$. Der Median der Expression im Tumorgewebe betrug $PMQ_{Median}=44.6$. Hingegen war der Median der Expression im Normalgewebe mit $PMQ_{Median}=4.5$ wesentlich niedriger. Diese Ergebnisse zeigen eine starke Überexpression von SL-3 mRNA in Brusttumoren im Vergleich zum Brustnormalgewebe.

3.9.2 Ergebnisse der quantitativen RT-PCR

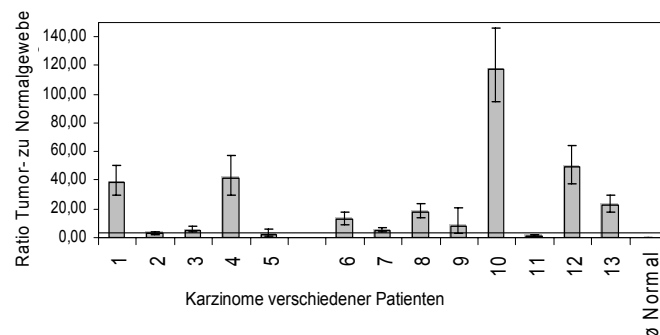


Abb. 28: *Differentielle Expression von SL-3 mRNA in Brusttumoren.* Gezeigt ist das Expressionsverhältnis von *SL-3* in Tumorgeweben bezogen auf die Expression im Normalgewebe des gleichen Patienten (Patientenproben 1-5) bzw. für die Patientenproben 6-13 auf die durchschnittliche Expression ($\bar{\sigma}$ Normal) in 6 Normalgeweben. Die *SL-3* Expressionshöhen wurden durch quantitative RT-PCR ermittelt. *SL-3* war in 12 der 13 Tumorproben überexprimiert ($Tu/N \geq 2$) und in keinem unterexprimiert ($Tu/N \leq 0.5$). Gezeigt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

Die Ergebnisse der Genchip Hybridisierungen wurden anhand einer quantitativen RT-PCR an 13 mikrodissertierten invasiven Brusttumorgeweben überprüft. Die jeweiligen Expressionshöhen wurden durch den Abgleich der genspezifischen Signalintensitäten mit denen des konstitutiv exprimierten Gens *GAPDH* in der gleichen Probe ermittelt

Zu 5 der Tumorproben war Normalgewebe derselben Patienten vorhanden und wurde für den Vergleich der Expressionshöhen verwendet. Die *SL-3* mRNA Expressionshöhen in den restlichen 8 Tumorgeweben wurden aus Mangel an dazugehörigem Normalgewebe mit der durchschnittlichen Expression in 6 unabhängigen Normalgeweben verglichen. Es zeigte sich, dass in 12 der 13 Tumore (92%) *SL-3* überexprimiert (d.h. Verhältnis $Tu/N \geq 2$) und in keinem der Tumore unterexprimiert (d.h. $Tu/N \leq 0.5$) war (Abb. 28). Der Faktor der differentiellen Expression lag zwischen $Tu/N=1.5$ und $Tu/N=117.4$ und betrug durchschnittlich $\bar{\sigma}Tu/N=25.1$. Die absoluten Expressionshöhen von *SL-3* bezogen auf *GAPDH* lagen im Tumorgewebe bei einem Median von 0.00026, hingegen im Normalgewebe betrug der Median der Stromelysin-3 Expression 0.00001.

Die Daten zeigen eine starke Überexpression von *SL-3* Transkripten in Brusttumorgewebe.

SL-3 wurde als Gen beschrieben, welches von Brustfibroblasten und nicht von Brustepithelzellen exprimiert wird [Basset *et al.*, 1990]. Da aber eine Expression von *SL-3* mittels Genchip Hybridisierungen bzw. quantitativer RT-PCR in mikrodissertierten Epithel- bzw. Karzinomzellen detektiert wurde, sollte im Folgenden die Reinheit des mikrodissertierten Materials untersucht werden. Auf dem verwendeten metaGen 1 Genchip konnten keine Oligos identifiziert werden, die spezifisch einen Fibroblastenmarker (z.B. Vimentin oder Prolyl 4-hydroxylase [Ronnov-Jessen *et al.*, 1996]) nachweisen und in der fibroblastoiden Kontrollzelllinie MDA-MB-231 ein positives Signal

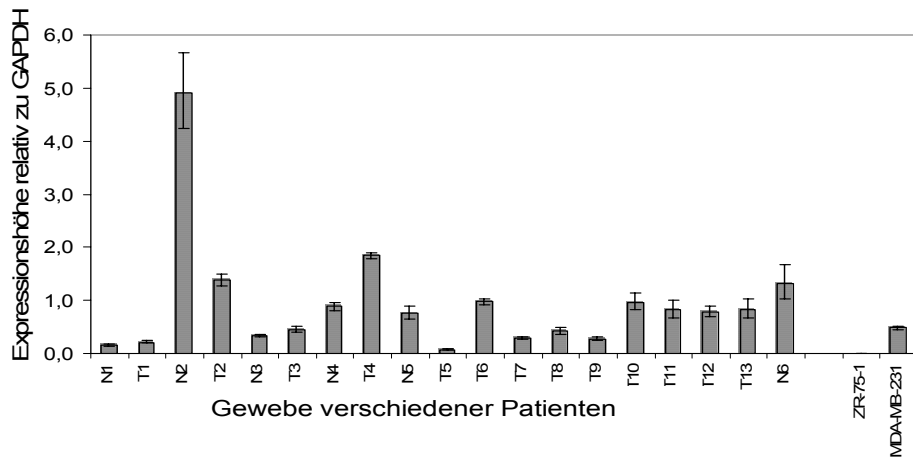


Abb. 29: Test auf das Vorhandensein des Fibroblastenmarkers Vimentin in mikrodissertierten Proben. Gezeigt sind die in einer quantitativen RT-PCR ermittelten Expressionshöhen für Vimentin bezogen auf *GAPDH*. Als Positivkontrolle diente die vimentinexprimierende Zelllinie MDA-MB-231 und als Negativkontrolle die Vimentin-negative Zelllinie ZR-75-1. Trotz Mikrodissektion von Epithelzellen sind relativ große Mengen des Fibroblastenmarkers in den Proben vorhanden. N: Normal, T: Tumor, 1-13: verschiedene Patienten Gezeigt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

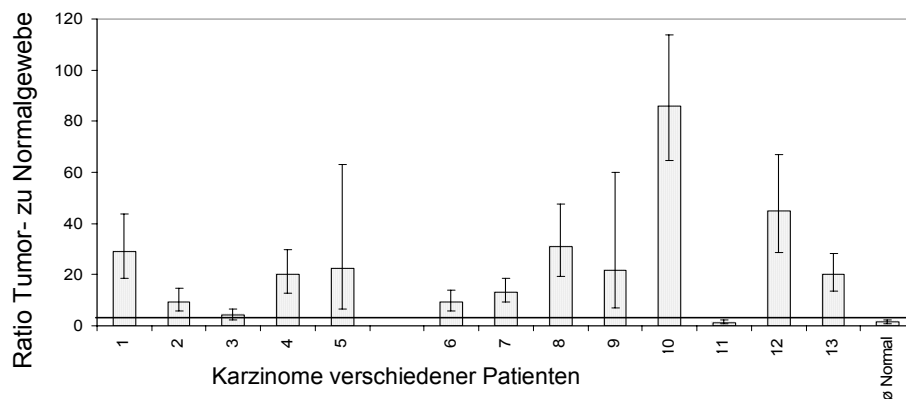


Abb. 30: Differentielle Expression von *SL-3* mRNA in Brusttumoren mit Normalisierung auf den Fibroblastenanteil. Expressionshöhen von *SL-3* wurden auf die von Vimentin bezogen, um den schwankenden Fibroblastenanteil der Proben zu berücksichtigen. Gezeigt sind die Vimentin-normalisierten *SL-3* Expressionshöhen in Tumorgewebe verglichen mit denen im Normalgewebe des gleichen Patienten (Patientenproben 1-5) bzw. verglichen mit den durchschnittlichen Expressionshöhen in 6 Normalgeweben (Patientenproben 6-13). 12 der 13 Tumore zeigten eine Überexpression ($Tu/N \geq 2$) von *SL-3* und keiner der Tumore unterexprimierte das Gen ($Tu/N \leq 0.5$). Die Daten entstammen einer quantitativen RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

zeigten. Deswegen wurde eine Vimentin-spezifische quantitative RT-PCR benutzt. Als Vergleich diente zum einen die epitheliale Zelllinie ZR-75-1, die kein Vimentin exprimiert und zum anderen die Tumorzelllinie MDA-MB-231, die zwar epithelialen Ursprungs ist, aber durch eine epitheliale-mesenchymale Transition den Fibroblastenmarker Vimentin exprimiert [Dandachi *et al.*, 2001].

Wie aus Abb. 29 ersichtlich ist, waren in den mikrodissertierten Proben nicht zu vernachlässigende Mengen an Vimentin vorhanden, deren Menge stark schwankte (Expressionshöhe von Vimentin bezogen auf *GAPDH* lag zwischen 0.07 und 4.9). Dies lässt das Vorhandensein nicht unerheblicher Mengen an Fibroblasten in den mikrodissertierten Proben vermuten. Eine Quantifizierung des absoluten Fibroblastenanteils war allerdings nicht möglich, da die Vergleichszelllinie MDA-MB-231 erstens *in vitro* kultiviert wurde und zweitens keine ursprüngliche Fibroblastenzelllinie darstellt und somit nicht als Standard für die Fibroblastenzellzahl geeignet ist.

Um aber einen Vergleich der *SL-3* mRNA Expressionshöhen in den Fibroblasten zu ermöglichen, wurden im nächsten Schritt die *SL-3* Expressionswerte auf die von Vimentin bezogen, welche den Fibroblastenanteil der entsprechenden Probe widerspiegelt. Erst dann wurden die Expressionshöhe der jeweiligen Tumor- und Normalgewebe miteinander verglichen. Die Ergebnisse änderten sich durch diese Normalisierung nur unwesentlich (vergleich Abb. 28 und Abb. 30), d.h. *SL-3* war in 12 der 13 Tumore überexprimiert ($Tu/N \geq 2$) und in keinem der Tumore zeigte sich eine Unterexpression ($Tu/N \leq 0.5$). Der Faktor der differentiellen Expression schwankte nach der Normalisierung zwischen $Tu/N=1.3$ und $Tu/N=29.1$ mit einem durchschnittlichen Wert von $\sigma Tu/N=24$. Allerdings nahm die Höhe der Standardabweichung durch die Normalisierung stark zu, da sich nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz von Doerffel bei einer Division der zu analysierenden Werte die Quadrate der normalisierten Standardabweichungen addieren [Doerffel, 1984].

Diese Daten zeigen, dass in den verwendeten mikrodissertierten Proben nicht zu vernachlässigende Anteile an stromalen Zellen vorhanden sind, die wahrscheinlich für das *SL-3* spezifische Signal verantwortlich sind. Die Beobachtung, dass *SL-3* in >90% der Tumore überexprimiert ist, wurde allerdings in mikrodissertierten Proben mit und ohne Normalisierung auf Vimentin gemacht und damit wurden die Ergebnisse der Genchip Hybridisierungen bestätigt.

3.10 *SL-3* mRNA Expression in Normalgeweben

Um das mRNA Expressionsmuster von *SL-3* in verschiedenen humanen Normalgeweben bestimmen zu können, wurde ein kommerziell erhältliches Set an mRNAs (Clontech, CA) in cDNAs umgeschrieben und in einer *SL-3* spezifischen quantitativen RT-PCR eingesetzt. Diese mRNAs stammten aus Gesamtgewebeproben, so dass verschiedene Zelltypen enthalten waren. Als Standard wurde ein in der metaGen Pharmaceuticals GmbH mikrodissertiertes Burstnormalgewebe mitgeführt. Die höchsten *SL-3* Expressionswerte waren in Plazentagewebe zu verzeichnen (Abb. 31). Eine mittlere Expression fand sich in den Geweben Gebärmutterhals und Uterus und eine schwache Expression wurde in Milz, Hoden, Brust, Magen, Dünndarm und Lymphknoten beobachtet. In den restlichen Geweben, wurde eine sehr niedrige bzw. keine *SL-3* Expression detektiert. Die Expressionshöhen von *SL-3* bezogen auf *GAPDH* reichten von 0.87 (Plazenta) bis <0.001 (Skelettmuskel).

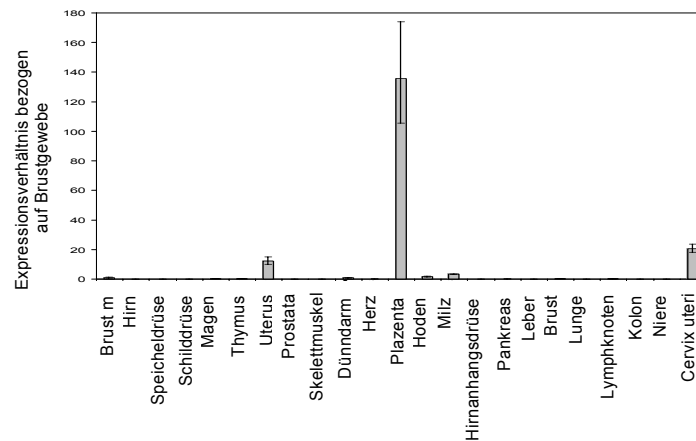


Abb. 31: SL-3 mRNA Expression in verschiedenen humanen Normalgeweben. Die SL-3 mRNA Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR an cDNAs von 22 Normalgeweben bestimmt. Gezeigt sind die Expressionshöhen bezogen auf mikrodissertiertes Brustnormalgewebe (Brust m). Die höchsten Expressionswerte von SL-3 finden sich in den Geweben Plazenta, Gebärmutterhals und Uterus.

Aus den Ergebnissen der mRNA Expressionsanalyse geht SL-3 als guter Kandidat für eine Medikamentenentwicklung hervor, da es zum einen in Brusttumorgewebe stark überexprimiert ist und zum anderen sich eine starke und mittlere SL-3 Expression nur in schnell regenerierbaren Normalgeweben findet. Dieses Expressionsmuster lässt vermuten, dass bei einer SL-3 spezifischen Therapie keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auftreten.

3.11 SL-3 Proteinexpression in Tumor- und Normalgewebe der Brust

Da mRNA- und Proteinexpressionshöhen oft voneinander abweichen [Gygi *et al.*, 1999], sollten die Daten der mRNA Expressionsanalyse auf Proteinebene mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper (Neomarkers, CA) überprüft werden. Um die SL-3 exprimierenden Zellen charakterisieren zu können, wurde eine Dreifachfärbung mit dem Fibroblastenmarker Vimentin, dem Epithelzellmarker Zytokeratin und SL-3 etabliert und an Gewebeproben durchgeführt.

3.11.1 Gewebeproben

Für die immunhistochemische Färbung wurde ein Gewebearray benutzt, der freundlicher Weise von Dr. Arndt Hartmann (Pathologie der Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt wurde. Auf diesem Array befanden sich Tumor- sowie Normalproben von 16 Patienten mit invasiven Brusttumoren. In Abb. 32 sind typische SL-3 Färbungen von Tumor- und Normalgewebe gezeigt.

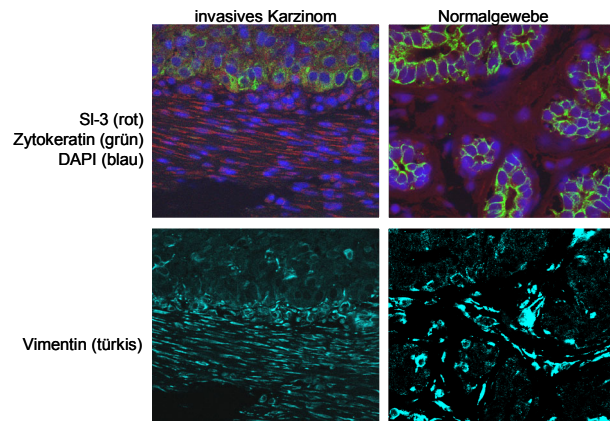


Abb. 32: *SL-3 Proteinexpression in Tumor- und Normalgewebe der Brust.* Gezeigt sind typische Beispiele eines Tumor- und Normalgewebes, welche durch eine Dreifachfärbung der SL-3 Expression (rot), des Epithelzellmarkers Zytokeratin (grün) und des Fibroblastenmarkers Vimentin (türkis) immunhistochemisch analysiert wurden. Es ist ersichtlich, dass SL-3 nur in Fibroblasten von Tumoren exprimiert wird. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie gemacht. Ursprüngliche Vergrößerung: 630x.

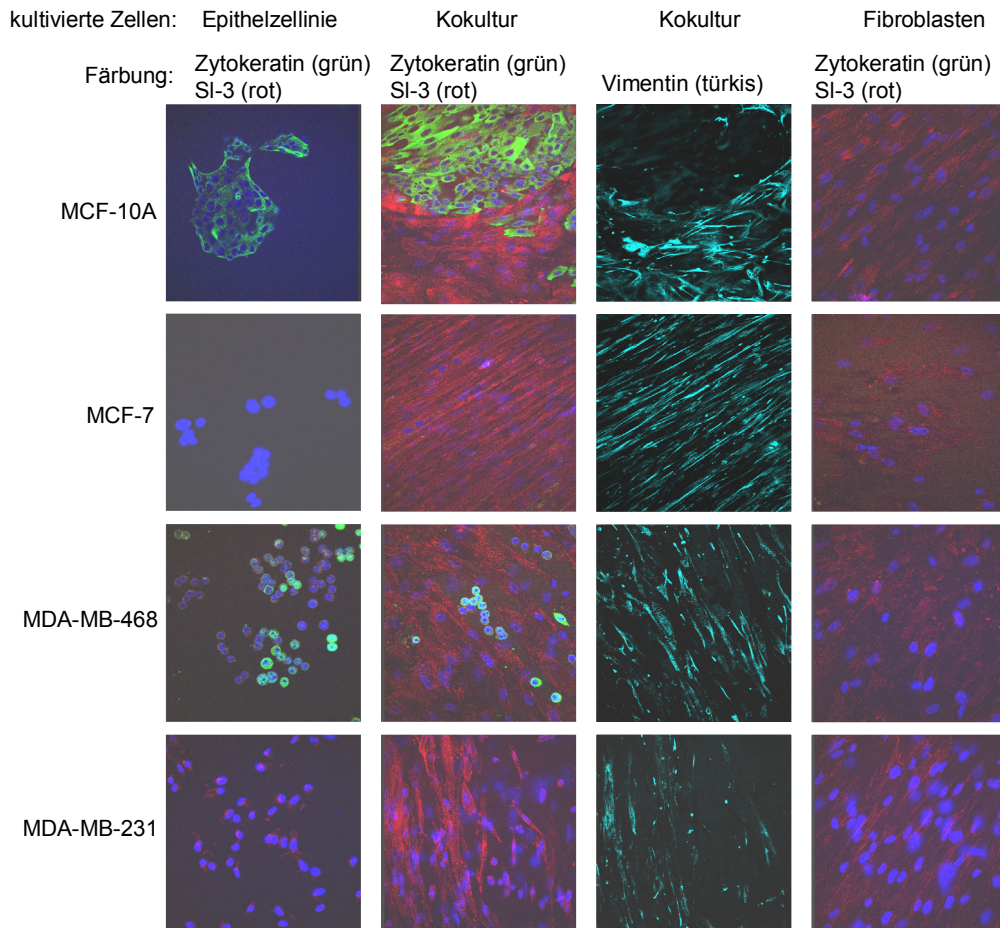


Abb. 33: *SL-3 Proteinexpression in Kokulturen von Tumorfibroblasten und Brustepithelzelllinien.* Gezeigt ist eine Dreifachfärbung von Epithelzelllinien und Fibroblasten aus Einzel- sowie Kokulturen. Die Färbungen des Epithelzellmarkers Zytokeratin (grün), des Fibroblastenmarkers Vimentin (türkis) und von SL-3 (rot) wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Es ist zu erkennen, dass die SL-3 Expression durch Kokultivierung von Brustepithelzelllinien und Brusttumorfibroblasten induziert wird. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Ursprüngliche Vergrößerung: 630x.

Es konnte festgestellt werden, dass SL-3 in Fibroblasten von Brusttumoren exprimiert wird, wobei die Expression an der Invasionsfront des Tumors besonders stark war. Es wurde kein SL-3 in Fibroblasten oder Epithelzellen des Normalgewebes oder in Karzinomzellen detektiert. Die Daten zeigen, dass SL-3 auch auf Proteinebene in Brusttumoren überexprimiert ist. Außerdem läßt die Expression von SL-3 an der Invasionsfront des Tumors vermuten, dass die Proteinexpression von Stromelysin-3 in Fibroblasten durch invasierende Brusttumorzellen induziert wird.

3.11.2 Kokulturen

Um die These der Induktion der SL-3 Expression in Fibroblasten durch Brusttumorzellen zu untersuchen, wurden Brustepithelzellen mit primäre Tumorfibroblasten der Brust kokultiviert. Die Fibroblasten wurden freundlicher Weise von Dr. Bernhard Tetu (Universitätskrankenhaus Quebec, Kanada) zur Verfügung gestellt. Für die Kokultivierung wurden 4 Epithelzelllinien ausgewählt, die sich in ihrem tumorigenen Potenzial unterschieden. MCF-10A ist eine immortalisierte, gut differenzierte und nicht tumorigene Brustzelllinie. MCF-7 ist eine östrogenabhängig wachsende und gut differenzierte Brustkrebszelllinie, wobei MDA-MB-468 östrogenunabhängig wächst und ein wenig differenziertes Stadium erreicht hat. MDA-MB-231 ist von den genannten die aggressivste Brusttumorzelllinie, die ebenfalls östrogenunabhängig wächst und eine epitheliale-mesenchymale Transition durchlaufen hat, d.h. trotz ihres epithelialen Ursprungs einen fibroblastoiden Phänotyp aufweist, der sich u. a. in einer hohen Invasivität äußert.

Die Kokulturen wurden mittels Immunzytochemie analysiert. In allen Ansätzen war eine Erhöhung der SL-3 Expression in den Fibroblasten der Kokultur im Vergleich zu den Ansätzen, in denen Epithelzellen bzw. Fibroblasten getrennt kultiviert wurden, zu beobachten (Abb. 33). Es war kein Unterschied in der Stärke der Induktion von SL-3 zu erkennen, wenn die Kokulturen mit den verschiedenen Epithelzelllinien untereinander verglichen wurden. Wie erwartet exprimierten auch Fibroblasten und die fibroblastoide Zelllinie MDA-MB-231 geringe Mengen SL-3, wenn sie in Einzelkulturen angezüchtet wurden. Außerdem waren die Zellen negativ für den Epithelzellmarker Zytokeratin. Allerdings exprimierte die Epithelzelllinie MCF-7 nicht das für Epithelzellen charakteristische Zytokeratin. Auch in Western Blot Analysen lieferte der benutzte monoklonale Antikörper gegen Panzytokeratin kein Signal in MCF-7 Zellen (Daten nicht gezeigt). Es könnte vermutet werden, dass die in unserem Labor verwendete MCF-7 Zelllinie kein Zytokeratin exprimiert, oder, was wahrscheinlicher ist, eine Mutation im antigenen Bereich vorliegt, so dass der Antikörper das Protein nicht mehr erkennt. Da typische Merkmale für MCF-7 Zellen (Morphologie, Östrogenabhängigkeit, fehlende Caspase 3 Aktivität) in diesen Zellen in unserem Labor nachgewiesen wurden, ist es unwahrscheinlich, dass eine Kontamination mit einer anderen Zelllinie vorlag. Es wurde somit gezeigt, dass SL-3 spezifisch in Fibroblasten exprimiert wird und eine Kokultivierung von Brusttumorfibroblasten mit Brustepithelzellen diese SL-3 Expression stimuliert. Dabei scheint das tumorigene Potential der in dieser Arbeit verwendeten Epithelzelllinie unerheblich zu sein.

3.12 Klonierung der SL-3 cDNA

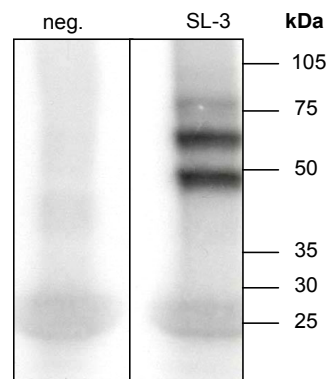


Abb. 34: *In vitro* Transkription / Translation von SL-3. SL-3 wurde mittels *in vitro* Transkription / Translation von einem humanen Expressionsvektor hergestellt und das ^{35}S -Methionin markierte Protein wurde nach Auftrennung durch eine SDS-PAGE durch Autoradiographie detektiert. In der Negativkontrolle („neg.“) wurde nur der Leervektor eingesetzt. Die beiden Banden zeigen wahrscheinlich die latente (60 kDa) und die durch intrazelluläres Furin aktivierte (47 kDa) Form von SL-3.

Um SL-3 für funktionelle Analysen rekombinant herstellen zu können, wurde der kodierende Bereich aus Plazenta cDNA („quick clone cDNA panel“, Clontech, CA) mittels genspezifischer Primer über PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pcDNA3.1V5HisTOPO (Invitrogen, Karlsruhe) eingebracht. Durch automatisierte Sequenzierung wurde gezeigt, dass keine Mutationen enthalten waren, welche die Aminosäuresequenz des Proteins ändern. Außerdem wurde das Vorhandensein des natürlichen STOP-Kodons bestätigt, so dass die im Expressionsvektor vorhandenen „tags“ nicht translatiert werden.

Das Konstrukt wurde mittels *in vitro* Transkription / Translation unter Verwendung von Retikulozytenlysats auf die Expressierbarkeit von SL-3 untersucht (Abb. 34). Durch anschließende Autoradiographie wurden zwei SL-3 spezifische Proteinbanden von ca. 60 und 50 kDa Molekulargewicht detektiert. Diese entsprechen wahrscheinlich der latenten (60 kDa) bzw. der aktiven (47 kDa) SL-3 Form. Letztere wird intrazellulär durch die endoplasmatische Protease Furin prozessiert (siehe Abschnitt 1.5).

Das klonierte Plasmid kann demnach zur Expression von rekombinantem SL-3 benutzt werden.

3.13 Funktionelle Analysen von SL-3 überexprimierenden Klonen *in vitro*

Um die Relevanz von SL-3 für das Mammakarzinom untersuchen zu können, sollte das Protein in Brustkarzinomzelllinien überexprimiert und diese in funktionellen Tests analysiert werden. Wie in Abschnitt 3.11 beschrieben, wird SL-3 *in vivo* von Fibroblasten und nicht von Epithelzellen exprimiert und sekretiert. Da aber gezeigt wurde, dass SL-3 die Tumorgenese von Epithelzellen parakrin beeinflussen kann [Noel *et al.*, 1996], wurde angenommen, dass eine Überexpression von

SL-3 in Epithelzellen die Effekte des von Fibroblasten sekretierten Proteins auf Epithelzellen simulieren kann.

Als humane Brusttumorzelllinien wurden MCF-7 und MDA-MB-231 ausgewählt. MCF-7 kann als Modell eines östrogenabhängigen, gut differenzierten Tumors angesehen werden, wobei MDA-MB-231 eine Modellzelllinie für einen aggressiven, undifferenzierten Tumor ist. Da nicht bekannt ist, in welchem Tumorstadium SL-3 einen Einfluss auf die Tumorgenese hat, sollten diese beiden Zelllinien analysiert werden.

3.13.1 Herstellung und Überprüfung stabil transfizierter Klone

Da es in Säugerzellen keine selbstreplizierenden extrachromosomalen Elemente gibt, muss für eine gleichmäßige Expression von rekombinantem Protein über einen längeren Zeitraum das Expressionsplasmid stabil in das Genom integriert werden. Dafür wurde das SL-3 Expressionsplasmid bzw. der Leervektor als Negativkontrolle in die Zelllinien MCF-7 sowie MDA-MB-231 transfiziert und Zellklone isoliert.

Der Zellkulturüberstand der isolierten Klone wurde auf das Vorhandensein von sekretiertem SL-3 mittels Western Blot Analyse überprüft (Beispiele siehe Abb. 35). Dabei zeigte sich das in der Literatur beschriebene typische SL-3 Bandenmuster mit einer latenten Form bei ca. 60 kDa, eine aktiven Form bei ca. 47 kDa und Abbauprodukten bei 35 kDa bzw. 28 kDa [Mari *et al.*, 1998]. In MDA-MB-231 Klonen war das 35 kDa Abbauprodukt stärker vorhanden als bei MCF-7. Da gezeigt wurde, dass dieses Abbauprodukt durch MMP-Aktivität entsteht [Mari *et al.*, 1998], ist diese Beobachtung wahrscheinlich auf die höhere MMP-Expression der fibroblastoiden Zelllinie MDA-MB-231 zurückzuführen. Die mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen zeigten im Falle von MCF-7 keine SL-3 Expression und im Falle von MDA-MB-231 wie erwartet eine schwache endogene Expression des Proteins. Durch Western Blot Analyse des konditionierten Mediums dieser stabil transfizierten Klone wurde auch gezeigt, dass in Anwesenheit und Abwesenheit von G418 SL-3 über mindestens 10 Passagen in gleichen Mengen stabil exprimiert wird (Abb. 35). Deswegen wurde in weiteren Kultivierungen auf G418 verzichtet.

Die isolierten Zellklone wurden außerdem mittels FISH („fluoreszierende *in situ* Hybridisierung“) hinsichtlich des Integrationsortes und der Kopienanzahl der integrierten Plasmide im Genom analysiert. Dafür wurde das SL-3 Expressionsplasmid als Sonde benutzt und an Metaphasen Chromosomen der Zellklone hybridisiert. Der Integrationsort wurde anhand des Bandenmusters der Chromosomen bestimmt, welche mit DAPI gegengefärbt wurden.

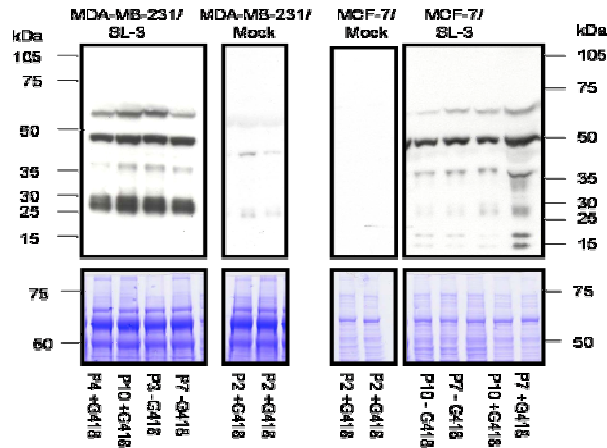


Abb. 35: Überprüfung der SL-3 Expression in stabil transfizierten Klonen. In Western Blot Analysen wurde SL-3 in konditioniertem Medium (3 Tage in 0.1% FBS, 20-fach konzentriert) stabil transfizierter Klone unterschiedlich hoher Passagen („P“) und einer Kultivierung mit und ohne G418 in gleichen Mengen detektiert. Beispielhaft sind die beiden SL-3 transfizierten („SL-3“) Klone MDA-MB-231/C3M und MCF-7/D4 sowie die mit dem Leervektor transfizierten („Mock“) Klone MDA-MB-231/C3M und A4G bzw. MCF-7/C2 und C3 gezeigt. Die Proteinbande bei ca. 60 kDa entspricht der latenten und bei ca. 50 kDa der aktiven Form von SL-3. Signale bei 35 kDa und 28 kDa sind in Publikationen als Abbauprodukte von SL-3 beschrieben [Mari *et al.*, 1998]. Ähnliche Proteinbeladungen wurden anhand einer Coomassie-Färbung des 10% Polyacrylamidgels nachgewiesen. Primärer Antikörper: monoklonal Maus α -(humanes SL-3) (Neomarkers, CA).

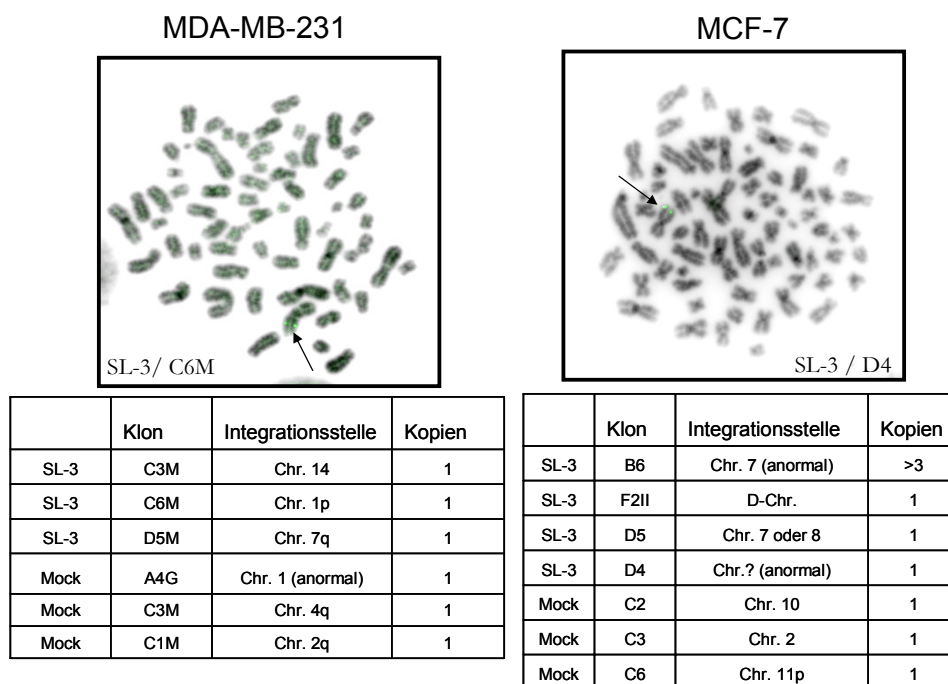


Abb. 36: Überprüfung des Integrationsortes und der Integrationshäufigkeit des SL-3 Expressionsplasmides. Metaphasenchromosomen von Klonen der Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 wurden mittels fluoreszierender *in situ* Hybridisierung („FISH“) und einer SL-3 spezifischen Sonde analysiert. Die Integrationsorte wurden, wenn möglich, anhand des mit DAPI visualisierten chromosomalen Bandenmuster bestimmt. Außer Klon MCF-7/SL-3/B6 zeigten alle Klone eine einmalige Integration des Plasmides in unterschiedlichen Chromosomen und wurden für weitere Analysen benutzt. Beispielhaft sind typische Aufnahmen von 2 Klone gezeigt. Ursprüngliche Vergrößerung: 1000x

Dadurch konnte gezeigt werden, dass alle SL-3 exprimierenden Klone, aber auch die Negativkontrollklone das Plasmid integriert hatten. Außer im Falle des Klones MCF-7/SL-3/B6, der ein mindestens dreifaches Signal in Chromosom 7 zeigte, war das Plasmid als Einzelkopie vorhanden. Anhand des Bandenmusters der Chromosomen von Klon MCF-7/SL-3/B6 könnte der Chromosomenarm 22q mit dem endogenen *SL-3* Gen amplifiziert und zu Chromosom 7 translokalisiert worden sein. Da das Signal nicht eindeutig zu interpretieren war, wurde der Klon für weitere Arbeiten ausgeschlossen. Das Expressionsplasmid war in den einzelnen Klonen an verschiedenen Stellen im Genom integriert. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass in funktionellen Tests Effekte detektiert werden, die von der Integration des Plasmides in einen bestimmten Locus (z.B. durch Integration in ein bestimmtes Gen) herrühren. Außerdem konnte bestätigt werden, dass die Klone aus einer Einzelzelle hervorgegangen waren, da für jeden Klon in 7 bis 10 analysierten Metaphasen der gleiche Integrationsort beobachtet wurde.

Um in späteren funktionellen Tests Artefakte zu vermeiden, die durch den spezifischen genetischen Hintergrund eines Zellklones entstehen können, wurden pro Zelllinie drei verschiedene SL-3 überexprimierende und drei Leervektor-transfizierte Klone („Mock“) für die weiteren Analysen benutzt.

Durch die Herstellung und Validierung von Zellklonen standen nun SL-3 überexprimierende und zum Vergleich Leervektor-transfizierte Klone für die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zur Verfügung, die im Weiteren auf Unterschiede in ihren funktionellen Eigenschaften getestet werden konnten.

3.13.2 Etablierung eines 3D *in vitro* Kulturmodells

Stromelysin-3 wurde aufgrund von Sequenzhomologien als Matrix-Metalloprotease (MMP) definiert. Auch wenn bisher keine Komponente der extrazellulären Matrix als SL-3 Substrat bekannt ist, wurde gezeigt, dass das Vorhandensein extrazellulärer Matrixkomponenten essentiell für die Funktion von SL-3 ist (siehe Abschnitt 1.5). Aus diesen Gründen sollten funktionelle Analysen in 3D Zellkulturen unter Anwesenheit von Komponenten der extrazellulären Matrix durchgeführt werden. Dafür wurden Zellen in Matrigel (BD Bioscience; CA), welches durch Isolation von extrazellulärer Matrix des Engelbreth-Holm Sarkoms aus Mäusen gewonnen wird, suspendiert und dieses Gemisch in 12-, „well“ Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden für 7 bis 10 Tage inkubiert.

Damit stand ein Modell zur Testung der SL-3 Aktivität zur Verfügung, welches durch die Anwesenheit extrazellulärer Matrixkomponenten in einer 3D Kultivierung die *in vivo* Situation besser widerspiegelt als übliche 2D Kulturmethoden. Außerdem konnte die SL-3 Wirkung in verschiedenen Stadien der Tumorgenese anhand der beiden Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 untersucht werden.

3.13.3 Morphologie der Klone

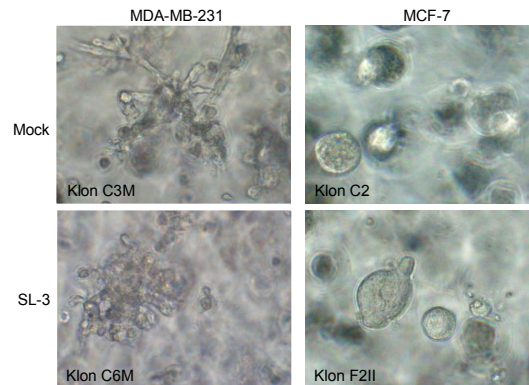


Abb. 37: *Morphologie SL-3 überexprimierender Klone in 3D Kulturen.* Gezeigt sind jeweils typische Beispiele von SL-3 überexprimierenden Klonen („SL-3“) und Leervektor-transfizierten Kontrollklonen („Mock“) der Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7. Es ist zu erkennen, dass die SL-3 überexprimierenden Klone keinen morphologischen Unterschied zu Kontrollklonen aufweisen. Kulturbedingungen: Matrigel, 10% FBS. Ursprüngliche Vergrößerung: 100x

Als ersten und einfachsten Hinweis einer funktionellen Veränderung von Zellen können morphologische Änderungen betrachtet werden. Die SL-3 überexprimierenden Zellklone beider verwendeter Brustkrebszelllinien zeigten weder bei der Verwendung von 1% noch 10% FBS einen morphologischen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollklonen (Abb. 37). MDA-MB-231 Zellen bildeten die für diese Zelllinie typischen invasiven Strukturen, wobei MCF-7 Zellen in gut abgegrenzten Spheroiden wuchsen, wie es für eine nicht invasive Zelllinie zu erwarten ist. Somit konnte aufgrund der Morphologie kein Hinweis auf die Funktion von SL-3 in Brusttumorzelllinien gefunden werden. Im Folgenden sollten funktionelle Tests mit den SL-3 überexprimierenden Klonen durchgeführt werden.

3.13.4 Analyse der Zellzahl

Da tumorrelevante Proteine an Prozessen der Proliferation und / oder Apoptose beteiligt sein können, sollten die Zellzahlen von SL-3 überexprimierenden und Kontrollklonen verglichen werden. Die Zellzahl wurde durch die kolorimetrische Messung eines durch Mitochondrienaktivität der Zellen umgesetzten Substrats („MTS-Test“, Promega Corporation, Mannheim) bestimmt. Um sicherzustellen, dass dieser Test auch in 3D Kulturen angewendet werden kann, wurden verschiedene Zellzahlen ausgesät und die lineare Zunahme des Signals mit steigender Zellzahl nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Um einen repräsentativen Durchschnitt der Zellzahlen von SL-3 überexprimierenden Zellen mit dem von Kontrollzellen vergleichen zu können, wurden drei SL-3 überexprimierende Klone zu gleichen Anteilen vereint und in Matrigel ausgesät. Gleichmaßen wurde mit Kontrollzellen verfahren. Die Aussaat gleicher Zellzahlen von SL-3 überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen wurde jeweils am folgenden Tag in einer separaten Kultur durch einen MTS-Test überprüft.

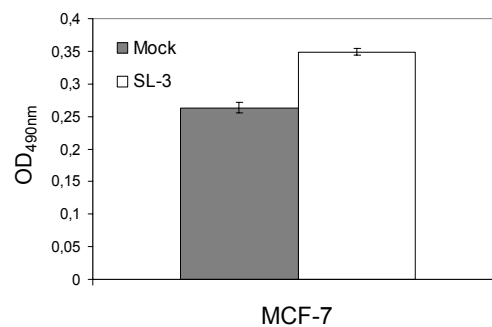


Abb. 38: Auswirkungen der SL-3 Überexpression auf die Zellzahl. Die Zellzahlbestimmung wurde mittels OD-Messung in einem MTS-Test durchgeführt. Die SL-3 überexprimierenden Klone („SL-3“) zeigen eine höhere Zellzahl verglichen mit Kontrollklonen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden („Mock“). Gemische gleicher Zellzahlen von jeweils 3 Klonen wurden ausgesät. Zelllinie: MCF-7. Kulturbedingungen: Matrigel, 10% FBS. Kulturdauer: 7 Tage. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen wurde durch einen MTS-Test festgestellt, dass die Zellzahl durch die SL-3 Überexpression um ca. 15-20% in MDA-MB-231 Zellen und um 20-25% in MCF-7 Zellen erhöht wurde (siehe Abb. 38 sowie Abb. 39).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die SL-3 Überexpression in zwei verschiedenen Zelllinien zu einer Erhöhung der Zellzahl in 3D Kulturen führt. Im Folgenden sollte der Mechanismus dieser Zellzahlerhöhung an den Klonen der fibroblastoiden Zelllinie MDA-MB-231 beispielhaft untersucht werden.

3.13.5 Auswirkung von Wachstumsfaktoren auf die Zellzahl

Da beobachtet wurde, dass der im vorigen Abschnitt beschriebene Effekt abhängig von der Anwesenheit von FBS bzw. Matrigel war, welche beide eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren enthalten (Daten nicht gezeigt), sollten verschiedene Wachstumsfaktoren, von denen eine Assoziation mit Brusttumoren bekannt ist, auf ihren synergistischen Effekt auf die Zellzahlerhöhung durch SL-3 Überexpression getestet werden. Um Sättigungseffekte aufgrund eines Überschusses an Wachstumsfaktoren zu minimieren, wurde nur 1% FBS im Kulturmedium verwendet. Unter diesen Wachstumsbedingungen konnte gezeigt werden, dass der Wachstumsfaktor IGF-1 („insulin like growth factor-1“) den zellzahlerhöhenden Effekt der SL-3 Überexpression stark vergrößert (Abb. 39). Der Faktor HGF (hepatocyte growth factor“) hatte keinen Einfluss auf die Zellzahlunterschiede in SL-3 überexprimierenden Kulturen und der Wachstumsfaktor EGF („epidermal growth factor“) schien den Effekt zu unterdrücken. Außerdem wurde die Zellzahlerhöhung bei Zugabe von 10% FBS durch den MMP-Inhibitor TIMP-2 („tissue inhibitor of matrix proteases“) unterdrückt, was auf einen MMP-spezifischen Effekt hindeutet. Aus Kostengründen wurden keine Mehrfachbestimmungen durchgeführt, so dass diese Ergebnisse als vorläufige Hinweise anzusehen sind. Für 1% FBS, 10% FBS, IGF-1, EGF und TIMP-2 wurden die Daten im Verlauf der Arbeit in separaten Experimenten reproduziert (Daten nicht gezeigt).

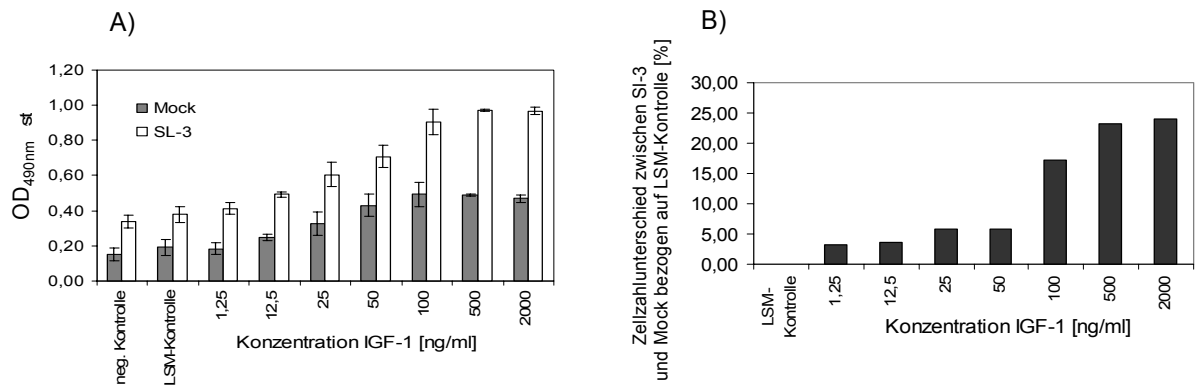


Abb. 40: Auswirkungen steigender IGF-1 Konzentrationen auf die Zellzahlerhöhung durch SL-3 Überexpression. A) Aufgetragen wurde die OD_{490nm} aus dem MTS-Test als Maß für die Zellzahlen von SL-3- und Kontrollklonen. B) Gezeigt ist die Differenz der Zellzahl von SL-3 überexprimierenden und Kontrollklonen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Es ist zu erkennen, dass IGF-1 konzentrationsabhängig die Zellzahlerhöhung SL-3 überexprimierender Klone („SL-3“) im Vergleich zu Leervektor transfizierten Kontrollklonen („Mock“) fördert. Gemische gleicher Zellzahlen von jeweils 3 Klonen wurden ausgesät. Zelllinie: MDA-MB-231. Kulturbedingungen: Matrigel, 1% FBS. Kulturdauer: 7 Tage. LSM: Lösungsmittelkontrolle (100 µM HCl). In allen Ansätzen befanden sich gleiche Mengen Lösungsmittel. Gezeigt sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

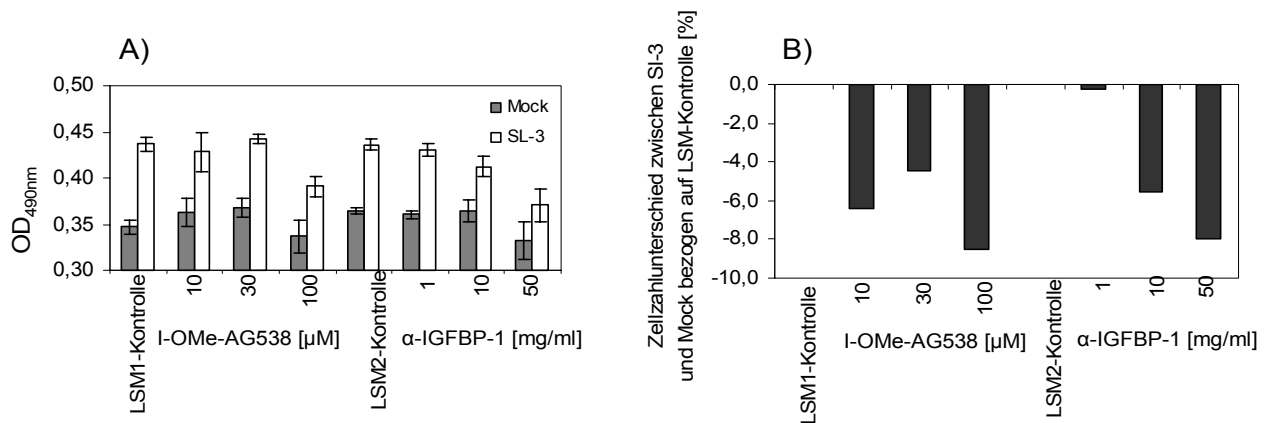


Abb. 41: Auswirkung eines Inhibitors des IGF-1 Rezeptors bzw. eines IGF-1 neutralisierenden Antikörpers auf die Zellzahlerhöhung durch eine SL-3 Überexpression. A) Gezeigt ist die OD_{490nm} des MTS Tests als Maß für die Zellzahlen von SL-3 („SL-3“-) und Leervektor transfizierten Kontrollklonen („Mock“). B) Aufgetragen wurde der Zellzahlunterschied von SL-3 Klonen und Kontrollklonen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Es ist zu erkennen, dass der Zellzahlunterschied zwischen SL-3 überexprimierenden und Kontrollklonen durch den IGF-1 Rezeptorinhibitor I-OMe-AG538 sowie durch einen IGF-1 neutralisierenden Antikörper (α-IGFBP-1) niedriger wird. Gemische gleicher Zellzahlen von jeweils 3 Klonen wurden ausgesät. Zelllinie: MDA-MB-231. Kulturbedingungen: Matrigel, 10% FBS. Kulturdauer: 7 Tage. LSM1-Kontrolle: Lösungsmittelkontrolle für I-OMe-AG538 (0.1% DMSO); LSM2-Kontrolle: Lösungsmittelkontrolle für α-IGFBP-1 (10% PBS). In allen Proben befanden sich gleiche Mengen des entsprechenden Lösungsmittels. Gezeigt sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

3.13.6 Verankerungsunabhängigen Wachstum

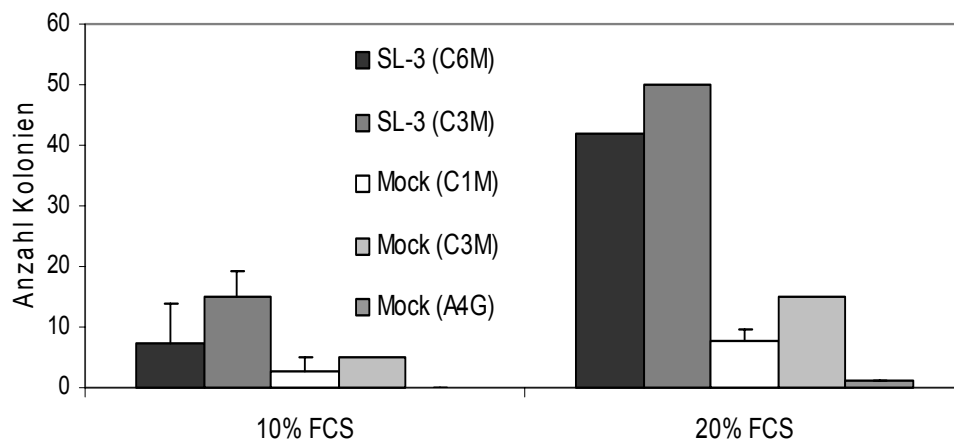


Abb. 42: Wachstum SL-3 überexprimierender Klone in Softagar. Einzelzellen wurden in Softagar ausgesät, um ihre Tumorgenität zu testen. Die SL-3 überexprimierenden („SL-3“) Klone bildeten mehr Kolonien verglichen mit Leervektor-transfizierten Kontrollklonen („Mock“). Zelllinie: MDA-MB-231. Kultur: 5.5 Wochen. Als positiv wurden Kolonien gewertet, die größer als eine gewählte Standardkolonie waren, welche aus ca. 100 Zellen bestand.

Weiterhin sollte getestet werden, ob eine SL-3 Überexpression zu einer erhöhten Tumorgenität der entsprechenden Zellen führt. Dafür wurde ein Softagartest durchgeführt, in dem Zellen ohne Zell-Zellkontakt und ohne Zell-Matrixkontakt in einer inerten Matrix (Agar-Agar) immobilisiert werden. Die Fähigkeit in dieser Matrix Kolonien zu bilden ist ein Zeichen der Tumorgenität der Zellen. Für diesen Test wurden 10% FCS bzw. 20% FCS verwendet, um eine ausreichende Versorgung mit Wachstumsfaktoren und damit ein Überleben der Zellen sicher zu stellen.

Die Anzahl der gebildeten Kolonien in SL-3 überexprimierenden Klonen war ca. 4-fach höher als die der Negativkontrollzellen (Abb. 42). Dieser Effekt war auf Grund der höheren Gesamtzahl an Kolonien bei der Verwendung von 20% FBS deutlicher erkennbar als bei 10% FBS. Es war außerdem festzustellen, dass MDA-MB-231 Zellen nur langsam in Softagar wuchsen und auch nach 5.5 Wochen nur relativ kleine Kolonien vorhanden waren.

Diese Daten zeigen, dass SL-3 *in vitro* zu einer Zunahme der Tumorgenität von Brustkrebszellen führt.

3.14 Funktionelle Analyse von SL-3 überexprimierenden Klonen *in vivo*

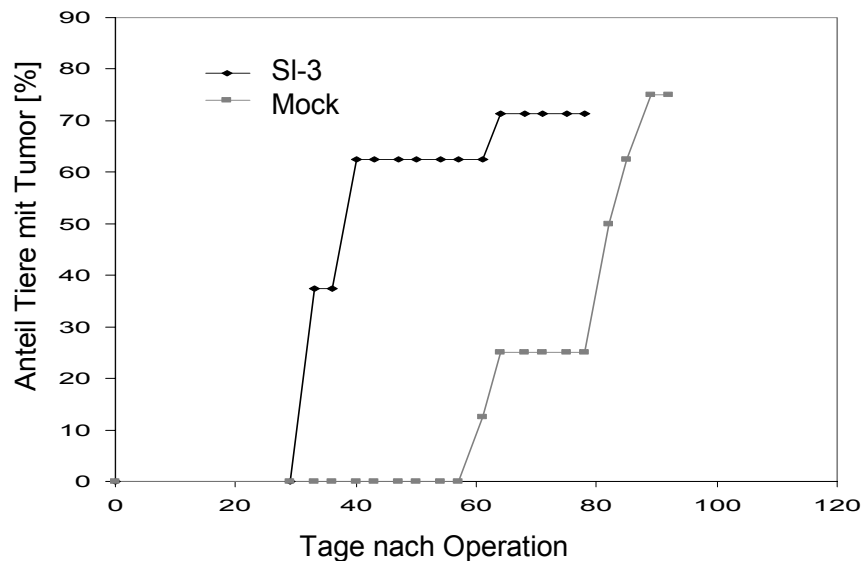


Abb. 43: Auswirkung der SL-3 Überexpression auf die Tumorbildung *in vivo*. Gemische gleicher Zellzahlen von jeweils 3 Klonen wurden in einem PBS/Matrigel (1:1) in das Fettgewebe der Brust von Nackmäusen eingebracht und das Anwachsen der Tumore überprüft. Es ist zu erkennen, dass SL-3 überexprimierende Klone („SL-3“) schneller Tumore bilden als Leervektor-transfizierte Kontrollzellen („Mock“). Jede Gruppe enthielt 8 Tiere. Zellen: MDA-MB-231

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse zur Steigerung der Tumorgenität auf Grund einer SL-3 Überexpression *in vitro* wurden abschließend in einem *in vivo* Modell überprüft. Dazu wurden die beschriebenen Zellklone vermischt mit Matrigel in das Fettgewebe der Brust von Nackmäusen eingebracht. Das Matrigel bietet den Zellen die Möglichkeit der Verankerung in der extrazellulären Matrix und stellt Wachstumsfaktoren zur Verfügung. Die Tierarbeiten wurden freundlicher Weise von Dr. Matthias Reule ausgeführt.

Für die Beobachtung der Tumoranwachsraten wurden MDA-MB-231 Zellen in einem PBS/Matrigelgemisch (1:1) in die Mäuse eingebracht. Die Verdünnung des Matrigels führt dazu, dass Tumore langsamer anwachsen und somit Unterschiede besser erkennbar sind. Tiere, denen SL-3 überexprimierende Klone injiziert wurden, bildeten zwischen Tag 33 und Tag 61 Tumore (Abb. 43), wobei Tumore aus Kontrollzellen zwischen Tag 61 und Tag 89 entstanden. Diese Daten zeigen, dass die für SL-3 überexprimierende MCF-7 Zellen beschriebene Erhöhung der Tumoranwachsraten [Noel *et al.*, 1996] auch für die aggressivere Brusttumorzelllinie MDA-MB-231 zutrifft.

Um das Tumolvolumen zu analysieren wurden die Zellen mit unverdünntem Matrigel injiziert. Bei Verwendung von MDA-MB-231 Zellklonen war ab Tag 35 nach der Operation eine stärkere Zunahme des Volumens der Tumore, die aus SL-3 überexprimierenden Zellen entstanden waren im Vergleich zu Tumoren aus Kontrollzellen zu beobachten (Abb. 44). Bei Beendigung des Versuchs

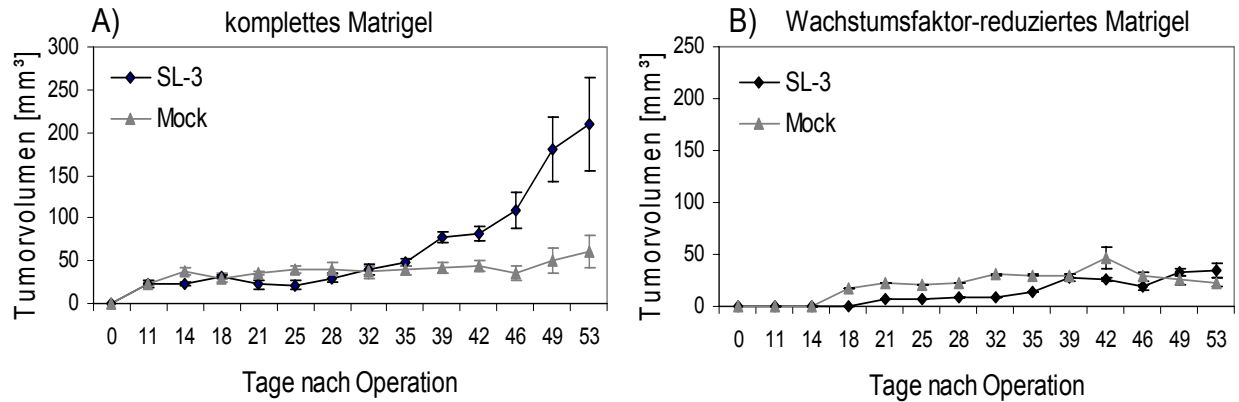


Abb. 44: Auswirkung der SL-3 Überexpression auf das Tumorvolumen von MDA-MB-231 Zellen. Gezeigt ist A) das Tumorvolumen bei Verwendung von komplettem Matrigel und B) bei Verwendung von Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel. Es ist zu erkennen, dass SL-3 überexprimierende Klone („SL-3“) größere Tumore bilden als Leervektor-transfizierte Kontrollzellen („Mock“) und dass dieser Effekt von der Anwesenheit kompletten Matrigels abhängig ist. Gemische gleicher Zellzahlen von jeweils 3 Klonen wurden mit Matrigel in das Fettgewebe der Brust von Nacktmäusen injiziert und das Tumorvolumen alle 3-4 Tage vermessen. Jede Gruppe enthielt 8 Tiere. Zellen: MDA-MB-231

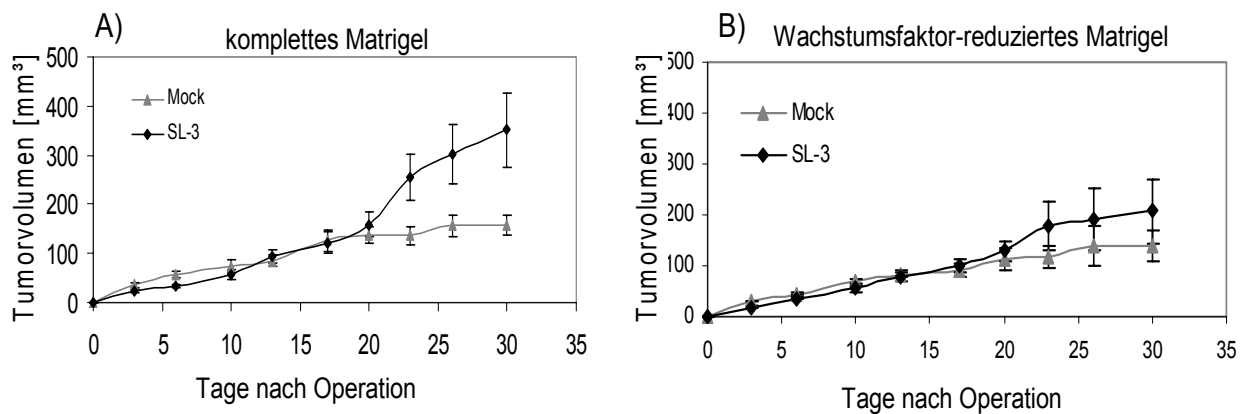


Abb. 45: Auswirkung der SL-3 Überexpression auf das Tumorvolumen von MCF-7 Zellen. Aufgetragen wurde A) das Tumorvolumen bei Verwendung von komplettem Matrigel und B) bei Verwendung von reduziertem Matrigel. Es ist ersichtlich, dass SL-3 überexprimierende Klone („SL-3“) größere Tumore als Leervektor-transfizierte Kontrollzellen („Mock“) bilden und dass dieser Effekt abhängig von der Anwesenheit kompletten Matrigels ist. Gemische gleicher Zellzahlen von jeweils 3 Klonen wurden mit Matrigel in das Fettgewebe der Brust von Nacktmäusen injiziert. Jede Gruppe enthielt 8 Tiere. Zellen: MCF-7. Den Tieren wurde 1 Woche vor Operation Östrogenpellets eingesetzt, da MCF-7 östrogenabhängig wächst.

(Tag 53 nach Operation) hatten die Tumore aus SL-3 überexprimierenden Zellen ein durchschnittliches Volumen von 210 mm³ erreicht, wobei die Kontrolltumore im Durchschnitt 61 mm³ groß waren ($p=0.020$). Bei Verwendung von Matrigel, welchem durch eine Salzfällung Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, so z.B. Wachstumsfaktoren entzogen wurde („reduziertes Matrigel“), war kein Unterschied im Volumen von Tumoren aus SL-3 überexprimierenden Zellen (durchschnittliches Volumen = 35 mm³) im Vergleich zu Kontrolltumoren (durchschnittliches Volumen = 23 mm³) an Tag 50 nach der Operation zu beobachten ($p=0.287$).

Ähnliche Ergebnisse wurden mit MCF-7 Zellen erzielt. Ab Tag 20 nach der Operation war eine stärkere Zunahme des Tumorumfanges bei Tumoren, die aus SL-3 überexprimierenden MCF-7 Zellen hervorgegangen waren, verglichen mit denen der Kontrollzellen zu verzeichnen (Abb. 45). An Tag 30 wurde der Versuch auf Grund des schlechten Allgemeinzustandes der Tiere abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tumore der SL-3 überexprimierenden Zellen ein durchschnittliches Volumen von 351 mm³. Hingegen die Tumore, die aus den Kontrollzellen entstanden waren, hatten ein Volumen von 157 mm³ ($p=0.043$). Dieser Effekt war nicht zu beobachten, wenn reduziertes Matrigel verwendet wurde. An Tag 30 nach der Operation hatten die Tumore aus SL-3 überexprimierenden Zellen ein durchschnittliches Volumen von 208 mm³ und die Kontrolltumore waren im Durchschnitt 140 mm³ groß ($p=0.374$) (Abb. 45).

Diesen Daten zeigen somit, dass SL-3 *in vivo* zu einer erhöhten Tumorraten sowie zu einem größeren Tumorumfang führt und dass der molekulare Mechanismus wahrscheinlich abhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren ist. Somit wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Erhöhung der Tumorigenität von Brusttumorzellen durch SL-3 Überexpression nachgewiesen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die im Mammakarzinom auf mRNA Ebene überexprimierte Gene LIV-1 und Stromelysin-3 als potentielle Zielmoleküle einer Medikamentenentwicklung sowie als mögliche prognostische Marker validiert. Dafür wurde das Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene im Mammakarzinom sowie in Normalgeweben anderer Organe analysiert. Für das auf Proteinebene unterexprimierte LIV-1 wurde außerdem das prognostische Potential validiert. Da Stromelysin-3 auf mRNA- und Proteinebene im Mammakarzinom überexprimiert war, wurde die Tumorrelevanz des Proteins *in vitro* und *in vivo* untersucht. Für SL-3 wurde die prognostische Relevanz nicht analysiert, da diese bereits beschrieben war [Ahmad *et al.*, 1998].

4.1 Expressionsanalyse von *LIV-1* mRNA

4.1.1 Vergleich der verwendeten Methoden

Die *LIV-1* mRNA Expressionshöhen wurden mit drei verschiedenen Methoden an Tumor- und Normalgeweben der Brust in unterschiedlichen Patientengruppen bestimmt: Affymetrix Genchip Hybridisierung, quantitative RT-PCR („TaqMan™“) sowie *in situ* Hybridisierung (*ISH*). Bei einem Vergleich der Methoden zeigte sich, dass trotz gleicher Definition der Überexpression ($Tu/N \geq 2$) die quantitative RT-PCR (47%) und die *ISH* (53%) höhere Prozentsätze an Proben mit Überexpression von *LIV-1* in Tumor- verglichen mit Normalgewebe lieferten als Genchip Analysen (25%). Durch Auswertung öffentlich zugänglicher Daten von Genchip Hybridisierungen mit Brusttumorgewebe wurden die Ergebnisse der Genchipexperimente der vorliegenden Arbeit bestätigt (Überexpression von *LIV-1* in 33% der Mammakarzinome [Perou *et al.*, 1999]). Der niedrigere beobachtete Prozentsatz einer *LIV-1* Überexpression in den Genchip Hybridisierungen könnte auf ein schnelleres Erreichen des Sättigungsbereiches zurückgeführt werden. Dies ist nahe liegend, da hohe Mengen an *LIV-1* Transkript in den Zellen vorhanden sind (*LIV-1* war bis zu 8-fach höher exprimiert als *GAPDH*, Abschnitt 3.1.2.1). Mit Genchip Hybridisierungen kann ein Bereich über einen maximal 250-fachen Unterschied der Konzentrationen linear aufgelöst werden (Affymetrix: 25mer_technote.pdf), wohingegen für „Taqman™“-Analysen gezeigt wurde,

dass der Logarithmus der c_t -Werte in einem Bereich von mindestens 1000-fachen Konzentrationsunterschieden linear zunimmt (eigene Ergebnisse, siehe Abschnitt 2.9.3)

Da die maximal detektierten Unterschiede bei der *LIV-1* spezifischen quantitativen RT-PCR bei >500-fach lagen, ist anzunehmen, dass die entsprechenden Signale der Genchip Analyse nicht linear mit der Konzentration an *LIV-1* zunahm und dadurch ein geringerer Anteil an Überexpression detektiert wurde. Die gleiche Erklärung könnte auch für den niedrigeren Prozentsatz an Tumoren mit einer *LIV-1* Unterexpression im Falle der Genchip Experimente zutreffen (39% bei quantitativer RT-PCR und 8% bei Genchip Hybridisierungen). In diesen Fällen könnten zusätzlich niedrige Expressionswerte bei den statistischen Auswertungen der Genchip Hybridisierungen als nicht signifikante Signale erkannt und damit die Proben aus der Analyse ausgeschlossen worden sein.

Da es aus technischen Gründen schwer möglich ist, den linearen Messbereich der ISH zu bestimmen, kann für diese keine Aussage zur Verlässlichkeit der Quantifizierung gemacht werden. Allerdings ist für diese Methode zu beachten, dass ausschließlich Epithelzellen betrachtet werden. In der quantitativen RT-PCR sowie bei den Genchip Experimenten wurde zwar mikrodissertierte Proben, d.h. mit Epithelzellen angereichertes Material, verwendet, aber wie in Abschnitt 3.9.2 nachgewiesen, sind dennoch nicht vernachlässigbare und in ihrer Höhe variierende Anteile anderer Zelltypen vorhanden. Da *LIV-1* in Normalgeweben auch eine stromale Expression zeigte, könnten diese Unterschiede in der Probenzusammensetzung die Ergebnisse der verschiedenen Methoden beeinflussen.

Eine andere Erklärung für Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den verwendeten Methoden wäre die Zusammensetzung der verschiedenen Patientengruppen. Da diese aber hinsichtlich des histologischen Tumortyps und, insofern bekannt, hinsichtlich des ÖR-Status ähnlich waren, ist das unwahrscheinlich.

Eine positive Korrelation von *LIV-1* mRNA Expressionshöhe mit einem positiven Östrogenrezeptor- α (ÖR)-Status und die fehlende Assoziation von *LIV-1* Expressionshöhe und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen konnte mit den beiden Methoden ISH sowie Genchip Hybridisierung gezeigt werden. Für die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR kann hierzu keine Aussage getroffen werden, da die vorhandenen klinischen Daten für eine statistische Analyse nicht umfassend genug waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit allen drei Methoden eine Überexpression von *LIV-1* mRNA im Brusttumorgewebe detektiert wurde, diese aber quantitativ unterschiedlich war, was wahrscheinlich auf Unterschiede in der Sensitivität bzw. der Größe des linearen Messbereiches der Methoden zurückzuführen ist.

4.1.2 Expression im Mammakarzinom

Anhand der Ergebnisse der quantitativen RT-PCR und der ISH kann festgestellt werden, dass bei ausschließlicher Betrachtung von Epithelzellen *LIV-1* in ca. der Hälfte der Brusttumorzellen im Vergleich zu Brustnormalgewebe überexprimiert ist. Zu dem gleichen Ergebnis kommt eine Studie von Manning und Mitarbeitern die allerdings insgesamt nur 10 Tumor/Normalpaare analysiert, so dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit statistisch besser abgesichert werden konnten [Manning *et al.*, 1995].

Desweiteren wurde festgestellt, dass die mRNA Expressionshöhen von *LIV-1* in den Brustnormalgeweben der jeweiligen Patienten heterogen sind (siehe Abschnitt 3.1.2.1 und 3.1.3.2), was ebenfalls in der Arbeit von Manning und Mitarbeitern deutlich wird [Manning *et al.*, 1995]. Dies könnte spezifisch für das jeweilige Individuum sein. Es ist außerdem denkbar, dass *LIV-1* unter bestimmten physiologischen Bedingungen in unterschiedlichen Mengen exprimiert wird. So könnte sich die *LIV-1* Expression z.B. während des Menstruationszyklus ändern, da die Östrogenkonzentration zyklisch ansteigt bzw. abfällt und *LIV-1* durch dieses Hormon reguliert wird [El-Tanani & Green, 1997; Manning *et al.*, 1988].

Um unterschiedliche *LIV-1* Expressionshöhen Patientengruppen mit bestimmten Charakteristika zuordnen zu können, wurden die *LIV-1* mRNA Transkriptmengen mit verschiedenen klinischen Parametern korreliert. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer hohen *LIV-1* Expression und einem positiven Östrogenrezeptor- α (ÖR)-Status wurde in dieser Arbeit mittels Genchip Analyse an 26 Tumorproben sowie ISH an weiteren 106 Tumorproben nachgewiesen. Diese Assoziation wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben [Dressman *et al.*, 2001; el-Tanani & Green, 1996b; El-Tanani & Green, 1997; Korkola *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 1988]. Auch bei einer Auswertung öffentlich zugänglicher Genchip Hybridisierungsdaten von Brusttumorgewebe ist der ÖR das Gen mit dem ähnlichsten Expressionsmuster zu *LIV-1* [Perou *et al.*, 1999; Perou *et al.*, 2000].

Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass invasiv duktales Karzinome (IDC) durchschnittlich mehr *LIV-1* Transkript exprimieren als invasiv lobuläre Karzinome (ILC) wurde bisher noch nicht beschrieben. Es ist allerdings bekannt, dass diese beiden Typen des Brutkarzinoms sich nicht nur histologisch, sondern auch in ihrem Expressionsmuster deutlich voneinander unterscheiden [Korkola *et al.*, 2003]. So geht z.B. die Expression von E-Cadherin in ILCs häufiger verloren als in IDCs [Moll *et al.*, 1993]. Auch auf genomischer Ebene wurden Unterschiede beschrieben, z.B. ist ein Verlorengang des Chromosomenarms 16q und ein Zugewinn des Chromosomenarms 1q charakteristisch für ILCs [Gunther *et al.*, 2001; Nishizaki *et al.*, 1997]. Es gibt Studien die darauf hindeuten, dass das Metastasierungsmuster der beiden Tumortypen unterschiedlich ist [Borst & Ingold, 1993; Jain *et al.*, 1993] und dass lobuläre Karzinome weniger gut auf eine neoadjuvante Therapie ansprechen [Newman *et al.*, 2002]. Die hier gezeigte hohe *LIV-1* Expression in IDCs scheint demnach eine weitere Charakteristik dieser Karzinome darzustellen und könnte für die

Diagnose der unterschiedlichen Tumortypen auf molekularer Ebene benutzt werden.

Anhand zweier unabhängiger Methoden an unterschiedlichen Patientengruppen konnte die Unabhängigkeit der mRNA Expressionshöhe von *LIV-1* im primären Tumor und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu wurde in einer anderen Arbeit eine Assoziation zwischen hoher *LIV-1* Expression und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen beschrieben [Manning *et al.*, 1994]. In der Studie wurde auch gezeigt, dass die Korrelation zwischen *LIV-1* Expression und Lymphknotenstatus nicht in ÖR positiven Tumoren mit einem Grad 3 oder einer Größe über 2 cm gegeben ist.

Diese abweichenden Ergebnisse könnten auf die Zusammensetzung des Patientenkollektivs zurückgeführt werden. Das in der vorliegenden Arbeit analysierte Patientenkollektiv enthielt einen höheren Anteil an aggressiven Tumoren verglichen mit der Studie von Manning und Mitarbeitern [1994]. Allerdings wurden trotz einer Untergruppierung der Tumore in ÖR positive Tumoren bzw. ÖR positiven Tumore mit einem Grad 2 die beschriebenen Ergebnisse nicht bestätigt [Manning *et al.*, 1994], obwohl die Untergruppen ähnliche Patientenzahlen enthielten.

Daher ist es wahrscheinlicher, dass die widersprüchlichen Resultate durch methodische Unterschiede hervorgerufen wurden. In der erwähnten Studie [Manning *et al.*, 1994] wurden Northern Blot Analysen benutzt, wohingegen in der vorliegenden Arbeit Genchip Hybridisierungs- sowie ISH-Experimente ausgewertet wurden. Ein weiterer entscheidender Unterschied ist, dass in der Publikation von Manning und Mitarbeitern [1994] Gesamttumorgewebe, d.h. ein Gemisch von Tumor- und Stromazellen eingesetzt wurde. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde in der ISH nur die Färbung in Epithelzellen betrachtet und für die Genchipexperimente mikrodissertiertes Material, d.h. angereicherte Epithelzellen verwendet. Da eine stromale Expression von *LIV-1* mRNA gezeigt wurde, könnte dieses unterschiedliche Verhältnis der verschiedenen Zelltypen die Abweichungen der Ergebnisse erklären. Um dieser Frage weiter nachzugehen, könnte eine Analyse der *LIV-1* Expression in Stromazellen und deren Korrelation mit dem Lymphknotenstatus durchgeführt werden.

Die Daten der vorliegenden Studie bestätigen demnach die Assoziation von *LIV-1* mRNA Expressionshöhen mit dem ÖR-Status in Brusttumoren. Außerdem wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen *LIV-1* Transkriptmengen und dem histologischen Typ sowie die fehlende Korrelation zwischen dem Lymphknotenstatus und den *LIV-1* mRNA Expressionshöhen in Epithelzellen gezeigt.

4.1.3 Expression in Normalgeweben

Die Expression von *LIV-1* mRNA wurde in humanen Normalgeweben von 21 verschiedenen Organen durch quantitative RT-PCR untersucht. Die höchsten Expressionswerte waren dabei in Brustgewebe gefolgt von anderen hormonabhängigen Organen (Prostata, Hirnanhangdrüse und Plazenta) zu verzeichnen. Mit Ausnahme von Kolon exprimierten die restlichen Organe wesentlich weniger *LIV-1* mRNA. Diese Daten stimmten mit dem von Taylor und Mitarbeitern [2003] publizierten Expressionsmuster in Normalgeweben überein und weisen auf eine hormonabhängige Induktion von *LIV-1* in anderen Organen außer der Brust hin. Da die *LIV-1* Expression in ca. 50% der Brusttumore höher als im Brustnormalgewebe exprimiert ist (siehe Abschnitt 4.1.2) ist sie damit auch höher als in allen anderen untersuchten Normalgeweben. Dies war ein Hinweis auf ein mögliches therapeutisches Fenster im Falle einer *LIV-1* spezifische Therapie.

Durch die Expressionsanalyse der *LIV-1* mRNA konnte somit eine Überexpression im Brusttumorgewebe und eine dazu niedrigere Expression in Normalgeweben gezeigt werden. Wenn sich diese Daten auf Proteinebene bestätigen würden, könnte *LIV-1* einen guten Kandidaten zur Medikamentenentwicklung darstellen.

4.2 Subzelluläre Lokalisation von *LIV-1*

Um einen möglichen Ansatz zur *in vivo* Inhibition eines Proteins im Rahmen einer Therapie zu erarbeiten, ist die subzelluläre Lokalisation entscheidend. So können Proteine, die sich in der Plasmamembran befinden z.B. mit funktionellen Antikörpern angegriffen werden. Wohingegen für Proteine, die sich innerhalb der Zelle befinden, üblicher Weise kleine inhibitorische Moleküle entwickelt werden.

Kofärbungen von *LIV-1* mit Markerproteinen für verschiedene Zellkompartimente zeigten, dass endogenes *LIV-1* in den beiden Brusttumorzelllinien MCF-7 sowie ZR-75-1 im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Diese Ergebnisse bestätigen die *in silico* vorhergesagte wahrscheinlichste Lokalisation des Proteins. Für die meisten anderen Mitglieder der LZT („*LIV-1* like Zinktransporter“) Proteinfamilie wird ebenfalls als wahrscheinlichster Lokalisationsort das endoplasmatische Retikulum durch Vorhersageprogramme angegeben [Taylor & Nicholson, 2003]. HKE4, ein humanes Mitglied der LZT Familie, kolokalisierte ebenfalls mit Markerproteinen des endoplasmatischen Retikulums [Taylor *et al.*, 2004]. Gleiches gilt für Ermelin, dem *LIV-1* homologen Protein in der Maus. Allerdings sind dies erst vorläufige Daten, da in der Studie mit einer N-terminal verkürzten Form des Proteins gearbeitet wurde [Suzuki & Endo, 2002].

In einer Arbeit von Taylor und Mitarbeitern [2003] wurde eine *LIV-1* cDNA, welcher sechs Aminosäure fehlten und die mit einem Histidin- sowie V5-„tag“ fusioniert war, transient in CHO („chinese hamster ovary“) Zellen überexprimiert. In diesem System wurde ein Anteil des überexprimierten *LIV-1* in der Plasmamembran detektiert. In dieser Studie wurde eine

Lebendzellsfärbung durchgeführt, in der allerdings die Zellen vor der Antikörperinkubation mit 4 % Formaldehyd fixiert wurden. Dies könnte zu einer zumindest teilweisen Permeabilisierung der Zellen führen und dadurch eine Detektion intrazellulärer Proteine ermöglichen (Dr. Esmeralda Heiden, persönliche Mitteilung). Die abweichende Lokalisation von LIV-1 in der Arbeit von Taylor und Mitarbeitern [2003] könnte demnach sowohl durch Unterschiede in der benutzten Methode und der cDNA als auch durch die Überexpression von LIV-1 hervorgerufen werden. Eine Plasmamembranlokalisation von LIV-1 aufgrund der abweichenden Zellsysteme ist unwahrscheinlich, da in 21 verschiedenen Normalgeweben eine intrazelluläre Färbung beobachtet wurde (siehe Abschnitt 3.7).

In der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmalig LIV-1 als ein Protein beschrieben, welches mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass LIV-1 kein geeigneter Kandidat zur Entwicklung eines funktionellen Antikörpers wäre, sondern für eine potentielle Therapieentwicklung kleine Moleküle gesucht werden müssten.

4.3 Expressionsanalyse von LIV-1 Protein

4.3.1 Expression im Mammakarzinom

Um festzustellen ob das LIV-1 Proteinexpressionsmuster dem der mRNA entspricht, wurden die gleichen Brusttumorproben der *in situ* Hybridisierung mittels Immunhistochemie untersucht. Dadurch wurde gezeigt, dass die *LIV-1* mRNA Mengen weder in Brusttumor- noch in Brustnormalgewebe mit den Proteinkonzentrationen korrelieren. Diese Beobachtung wurde auch anhand weiterer Proben (Brusttumorzelllinien, verschiedene Normalgewebe) und unabhängiger Methoden (quantitative RT-PCR, Western Blot) bestätigt.

Trotz der allgemeinen Annahme, dass mRNA Konzentrationen mit Proteinkonzentrationen über die Translation der mRNA verbunden sind, scheint die Regulation auf Proteinebene und eine damit verbundene fehlende Assoziation zwischen Protein- und mRNA Expressionshöhen ein weit verbreitetes Phänomen zu sein. Die meisten Studien zu diesem Problem wurden in Hefe oder durch Expressionsanalysen an Tumorgewebe durchgeführt (für einen Übersichtsartikel siehe [Greenbaum *et al.*, 2003]). Zum Beispiel wurde anhand einer Analyse von 150 Genen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, dass die Korrelation zwischen mRNA Expressions- und Proteinexpressionshöhen nicht ausreichte, um Proteinexpressionsmengen anhand quantitativer mRNA Daten vorauszusagen [Gygi *et al.*, 1999].

Auch für zahlreiche andere Gene wurde beschrieben, dass es keine Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmengen gibt. Zum Beispiel zeigte der Vergleich von mRNA- und Proteindaten von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in benignem sowie malignem Prostatagewebe [Lichtinghagen *et al.*, 2002] keinen signifikanten Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinexpressionshöhen. Auch für die Zinktransporterproteine ZnT6, ZnT5 und ZnT3 wurde gezeigt, dass die mRNA- und

Proteinexpressionshöhen unabhängig voneinander reguliert werden [Henshall *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2002; Palmiter *et al.*, 1996]. Diese Daten deuten auf eine komplexe Regulation der Proteintranslation bzw. -stabilität von zumindest einigen Zinktransporterproteinen hin [McCarthy, 1998].

Durch die fehlende Korrelation von mRNA- und Proteinmengen ergab sich ein von dem mRNA-abweichendes LIV-1 Proteinexpressionsmuster in Brusttumoren. LIV-1 war in relativ hohen Konzentrationen in zahlreichen Brustnormalgeweben vorhanden, was bei einem Vergleich mit dem entsprechenden Tumorgewebe dazu führte, dass LIV-1 häufiger unter- als überexprimiert war. Außerdem wurde die in Abschnitt 4.1.2 diskutierte Assoziation von *LIV-1* mRNA und dem ÖR-Status bzw. dem histologischen Typ auf Proteinebene nicht bestätigt. Eine hohe LIV-1 Expressionshöhe im Tumorgewebe korrelierte aber mit einer geringen Größe und einem niedrigen Grad des Tumors – Zusammenhänge, die auf mRNA Ebene nicht beobachtet wurde. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine hohe LIV-1 Expression mit weniger aggressiven Tumoren assoziiert ist.

Somit zeigt das Proteinexpressionsmuster von LIV-1 die Charakteristik von Tumorsuppressoren [Oesterreich & Fuqua, 1999]. Ausgehend von der Überexpression der *LIV-1* mRNA wurde allerdings eine onkogene Aktivität von LIV-1 gemutmaßt. Damit ist LIV-1 ein weiteres Beispiel, dass mRNA Daten, die durch die breite Anwendung von Genchip Hybridisierungen oder SAGE Analysen derzeit in großen Mengen zugänglich sind (z.B. <http://genome-www.stanford.edu/> oder http://sciencepark.mdanderson.org/ggeg/SAGE_Proj_7.htm), nur als vorläufiger Hinweis zu betrachten sind, insofern als Endpunkt der Analyse die Menge oder gar die Aktivität eines Proteins stehen sollte.

4.3.2 Expression in Normalgeweben

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die relativ homogene und hohe Expression von LIV-1 Protein in verschiedenen humanen Normalgeweben gezeigt. Auch essentielle Organe wie Hirn, Leber und Herz exprimierten hohe Mengen an LIV-1 im Vergleich zu Brusttumorgewebe. Zusätzlich wurde eine Expression von LIV-1 in Endothelzellen und stromalen Zellen einiger Gewebe beobachtet. Diese ubiquitäre Expression von LIV-1 deutet auf eine grundlegende physiologische Funktion in vielen Normalgeweben sowie in verschiedenen Zelltypen hin.

Es kann aufgrund der Analyse des Expressionsmuster von LIV-1 festgestellt werden, dass die hohe LIV-1 Proteinexpression in lebenswichtigen Organen schwere Nebenwirkungen im Falle einer LIV-1 spezifischen Therapie vermuten lässt. Außerdem zeigt das Protein im Gegensatz zur mRNA ein typisches Expressionsmusters eines Tumorsuppressors und nicht eines Onkogens. Damit ist LIV-1 als potentielles Ziel eines inhibitorischen Therapieansatzes für das Mammakarzinom ungeeignet.

4.4 LIV-1 Proteinmenge als prognostischer Marker

Da die LIV-1 Proteinexpression mit weniger aggressiven Tumoren assoziiert war, wurde weiterhin untersucht, ob die Proteinmenge als eigenständiger prognostischer Marker geeignet ist. In dem untersuchten Patientenkollektiv waren der Lymphknotenstatus sowie die Tumorgroße prognostisch für die Länge des krankheitsfreien Intervalls. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Studien und zeigt, dass das Patientenkollektiv repräsentativ zusammengesetzt ist [Schnitt, 2001]. Statistische Analysen wiesen nach, dass Patienten mit LIV-1 hochexprimierenden Tumoren im Durchschnitt ein doppelt so langes krankheitsfreies Intervall (KFI) haben verglichen mit Patienten deren Tumore wenig LIV-1 exprimierten.

Die hier verwendete Methode (IHC) wird in diagnostischen Laboren bereits routinemäßig, z.B. für die Bestimmung des ÖR- sowie PR-Status, angewendet. Darüber hinaus ist das benutzte System zur Quantifizierung der Färbung sehr gut reproduzierbar [Allred *et al.*, 1998] und der Schwellenwert für die Einteilung in LIV-1 positive- bzw. negative Tumore konnte um 1.5 Einheiten des Quantifizierungssystems variiert werden, ohne dass die Korrelation von hoher LIV-1 Expression und längerem KFI verloren ging. Dies zeigt die Robustheit des Systems sowie die relativ unkomplizierte Anwendung und damit mögliche Einführung von LIV-1 als neuen diagnostischen Marker. Derzeit werden für die Abschätzung der Prognose von Mammakarzinomen üblicher Weise die Parameter Lymphknotenstatus, ÖR-Status, Tumorgroße, Grad der Erkrankung und Alter des Patienten herangezogen [Page *et al.*, 1998; Schnitt, 2001]. Da trotz Beachtung dieser Parameter für die Therapieentscheidung ein hoher Prozentsatz der Patienten nicht auf die ausgewählte Behandlung anspricht, besteht ein dringender Bedarf an neuen und besseren prognostischen Markern [Schnitt, 2001].

Für eine klinische Anwendung der LIV-1 Proteinmenge als prognostischen Marker wäre der in dieser Arbeit beschriebene polyklonale Kaninchen-Antikörper allerdings ungeeignet, da nur begrenzte Mengen erhältlich sind und die Antikörper verschiedener Immunisierungen sehr heterogen sein können (persönliche Beobachtung). Für diesen Zweck müsste ein monoklonaler Antikörper hergestellt und mit diesem die hier erzielten Ergebnisse in einer prospektiv angelegten Studie überprüft werden.

4.5 *LIV-1* mRNA Menge als Marker des funktionellen Östrogenrezeptors

Da der ÖR-Status im klinischen Alltag bedeutend für eine Auswahl der Patienten für eine anti-hormonale Therapie ist [Bettag *et al.*, 2004] und *LIV-1* mRNA Expression durch den ÖR reguliert wird [el-Tanani & Green, 1995; El-Tanani & Green, 1997; Manning *et al.*, 1988], wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die *LIV-1* mRNA Menge als Marker eines funktionellen ÖR eingesetzt werden kann. Die Bestimmung der transkriptionellen Aktivität des ÖR ist essentiell für die Entscheidung für oder gegen eine Therapie mit Antiöstrogenen, da in ca. 20% der Tumore der

ÖR zwar vorhanden ist, aber dieser nicht mehr auf das Hormon reagiert und somit ein Ansprechen auf eine anti-hormonale Therapie unwahrscheinlich ist [Clarke *et al.*, 2001b].

Weder der ÖR-Status noch die *LIV-1* mRNA Expressionshöhen hatten eine signifikante prognostische Relevanz für die Länge des KFI. Selbst wenn der Progesteronrezeptor (PR), welcher durch den ÖR reguliert wird, als Marker für einen funktionellen ÖR verwendet wurde, konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen positivem ÖR-Status und besserer Prognose beobachtet werden. Dies bestätigt Literaturangaben, dass der ÖR und der PR relativ schwache prognostische Marker sind [Schnitt, 2001]. Wenn aber eine hohe *LIV-1* mRNA Expression als Marker für einen funktionellen ÖR benutzt wurde, erreichte die prognostische Eigenschaft des ÖR Status das 5% Signifikanzniveau. 50% der ÖR negativen Tumore waren *LIV-1*-positiv, was auf die bereits bekannte Regulation von *LIV-1* durch andere, ÖR-unabhängige Faktoren zurückzuführen sein könnte [el-Tanani & Green, 1995]. Dies würde erklären, warum *LIV-1* mRNA Expressionshöhen nur in Verbindung mit dem ÖR Status, aber nicht an sich prognostisch sind.

Die Beobachtung, dass *LIV-1* mRNA Expressionshöhen einen besseren Marker für einen funktionellen ÖR darstellen als die bisher im klinischen Alltag verwendete Proteinexpressionshöhe des Progesteronrezeptors, kann in der Unabhängigkeit der *LIV-1* Proteinexpression von der mRNA Expression begründet liegen. Da der PR im Brustgewebe in Prozesse wie Proliferation und Differenzierung involviert ist, haben Änderungen der Expressionshöhe dieses Proteins höchstwahrscheinlich Auswirkungen auf die tumorigenen Eigenschaften der Zellen [Lanari & Molinolo, 2002]. Der PR wurde sogar als wichtiger Faktor für die Induktion, Progression und Erhaltung von Neoplasien der Brust diskutiert [Goepfert *et al.*, 2000]. Somit unterliegen Zellen mit unterschiedlicher PR Expression einem Selektionsdruck. Im Gegensatz dazu werden die Proteinmengen von *LIV-1* anscheinend unabhängig von den mRNA Expressionshöhen reguliert (siehe Abschnitt 3.6.1) und eine Änderung der *LIV-1* Transkriptmenge könnte demnach ohne funktionelle Konsequenzen für die Zelle stattfinden. Daher ist es denkbar, dass die *LIV-1* mRNA Expression wesentlich direkter als der PR-Status die transkriptionelle Aktivität des ÖR reflektiert und deswegen ein besser geeigneter Marker für die Charakterisierung der Funktionalität des ÖR ist.

Der ÖR- und PR-Status wird derzeit in Brusttumoren in der klinischen Routine durch IHC oder ELISA bestimmt. Zum einen dient diese Information dazu, Patienten in unterschiedliche Risikogruppen einzuteilen, da ein positiver ÖR Status auf einen höheren Differenzierungsgrad der Tumoren und damit auf eine bessere Prognose hinweist [Aamdal *et al.*, 1984; Battaglia *et al.*, 1988; Gago *et al.*, 1998]. Die weitaus größere Bedeutung in der Bestimmung des ÖR- und PR-Status liegt jedoch in der Auswahl derjenigen Brusttumortumoren, die eine anti-hormonale Therapie erhalten sollen.

Derzeit wird üblicher Weise Tamoxifen zur adjuvanten Behandlung ÖR positiver Patienten eingesetzt. Dieses Molekül hat antagonistische aber auch schwach agonistische Eigenschaften gegenüber dem ÖR. Allerdings sprechen nur ca. 70% der Patienten mit ÖR positiven Brusttumoren

auf Tamoxifen an [Honig, 1996]. Da Tamoxifen schwere Nebenwirkungen wie Thrombosen und Tumore des Endometriums hervorrufen kann [Clarke *et al.*, 2001b] und außerdem wertvolle Zeit im Falle einer wirkungslosen Therapie verloren geht, werden dringend bessere bzw. weitere Marker für ein Ansprechen auf eine Tamoxifentherapie benötigt. Als alternative Behandlung können z.B. Aromataseinhibitoren verabreicht werden [Johnston & Dowsett, 2003].

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass in der vorliegenden Arbeit die Bedingung für die Funktionalität des ÖR, nämlich eine *LIV-1* mRNA Expression oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes, von 34% der ÖR⁺ Tumore nicht erfüllt wurde. Da 30% der ÖR⁺ Tumore nicht auf eine Tamoxifenbehandlung ansprechen [Honig, 1996], wäre es interessant zu untersuchen, ob die Gruppe der ÖR⁺/*LIV-1* Tumore die nicht-ansprechenden Tumore beschreibt. Ein Hinweis auf einen solchen Zusammenhang gibt eine Studie von El-Tanani und Mitarbeitern [1995]. Für das östrogenregulierte Gen pS2 wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Expressionshöhe und längerem KFI in Mammakarzinomen gezeigt [Foekens *et al.*, 1990]. Eine Kombination von *LIV-1* und pS2 Expression als Marker eines funktionellen ÖR würde eventuell eine wesentlich bessere Vorhersage der Prognose von Brusttumoren ermöglichen.

Die zur *LIV-1* Quantifizierung verwendete Methode (ISH) wird in Diagnoselaboren z.B. zur Bestimmung einer Epstein-Barr Virus Infektion, bereits angewendet. Außerdem zeigt das benutzte System zur Bestimmung der Färbeintensitäten eine hohe Reproduzierbarkeit [Allred *et al.*, 1998]. Eine *LIV-1* Evaluierung könnte demnach relativ einfach als neuer, robuster Marker für einen funktionellen ÖR in der klinischen Praxis eingeführt werden.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass die *LIV-1* mRNA Expressionshöhen die prognostische Signifikanz des ÖR wesentlich erhöhen und somit bei der Therapieauswahl für ÖR positive Tumore berücksichtigt werden sollten.

4.6 *LIV-1* Expression in Tamoxifen resistenten Rezidiven

Im Laufe der Anfertigung der vorliegenden Studie stellte sich die Frage, ob *LIV-1* als östrogenreguliertes Gen ein zusätzliches therapeutisches Fenster zum ÖR hat. Dessen Signalweg wurde bereits für verschiedene Strategien zur Medikamentenentwicklung benutzt [Ali & Coombes, 2002; Johnston & Dowsett, 2003]. Deswegen wurde das Expressionsmuster in Tumorzusatzrezidiven untersucht, die während einer anti-hormonalen Therapie mittels Tamoxifen entstanden waren.

Weder die *LIV-1* mRNA- noch die Proteinmengen änderten sich in diesen Rezidiven im Vergleich zu denen der Primärtumore. Ähnliche Ergebnisse erzielt eine Studie von McClelland und Mitarbeitern, die zeigt, dass eine kurzzeitige Behandlung von Brustkrebspatienten mit den Antiöstrogenen Tamoxifen bzw. ICI182780 vor einer Brustoperation keinen Effekt auf die *LIV-1* mRNA Expression im entnommenen Brusttumor hat [McClelland *et al.*, 1996].

Da gezeigt wurde, dass die *LIV-1* mRNA Expressionshöhe mit dem ÖR-Status assoziiert ist und die Expression von *LIV-1* durch Östrogen reguliert wird [Dressman *et al.*, 2001; el-Tanani & Green, 1996b; El-Tanani & Green, 1997; Korkola *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 1988]), könnte erwartet werden, dass eine Therapie mit Tamoxifen, welches die Aktivität des ÖR herabsetzt, einen Einfluss auf die *LIV-1* Konzentration hat. Tatsächlich wurde in MCF-7 Zellen gezeigt, dass eine kurzzeitige Gabe von 4-Hydroxytamoxifen, dem aktiven Metabolit des Tamoxifens, zu einer deutlichen Erniedrigung der *LIV-1* mRNA Menge führt [Manning *et al.*, 1995].

In Tamoxifen resistenten Rezidiven hingegen scheint der ÖR weiterhin transkriptionell seine Zielgene zu aktivieren und somit das Tumorstadium zu regulieren [Ali & Coombes, 2002; Johnston & Dowsett, 2003]. Dies ist zurückzuführen auf eine Anpassung der Zellen an die verminderte Aktivität des ÖR, z.B. durch veränderte posttranslationale Modifikationen des ÖR oder die aberrante Expression und/oder Modifikation von Koaktivatoren bzw. Korepressoren [Ali & Coombes, 2002]. Das bedeutet, dass durch solche Mechanismen weiterhin eine Regulation der *LIV-1* Transkriptmenge durch den ÖR in antiöstrogenresistenten Tumoren stattfinden könnte. Da gezeigt wurde, dass auch andere Faktoren, wie z.B. Dexamethason, *LIV-1* mRNA in einem ÖR unabhängigen Mechanismus stimulieren können [el-Tanani & Green, 1995], wäre es ebenfalls möglich, dass in Antiöstrogen resistenten Rezidiven andere Signaltransduktionswege die Induktion der *LIV-1* Transkription übernehmen.

Die Daten zeigen somit, dass weder die mRNA- noch die Proteinmengen von *LIV-1* in Rezidiven, die während einer Langzeittherapie mit Tamoxifen entstanden sind, im Vergleich zum Primärtumor verändert sind. Die potentiell zu therapierende Patientengruppe einer *LIV-1* spezifischen Therapie unterscheidet sich somit von der einer Tamoxifenbehandlung, d.h. auch Tamoxifen austherapierte Patienten kämen als Zielgruppe in Frage.

4.7 Überlegungen zur Funktion von *LIV-1*

4.7.1 *LIV-1* als putatives Zinkhomeostasis-beeinflussendes Protein

In der Literatur wurde diskutiert, dass *LIV-1* auf Grund seiner Sequenzähnlichkeiten zu anderen Zinktransportern ebenfalls als solcher fungieren könnte [Taylor, 2000]. Durch nähere Betrachtung der *LIV-1* Proteinsequenz bzw. der Sequenzen weiterer Mitglieder der humanen LZT-Familie und einem Vergleich mit Sequenzen anderer humaner Zinktransporter wird deutlich, dass die Mitglieder der LZT-Familie einen wesentlich höheren Anteil an Histidinen in histidinreichen Motiven besitzen. Zum Beispiel tragen die Zinktransporter ZnT3 und ZnT4 4 Histidine in histidinreichen Wiederholungen, *LIV-1* hingegen besitzt 36 Histidine in solchen Wiederholungen (für Sequenzvergleiche siehe [Taylor, 2000]). Es wurde gezeigt, dass diese histidinreichen Motive verantwortlich für die Bindung von Zink oder anderer bivalenter Metalle sind [Murgia *et al.*, 1999]. Daher wäre es denkbar, dass *LIV-1* nicht als Zinktransporter sondern als Zinkspeicherprotein

fungieren könnte. Es wurde in einer Arbeit von Lee und Mitarbeitern gemutmaßt, dass es ein zusätzliches Zinkspeicherprotein als das bisher bekannte Metallothionein gibt, welches in Brusttumoren aktiv ist [Lee *et al.*, 2003].

Die publizierten funktionellen Daten zu LIV-1 erlauben keine Rückschlüsse, ob LIV-1 als Zinkspeicher- oder Transporterprotein agiert. So wurde gezeigt, dass eine Überexpression von LIV-1 zu einer Erhöhung der intrazellulären Zinkkonzentration führt [Taylor *et al.*, 2003]. Dies könnte durch eine aktive Rolle von LIV-1 in Zinktransporterprozessen erklärt werden, welche z.B. zu einer Kompartimentalisierung und damit Konzentrationserhöhung des Ions in der Gesamtzelle führen könnte. Die Daten könnten aber auch eine Speicherung von Zink durch LIV-1 reflektieren, welches mittels anderer plasmamembranständiger Zinktransporter in die Zelle gelangt ist und dort zurückgehalten wird.

Aus den genannten Gründen sollte die Möglichkeit einer Zinkspeicher- und nicht ausschließlich eine Transporterfunktion von LIV-1 in Betracht gezogen werden.

4.7.2 Zink in der Tumorprogression

In Übereinstimmung mit der nachgewiesenen Unterexpression von LIV-1 in Brusttumoren wurde auch für andere Proteine, die am Zinkhaushalt beteiligt sind, gezeigt, dass sie in Tumoren der Brust sowie anderer Organe differentiell exprimiert werden. Zum Beispiel wird ZnT4 während der Progression von einem frühen zu einem invasiven Prostatatumor herunterreguliert. Es zeigt eine weitere Charakteristik von LIV-1, da es auf mRNA Ebene überexprimiert, auf Proteinebene aber unterexprimiert wird [Henshall *et al.*, 2003]. ZnT1 wird in Mammakarzinomen unterexprimiert [Lee *et al.*, 2003]. Hingegen wird das Zinkspeicherprotein Metallothionein in Brusttumoren überexprimiert und korreliert mit aggressiven Tumoren sowie Tumoren mit einer schlechteren Prognose [Jin *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 1993; Sens *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000].

Da eine Überexpression von LIV-1 zu einer Erhöhung der Zinkkonzentration in CHO („chinese hamster ovary“) Zellen führt [Taylor *et al.*, 2003], könnte die Unterexpression in Tumorzellen in einem erniedrigten intrazellulären Zinkspiegel resultieren. Die Rolle von Zink in Tumoren wurde bereits in verschiedenen Systemen untersucht. So führt die Gabe von Zink in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 zur Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C und somit zur Aktivierung von Caspase 9 und 3 [Feng *et al.*, 2000]. In Zelllinien der Schilddrüse löste die Gabe von Zink ebenfalls Apoptose und zusätzlich Nekrose aus [Iitaka *et al.*, 2001]. Außerdem inhibiert Zink das Wachstum von kolorektalen und Prostatatumorzelllinien [Liang *et al.*, 1999] [Park *et al.*, 2002]. In den kolorektalen Zelllinien war diese Hemmung auf eine Induktion von p21/WAF zurückzuführen [Park *et al.*, 2002].

Allerdings gibt es auch kontroverse Publikationen, die z.B. einen Schutz vor Apoptose bei einer erhöhten Zinkkonzentration postulieren [Chimienti *et al.*, 2001; Truong-Tran *et al.*, 2000]. Die

jeweilige Wirkung von Zink ist wahrscheinlich abhängig vom benutzten Modellsystem sowie der Expression verschiedener Zinktransporter- und speicherproteine in den entsprechenden Zelllinien.

4.7.3 LIV-1 als potentiell Tumor-suppressorprotein

Es konnte gezeigt werden, dass die LIV-1 Expression in Tumoren, die größer als 2 cm sind, ein Krankheitsstadium von IIa und höher haben oder einen Tumorgrad von 2 überschritten haben signifikant niedriger ist als im Brustnormalgewebe. Das Verlorengeden der Proteinexpression ist ein typisches Merkmal von Tumorsuppressoren, deren Expression bzw. Aktivität durch einen Verlust des zweiten, noch funktionsfähigen Allels, durch DNA-Methylierung oder auch durch eine erhöhte Proteindegredation oder Fehllokalisation unterdrückt wird [Lee, 1995; Oesterreich & Fuqua, 1999]. Falls LIV-1 solch eine Schutzfunktion gegenüber Tumorentstehung oder – progression einnehmen sollte, könnte dies außer für Brustgewebe auch für andere Organe gelten, da eine relativ hohe Expression an LIV-1 in den verschiedensten Organen beobachtet wurde (siehe Abschnitt 3.7).

Natürlich muss der Zusammenhang zwischen niedriger LIV-1 Expression und steigender Aggressivität des Tumors nicht kausal sein. Es könnte zum Beispiel auch eine aberrante Proteintranslation oder –(de)stabilisierung für die beobachteten Effekte verantwortlich sein und diese Mechanismen könnten der eigentliche tumorfördernde Grund bzw. die Konsequenz einer Onkogenaktivierung sein. In dem Zusammenhang ist es interessant, dass der unmittelbare Effekt einer RAS und AKT Aktivierung u.a. die Rekrutierung bestimmter mRNAs zum Polysom ist und damit deren Translation gefördert wird [Rajasekhar *et al.*, 2003]. Es wurde auch für andere Tumorsuppressor- bzw. Onkogene gezeigt, dass sie die Bildung von reifen Ribosomen oder die Aktivität von Translationsfaktoren beeinflussen, so dass spezifische mRNAs in ihrer Translation gefördert oder gehemmt werden [Ruggero & Pandolfi, 2003]. Um zu überprüfen, ob LIV-1 mechanistisch in der Tumorprogression involviert ist, wären funktionelle Studien notwendig. LIV-1 konnte aber in der vorliegenden Arbeit anhand des Expressionsmusters als potentieller Kandidat für einen neuen Tumorsuppressor identifiziert werden. Wie bereits diskutiert wurde, werden auch andere Zinktransporter- oder Zinkspeicherproteine in Tumoren differentiell exprimiert, so dass vermutlich das Zusammenspiel dieser Proteine den Zinkhaushalt der Tumorzellen bestimmt und damit die Tumorgenese beeinflusst.

4.8 Expressionsanalyse von SL-3

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein weiteres Gen, die Matrix-Metalloprotease (MMP) Stromelysin-3 (SL-3) als potentielles Zielmolekül einer Medikamentenentwicklung validiert. Dazu wurde das Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene im Mammakarzinom bestimmt sowie die Tumorrelevanz in funktionellen Analysen *in vitro* und *in vivo* analysiert.

4.8.1 mRNA Expression im Mammakarzinom

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Genchip Hybridisierung und quantitativer RT-PCR eine Überexpression von *SL-3* mRNA in mehr als 90% der invasiven Brustkarzinome gezeigt. Es wurde bereits beschrieben, dass *SL-3* in stromalen Fibroblasten in der Nähe der Tumorzellen, aber nicht in den Tumorzellen selbst exprimiert wird [Basset *et al.*, 1990]. Eine Arbeit von Ahmad und Mitarbeitern zeigt zwar, dass *SL-3* auch in Karzinomzellen exprimiert werden kann, aber nur wenn diese eine epitheliale-mesenchymale Transition durchlaufen und einen fibroblastoiden Phänotyp angenommen haben [Ahmad *et al.*, 1998], was aber meistens nur für den invasiven Anteil der Karzinomzellen zutrifft.

Da außerdem durch quantitative RT-PCR gezeigt wurde, dass in dem für die Expressionsanalyse benutzten mikrodissertierten Material relativ hohe Mengen fibroblastenspezifischer mRNA vorhanden war, scheint die Mikrodissektion nicht in der Lage gewesen zu sein, Stromazellen quantitativ von Epithelzellen abzutrennen. Dies sollte bei der Anwendung der Mikrodissektion für andere Studien berücksichtigt werden [Ho Hong *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2004; Shimamura *et al.*, 2004; Watahiki *et al.*, 2004]. Die Verunreinigung mit stromalen Komponenten könnte auf eine zu weit gefasste Markierung der zu isolierenden Epithelzellen in den Tumorproben zurückzuführen sein, so dass umliegende Fibroblasten mit erfasst werden. Die Vimentin mRNA könnte auch von Tumor infiltrierenden Fibroblasten stammen. Allerdings wurde auch in den analysierten Normalgeweben, in denen die Fibroblasten durch die intakte Basalmembran von einer Infiltration zurückgehalten werden, ähnlich hohe Vimentinanteile beobachtet wie in Brusttumorproben. Da bisher bei normalen Brustzellen keine Vimentinexpression beschrieben wurde, ist es unwahrscheinlich, dass tumorinfiltrierende Fibroblasten oder Brusttumorzellen, die durch eine epitheliale-mesenchymale Transition Vimentin exprimieren, entscheidend zu den Vimentinsignalen beigetragen haben. Demnach sollte in weiteren Studien beachtet werden, dass die Mikrodissektion nur einer Anreicherung der Epithelzellen dient, aber durchaus das Expressionsmuster anderer Zellarten in diesem Material mitdetektiert wird.

Im Falle von *SL-3* war die Höhe der mRNA Überexpression in Tumorgeweben im Vergleich zum Normalgewebe größer als die Unterschiede im Vimentinanteil zwischen den Proben. Aus diesem Grund konnten die bereits publizierten Daten zur Überexpression von *SL-3* in Fibroblasten trotz schwankender Fibroblastenanteile bestätigt werden [Tetu *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 1993].

Außerdem wurde beobachtet, dass die quantitative RT-PCR größere Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe liefert als Genchip Hybridisierungen. Dies ist wahrscheinlich auf den größeren linearen Bereich der quantitativen RT-PCR zurückzuführen und wurde ebenfalls für das *LIV-1* Expressionsmuster beobachtet und bereits in Abschnitt 4.1 diskutiert.

4.8.2 mRNA Expression in Normalgeweben

Es wurde mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen, dass *SL-3* mRNA am höchsten in Plazentagewebe und etwas niedriger in Gebärmutterhals- und Uterusgewebe exprimiert wird. Diese Daten stimmen mit denen in der Literatur beschriebenen überein [Basset *et al.*, 1990]. Bemerkenswert ist, dass in diesen Geweben auch im adulten Organismus noch Gewebeumbau stattfindet, so dass eine Beteiligung von SL-3 an diesen Prozessen postuliert wurde [Basset *et al.*, 1990].

Die Daten der *SL-3* mRNA Expressionsanalyse zeigen somit eine starke Überexpression von *SL-3* in fast allen invasiven Brusttumoren im Vergleich zum Brustnormalgewebe. Außerdem wird *SL-3* in Normalgeweben exprimiert, die keine schwerwiegenden Nebenwirkungen im Falle einer SL-3 spezifischen Therapie vermuten lassen.

4.8.3 Proteinexpression im Mammakarzinom

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass SL-3 Protein nicht in Epithelzellen exprimiert wird und dass es in Fibroblasten von Tumor- aber nicht von Normalgeweben zu finden ist. Es ist zu beachten, dass bei der angewendeten immunhistochemischen Detektion des Proteins, nur das intrazellulär vorhandene oder das in der extrazellulären Matrix immobilisierte SL-3, aber nicht der sekretierte, lösliche Anteil sichtbar gemacht werden kann. Da aber ähnliche Beobachtungen auf mRNA Ebene mittels *in situ* Hybridisierungen erzielt wurden [Basset *et al.*, 1990], kann davon ausgegangen werden, dass SL-3 tatsächlich nur von Fibroblasten im Tumorgewebe exprimiert wird.

4.8.4 Proteinexpression in Kokulturen

Die beobachtete hohe Proteinexpression von SL-3 an der Invasionsfront von Tumoren legt nahe, dass die an dieser Stelle zustande kommende räumliche Nähe von Karzinomzellen und Fibroblasten zu einer Induktion der SL-3 Expression in den stromalen Fibroblasten führt. Diese Annahme wurde in dieser Arbeit durch Kokultur verschiedener Brustzelllinien mit Tumorfibroblasten bestätigt, wobei das tumorgene Potenzial der Epithelzellen für die Stärke der SL-3 Expression unerheblich war. Ähnliche Beobachtungen wurden auf mRNA-Ebene von Wang und Mitarbeitern publiziert [2002]. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass SL-3 entweder bei jeglichem Kontakt zwischen Epithelzellen und Fibroblasten induziert wird, oder dass die verwendeten Fibroblasten den für die Induktion bestimmenden Faktor darstellen. Tatsächlich wurde letzteres in der Arbeit von Wang und Mitarbeitern gezeigt, in der verschiedene Brustkrebszelllinien mit Tumorfibroblasten kokultiviert wurden, welche aus Brusttumoren mit unterschiedlich hoher SL-3 Expression isoliert worden waren [Wang & Tetu, 2002]. Dabei stimulierten alle verwendeten Brustkrebszelllinien SL-3 in ähnlich hohen Mengen wenn dieselben Tumorfibroblasten verwendet wurden. Allerdings war die Expressionshöhe abhängig von den in

der Kokultur eingesetzten Fibroblasten und interessanter Weise entsprach die SL-3 Expressionshöhe in den Fibroblasten der des jeweiligen Primärtumors, aus dem die Fibroblasten isoliert worden waren. Die unterschiedliche Fähigkeit zur Stromelysin-3 Expression ist demnach ein weiteres Beispiel dafür, dass die stromale Umgebung des Tumors nicht nur aktiv an der Tumorgenese teilnimmt, sondern auch selbst heterogen wird, wie es bereits in mehreren Veröffentlichungen diskutiert wurde [Park *et al.*, 2000; Ronnov-Jessen *et al.*, 1996].

Im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Wang und Mitarbeitern [2002] zeigte eine andere Studie durchaus einen Einfluss der verwendeten Epithelzellen auf die Induktion der Stromelysin-3 Proteinexpression in Fibroblasten [Mari *et al.*, 1998]. In dieser Arbeit induzierten Tumorepithelzellen die SL-3 Expression wesentlich stärker als dies nicht tumorigene Epithelzellen vermochten. Zusätzlich unterschied sich das SL-3 Expressionsmuster in Abhängigkeit von den verwendeten Fibroblasten. Die Unterschiede zur Bedeutung der Tumorgenität von Epithelzellen auf die Induktion von SL-3 könnten gewebespezifisch sein, da in der vorliegenden Arbeit und bei Wang und Mitarbeitern [2002] Brustfibroblasten mit Brustepithelzellen kokultiviert wurden, Mari und Mitarbeiter [1998] hingegen mit einem Zellsystem des Lungengewebes gearbeitet haben.

Die Induktion der SL-3 Expression könnte entweder durch einen direkten Zell- Zellkontakt der Fibroblasten mit den Epithelzellen induziert werden, oder aber durch lösliche Faktoren vermittelt werden. Zwei Arbeiten zeigen, dass SL-3 bei einer Kokultivierung von Fibroblasten und Epithelzellen ohne direkten Zell- Zellkontakt exprimiert wird [Mari *et al.*, 1998; Wang & Tetu, 2002]. Dabei scheint der Wachstumsfaktor bFGF eine Rolle zu spielen, da ein neutralisierender Antikörper gegen bFGF die Expressionshöhe von SL-3 in Kokulturen vermindert [Mari *et al.*, 1998]. Als weitere potentielle Induktoren kommen PDGF, EGF und TGF- β in Frage, da diese die SL-3 Expression in Fibroblasten erhöhen [Ahmad *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1995; Basset *et al.*, 1990; Delany & Canalis, 2001]. Außerdem wurde für Brusttumorzellen gezeigt, dass sie sowohl PDGF, als auch EGF und TGF- β sekretieren und damit parakrin das Expressionsmuster von Fibroblasten beeinflussen können [Artagaveytia *et al.*, 1997; Arteaga *et al.*, 1990; Rozengurt *et al.*, 1985]. Außerdem ist eine zusätzliche Verstärkung der SL-3 Expression durch direkten Zell- Zellkontakt von Fibroblasten und Epithelzellen möglich, da Wang und Mitarbeiter gezeigt haben, dass die SL-3 Expression in einer direkten Kokultur größer ist als bei einer indirekten Kultivierung, in der keine Zell- Zellkontakte zustande kommen [Wang & Tetu, 2002].

Unabhängig davon, ob die Induktion der SL-3 Expression durch Zell- Zellkontakte oder sekretierte Faktoren vermittelt wird, könnte sie die größtenteils fehlende Expression von SL-3 in *in situ* Karzinomen und Normalgeweben der Brust erklären. In diesen Geweben ist die Basalmembran, die Epithelzellen von Stromazellen trennt, noch intakt und verhindert damit einen direkten Zell- Zellkontakt zwischen den beiden Zelltypen [Meuret, 1995]. Außerdem können von der Basalmembran Wachstumsfaktoren zurückgehalten werden [Schwarzbauer, 1999], so dass eventuell

die von Epithelzellen sekretierten Faktoren die Fibroblasten nicht erreichen und somit keine Induktion der SL-3 Expression stattfindet. Durch diese Mechanismen könnte die Expression von SL-3 in Fibroblasten in Normalgeweben bzw. in *in situ* Karzinomen verhindert werden und erst bei einem Durchdringen der Basalmembran durch Zellen invasiver Karzinome induziert werden. Es kann demnach spekuliert werden, dass die SL-3 Expression nicht, wie vermutet, die Ursache [Noel *et al.*, 1996] sondern eine Folge der Invasivität von Tumorzellen ist. Diese Hypothese wird durch ein *in vitro* Experiment bestätigt, welche keine Zunahme der Invasivität der Brustkrebszelllinie MCF-7 durch eine SL-3 Überexpression zeigt [Noel *et al.*, 1996].

Somit konnte durch Kokultivierung von Brustfibroblasten mit Brustepithelzellen das SL-3 Expressionsmuster von *in vivo* Tumoren simuliert werden. Mit diesen Kulturen stehen zusätzlich gute Modelle für weitere funktionelle Studien zur Verfügung, in denen z.B. die SL-3 Expression durch „antisense“ Technologie oder interferierende RNA Moleküle („RNAi“) unterdrückt und funktionelle Konsequenzen analysiert werden können.

4.9 Funktionelle Analyse der Tumorrelevanz von SL-3

4.9.1 Das verwendete *in vitro* Modellsystem

Zur funktionellen Analyse des Proteins wurde in der vorliegenden Arbeit ein Überexpressionssystem in humanen Brustepithelzelllinien verwendet. Dadurch sollte ermöglicht werden, dass die Zellklone im Gegensatz zu Zellen in Kokultursystemen relativ einfach in 3D Kulturen mit extrazellulärer Matrix („Matrigel™“) angezogen und separat analysiert werden können. Die Anzucht als 3D Zellkulturen in Matrigel wurde für entscheidend zur Funktionsanalyse von SL-3 angesehen, da in *in vivo* Experimenten gezeigt wurde, dass nur bei Anwesenheit von Matrigel ein SL-3 spezifischer Effekt zu beobachten ist [Noel *et al.*, 1995]. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass SL-3 als sekretierte Matrix-Metalloprotease Substrate der extrazellulären Matrix spaltet, die parakrin auf Karzinomzellen wirken. Die Zellen wurden in unverdünntem Matrigel angezogen anstelle der Zugabe von verdünntem Matrigel [Debnath *et al.*, 2003], da somit die Zellen von allen Seiten gleichmäßigen Kontakt zur extrazellulären Matrix haben. Dies ist zwar in Normalgeweben nicht der Fall, in denen die Zellen nur mit der basalen Seite an der Basalmembran verankert sind, aber entspricht der Situation in einem invasiven Tumor, bei dem die Tumorzellen in die umgebende extrazelluläre Matrix eindringen [Radisky *et al.*, 2002]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Anzucht von Zellen in 3D Kulturen im Vergleich zu 2D Kulturen zu morphologischen und funktionellen Eigenschaften führen kann, welche das *in vivo* Verhalten der Zellen besser widerspiegeln [Bissell *et al.*, 1999; Hotary *et al.*, 2003; Lelievre *et al.*, 1998].

Die Tatsache, dass SL-3 in fast allen Karzinomen, aber sehr selten in Sarkomen überexprimiert wird [Rouyer *et al.*, 1994], legt die Vermutung nahe, dass das von Fibroblasten sekretierte Protein in der Tumorprogression der Karzinomzellen eine Rolle spielt. Außerdem wurde in *in vivo* Experimenten

an Nacktmäusen gezeigt, dass eine Überexpression von SL-3 in der Karzinomzelllinie MCF-7 einen Effekt auf die Anwachsrate und das Volumen von Tumoren hat [Noel *et al.*, 2000; Noel *et al.*, 1996]. Aus diesen Gründen wurde SL-3 in der vorliegenden Arbeit in Brustkarzinomzellen überexprimiert und nicht in Fibroblasten, die die natürlichen Produzenten von SL-3 in Brusttumoren darstellen.

Um die Funktion von SL-3 in Brusttumoren zu untersuchen, wurden die beiden Brusttumorzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zur Herstellung überexprimierender Klone ausgewählt. Sie unterschieden sich außer in ihrer Morphologie auch in anderen wichtigen Merkmalen. MCF-7 z.B. exprimiert E-Cadherin, wächst östrogenabhängig, ist Fas-sensitiv und exprimiert kein IGFBP-1. MDA-MB-231 hingegen exprimiert kein E-Cadherin, wächst östrogenunabhängig, ist Fas-resistent und exprimiert IGFBP-1 [Kim *et al.*, 1991; Mobley & Brueggemeier, 2004; Nawrocki Raby *et al.*, 2001; Toillon *et al.*, 2002]. Außerdem sind MDA-MB-231 Zellen im Gegensatz zu MCF-7 Zellen hochinvasiv, da sie durch eine epitheliale-mesenchymale Transition einen fibroblastoiden Phänotyp angenommen haben [Dandachi *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2003]. Dadurch exprimieren MDA-MB-231 Zellen im Gegensatz zu MCF-7 Zellen bereits geringe Mengen an endogenem SL-3 [Basset *et al.*, 1997]. Grundlegend kann MCF-7 als Modellzelllinie eines gut differenzierten Tumors und MDA-MB-231 als Modellzelllinie für einen aggressiven, undifferenzierten Tumor angesehen werden.

Damit stand ein Modell für die funktionelle Analyse von SL-3 zur Verfügung, welches a) die *in vivo* Situation besser simuliert als Standard 2D Kulturen und b) verschiedene Stadien der Tumorprogression in Betracht zieht.

4.9.2 Funktionelle Analyse SL-3 überexprimierender Klone *in vitro* und *in vivo*

SL-3 Überexpression führte in den beiden verwendeten Modellzelllinien zu einer Erhöhung der Zellzahl in 3D Matrigelkulturen. Anhand der Zelllinie MDA-MB-231 wurde außerdem gezeigt, dass der Wachstumsfaktor IGF-1 („insulin like growth factor-1“) die Zellzahlerhöhung in SL-3 überexprimierenden Klonen konzentrationsabhängig fördert. Dieser Effekt wurde durch die Verwendung eines Inhibitors der IGF-1 Rezeptortyrosinkinase sowie eines IGFBP-1 („insulin like growth factor binding protein-1“) neutralisierenden Antikörpers abgeschwächt. Die Tatsache, dass trotz Verwendung dieses Inhibitors bzw. Antikörpers im Rahmen der experimentellen Möglichkeiten weiterhin eine SL-3 spezifische Zellzahlerhöhung zu beobachten war, könnte auf zusätzliche, IGF-1 unabhängige Mechanismen der SL-3 Aktivität hindeuten..

Außerdem wurde festgestellt, dass der Wachstumsfaktor EGF („epidermal growth factor“) den zellzahlerhöhenden Effekt von SL-3 unterdrückt. Dies könnte durch die Vernetzung der Signalwege des IGF-1-Rezeptors und EGF-Rezeptors hervorgerufen werden. So wurde gezeigt, dass die IGF-1-Rezeptor Aktivierung zu einer Transaktivierung des EGF-Rezeptors führt [Roudabush *et al.*, 2000] und diese Transaktivierung wahrscheinlich für einen Großteil der IGF-1 induzierten Aktivierung des Ras/Raf mitogenen Signalwegs verantwortlich ist [Roudabush *et al.*, 2000]. Die

Verbindung zwischen dem IGF-1- und den EGF-Rezeptor-Signalweg scheint sowohl über transkriptionsabhängige Mechanismen, als auch über eine direkte MMP Aktivierung zu laufen [Mulligan *et al.*, 2002; Roudabush *et al.*, 2000]. Bei einem Überschuss an IGF-1 und EGF könnten demnach Sättigungseffekte auftreten. Das heißt, der EGF-Rezeptor kann möglicher Weise durch Anwesenheit von IGF-1 nicht zusätzlich stimuliert werden. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung verstärkt, dass bei Zugabe von EGF SL-3 überexprimierende Klone gleiche Zellzahlen wie bei Abwesenheit von EGF zeigen, die Kontrollzellen aber mit einer Zellzahlzunahme reagieren und sich damit dem Niveau der SL-3 überexprimierenden Zellen angleichen.

Die SL-3 Überexpression führte außerdem zu einem besseren Wachstum von Zellen in Softagartests. In diesem Test müssen Zellen ohne Zell- Zellkontakt bzw. ohne Zell-Matrixkontakt überleben und wachsen. Solche Bedingungen würden bei normalen Zellen das Wachstum hemmen und Apoptose auslösen [Frisch & Screaton, 2001]. Immortalisierte Zellen, die in Softagar fähig sind Kolonien zu bilden, erfüllen demnach drei der sechs von Hanahan und Weinberg postulierten Charakteristika von Krebszellen [Hanahan & Weinberg, 2000], nämlich Schutz vor Apoptose, eigene Herstellung von wachstumsstimulierenden Signalen (d.h. das Wachstum ist nicht mehr von Zell-Zell bzw. Zell-Matrixkontakt abhängig) und unbegrenzte Teilungsfähigkeit (dies gilt definitionsgemäß für alle immortalisierten Zellen [Richards, 1999]). SL-3 könnte somit in antiapoptotische und / oder wachstumsstimulierende Regulationswege involviert sein.

Diese Tests stellen ein gutes *in vitro* Modell für die Tumorgenität von Zellen dar und können daher als Vorexperimente für Tierversuche angewendet werden [Cifone & Fidler, 1980]. So bestätigten sich die Ergebnisse des Softagartests in *in vivo* Xenograft Tumormodellen, in denen gezeigt wurde, dass die SL-3 Überexpression in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen zu einem größeren Tumolvolumen und einer höheren Tumorbildungsrate führt. Dieser Effekt war abhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren. Ähnliche Ergebnisse wurden von Noel und Mitarbeitern bei subkutaner Injektion von MCF-7 Zellen beschrieben [Noel *et al.*, 2000] [Noel *et al.*, 1996].

In der vorliegenden Arbeit konnte demnach erstmals gezeigt werden, dass SL-3 auch in einem orthotopen Modell, d.h. bei Einbringen der Zellen in den natürlichen Ort der Tumorentstehung (das Fettgewebe der Brust), zu einer Steigerung der Tumorgenität von Brustkrebszelllinien führt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass dies nicht nur für die relativ gut differenzierte, nicht invasive Zelllinie MCF-7, sondern auch für die undifferenzierte, hochinvasive Zelllinie MDA-MB-231 gilt.

4.9.3 Putativer Mechanismus des SL-3 Effektes

In einer Publikation von Manes und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass SL-3 *in vitro* IGFBP-1 spaltet, dadurch den immobilisierten Wachstumsfaktor IGF-1 freisetzt und für Zellen zugänglich macht [Manes *et al.*, 1997]. Es könnte demnach vermutet werden, dass die in der vorliegenden Arbeit und von Noel und Mitarbeitern [1995; 1996] gezeigte spezifische Erhöhung der Tumorgenität durch SL-3 ebenfalls durch die Spaltung von IGFBP-1 und der damit verbundenen Freisetzung von IGF-1 vermittelt wird. Diese Hypothese wird durch die Daten der vorliegenden Studie erhärtet, da der SL-3 spezifische Effekt zumindest teilweise abhängig von der Anwesenheit von IGF-1 bzw. der Aktivierung der IGF-1 Signalkaskade war.

Es ist allerdings für viele andere MMPs gezeigt worden, dass sie IGFBPs spalten und aktives IGF-1 freisetzen können. So wird IGFBP-1 z.B. von Stromelysin-1, Matrilysin und Gelatinase A abgebaut [Coppock *et al.*, 2004; Manes *et al.*, 1997]. Diese MMPs sind ebenfalls in Brusttumoren exprimiert [Heppner *et al.*, 1996; Nakopoulou *et al.*, 1999], was scheinbar einem spezifischem SL-3 Effekt widerspricht, da sie die SL-3 Aktivität kompensieren könnten. Die Spezifität könnte aber durch verschiedene hohe Affinitäten der Proteasen zu IGFBP-1 bzw. zu anderen Substraten zustande kommen. So könnten MMPs, die zwar IGFBPs aber auch Matrixkomponenten wie Laminin, Kollagen oder Fibronectin spalten [Stamenkovic, 2000], durch höher affine Bindungen an diese Substrate gebunden sein und somit nicht für eine Spaltung von IGFBP zur Verfügung stehen. Da für SL-3 bisher keine Matrixkomponenten identifiziert wurden, die gebunden bzw. gespalten werden [Pei *et al.*, 1994], könnte SL-3 in Anwesenheit einer kompletten extrazellulären Matrix hauptverantwortlich für die Spaltung von IGFBP-1 und Freisetzung von IGF-1 sein. Gleiches gilt auch für ein weiteres *in vitro* Substrate von SL-3, den α_1 -Proteaseinhibitor [Pei *et al.*, 1994]. Dieser wird ebenfalls von den meisten, wenn nicht allen Mitgliedern der MMP Familie gespalten [Birkedal-Hansen *et al.*, 1993]. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass SL-3 den α_1 -Proteaseinhibitor mindestens 2-fach schneller hydrolysiert als Kollagenase A oder Stromelysin-1 [Pei *et al.*, 1994]. Natürlich kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden, dass es weitere Moleküle gibt, die von SL-3 gespalten werden und funktionell in der Tumorprogression beteiligt sind. So wurde zum Beispiel von Pan und Mitarbeitern anhand eines „phage display“ Ansatzes gezeigt, dass u. a. der Östrogenrezeptor- α , pro-TNF α , pro-MMP-9, zelloberflächengebundenes FasL sowie verschiedene Integrine potentielle Spaltsequenzen für SL-3 enthalten [Pan *et al.*, 2003]. Diese Moleküle sind in Prozessen wie Apoptose (FasL, [Nagata, 1999]), Proliferation (ÖR, [Shao & Brown, 2004]) und Invasion (Integrine, [Schwartz, 2001]) bzw. Angiogenese (MMP-9, [Bergers *et al.*, 2000]) involviert, welche die Tumorprogression entscheidend beeinflussen.

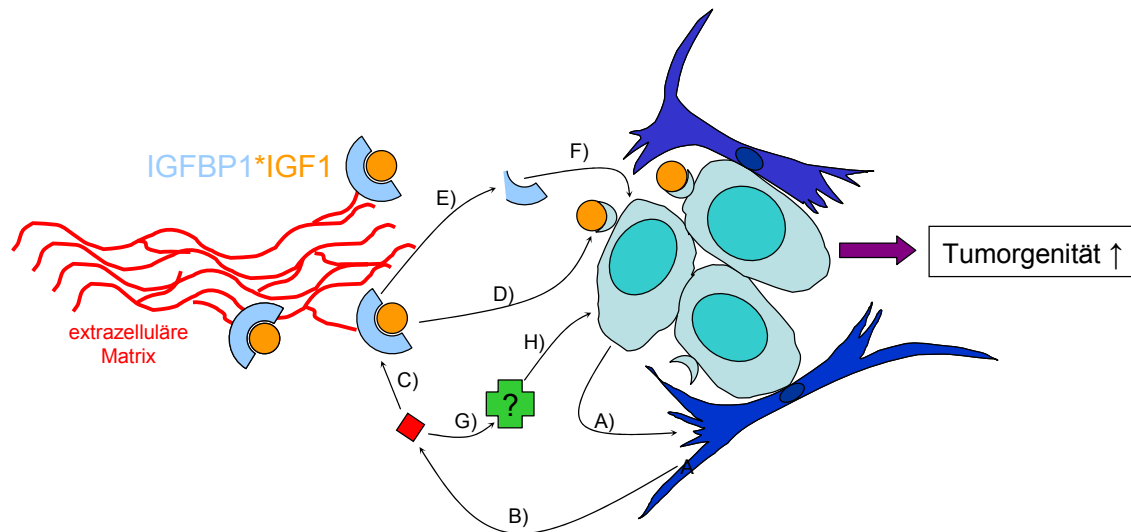


Abb. 46: *Hypothetischer Mechanismus der SL-3 Wirkung im Mammakarzinom.* A) Durch Interaktion von Karzinomzellen (hellblau) und Fibroblasten (dunkelblau) kommt es B) zur Expression und Sekretion von SL-3 (rotes Viereck) durch Fibroblasten. C) SL-3 spaltet IGFBP-1 (blau), welches in der extrazellulären Matrix immobilisiert ist und D) setzt somit IGF-1 (orange) frei, welches an den dazugehörigen Rezeptor auf Tumorzellen binden kann. E) Zusätzlich werden Spaltprodukte des IGFBP-1 gebildet, die F) ebenfalls auf Tumorzellen einwirken können. G) Außerdem könnten bisher noch nicht identifizierte Substrate (grün) gespalten werden, die H) eine Bedeutung für Tumorzellen haben. Durch die Freisetzung von IGF-1 eventuell in Kombination mit anderen Mechanismen kommt es zu einer Erhöhung der Tumorgenität der Karzinomzellen.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten und Überlegungen wurde ein mögliches Modell für die Bedeutung von SL-3 im Mammakarzinom entwickelt (Abb. 46). Dabei kommt es als Folge der räumlichen Nähe von Epithelzellen und Fibroblasten in invasiven Brustkarzinomen wahrscheinlich unter Beteiligung löslicher Faktoren, die von Epithelzellen sekretiert werden, zu einer Induktion der SL-3 Expression in Fibroblasten. Diese sekretieren aktives SL-3, welches in der extrazellulären Matrix vorhandenes IGFBP-1 spaltet und dadurch IGF-1 freisetzt. Dieser potente Faktor kann auf Brusttumorzellen proliferativ, anti-apoptotisch und/oder invasionsverstärkend wirken und somit die Tumorgenität der Zellen erhöhen [Surmacz, 2000]. Auch Spaltprodukte des IGFBP-1 könnten eine tumorfördernde Wirkung haben [Singh *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 2002], genau wie bisher noch nicht identifizierte bzw. untersuchte weitere Moleküle, die von SL-3 erkannt und gespalten werden könnten.

Daten von Fromigue und Mitarbeitern, die während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurden, zeigen eine Erhöhung der Überlebensrate von SL-3 überexprimierenden MCF-7 Zellen bei FBS Entzug in 3D Matrigelkulturen [Fromigue *et al.*, 2003]. Diese Ergebnisse sind konform mit dem hier postulierten Mechanismus, da eine überlebensfördernde Wirkung von IGF-1 in MCF-7 Zellen beschrieben wurde [Kawamura *et al.*, 1994].

4.10 SL-3 als potentielles Zielmolekül einer Medikamentenentwicklung

In der vorliegenden Arbeit sowie in weiteren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass eine SL-3 Überexpression, die in invasiven Brusttumoren auftritt, zu einer Erhöhung der Tumorgenität der Zellen führt [Noel *et al.*, 2000; Noel *et al.*, 1996]. Letztere Publikation demonstriert außerdem, dass durch die Verwendung von „antisense“ Oligonukleotiden und der damit verbundenen Unterdrückung der SL-3 Expression in Fibroblasten, die Tumorbildung verlangsamt wird, was auf einen therapeutischen Nutzen einer SL-3 Inhibition hinweist. Tatsächlich wurden bereits Anstrengungen unternommen spezifische SL-3 Inhibitoren zu isolieren. Kannan und Mitarbeiter identifizierten ein Molekül aus der Familie der Cephalosporine, welches SL-3, aber auch andere MMPs inhibiert [Kannan *et al.*, 1999]. Außerdem wurde in einer kürzlich erschienen Arbeit ein Phosphinpeptid als spezifischer SL-3 Inhibitor beschrieben [Matziari *et al.*, 2004]. Demnach stehen Möglichkeiten zur Verfügung mit denen tierexperimentelle Tests zur Wirkung einer SL-3 Inhibition durchgeführt werden könnten.

Wie bereits diskutiert, scheint der SL-3 spezifische Effekt zumindest zum Teil abhängig von der Aktivierung der IGF-1 Signalkaskade zu sein. Es ist bekannt, dass der IGF-1 Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Brusttumorprogression spielt [Baserga, 1999; Surmacz, 2000]. Der Ligand IGF-1 ist in solch unterschiedlichen Prozessen wie Proliferation, Überleben, Adhesion, Invasion und Migration involviert [Surmacz, 2000]. Aus diesen Gründen wird der IGF-1 Rezeptor als viel versprechender Kandidat für eine Medikamentenentwicklung angesehen [Surmacz, 2000]. Zum Beispiel wurde ein humaner monoklonaler Antikörper gegen den IGF-1 Rezeptor entwickelt, der dessen Signalweg inhibiert und das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* blockiert [Burtrum *et al.*, 2003].

Trotzdem könnte die Entwicklung eines SL-3 Inhibitors zusätzlich zu einem IGF-1 Rezeptor Inhibitor sinnvoll sein, da die Bildung potentieller weiterer, für die Tumorprogression relevanter, Spaltprodukte durch SL-3 verhindert werden würde. So könnte zum Beispiel die Spaltung von IGFBP-1 durch SL-3 in Mammakarzinomen von Bedeutung sein, da es Beweise dafür gibt, dass die Familie der IGFBP zusätzliche, IGF-unabhängige, Funktionen haben. So wurde für IGFBP-4 eine IGF-1 unabhängige Inhibition des mitogenen Effektes von IGF-1 [Singh *et al.*, 1994] sowie eine IGF-1 unabhängige Inhibition der Steroidsynthese gezeigt [Wright *et al.*, 2002].

Der IGF-1 Rezeptor wird von fast allen Zelltypen, außer von Hepatozyten und T-Lymphozyten exprimiert [Werner *et al.*, 1991]. SL-3 hingegen wird im erwachsenen Menschen nur in Plazenta, Uterus und Gebärmutterhals in nennenswerten Mengen exprimiert. Daraus ergibt sich ein weiterer Vorteil einer SL-3 Inhibition gegenüber der Hemmung des IGF-1 Rezeptors, da bei einer Therapie keine Schädigung von lebenswichtigen Organen und damit schweren Nebenwirkungen zu vermuten wären.

Außerdem ist es auf Grund der klinischen Erfahrungen mit anderen Inhibitoren für Rezeptoren sinnvoll einen Signalweg an unterschiedlichen Stellen anzugreifen, da Tumorzellen sich durch verschiedenste Mechanismen an Inhibitoren anpassen und Resistenzen entwickeln (z.B. Tamoxifen und Aromataseinhibitoren für den Östrogenrezeptorsignalweg [Ali & Coombes, 2002]).

Diese Argumente zeigen, dass SL-3 ein viel versprechendes Zielmolekül für eine Therapieentwicklung gegen das Mammakarzinom ist. Allerdings bleibt zu bedenken, dass es sich um ein sekretiertes Protein handelt und auf Grund der freien Diffusion im extrazellulären Raum müsste damit gerechnet werden, dass hohe Inhibitorkonzentrationen für eine Hemmung von SL-3 notwendig sein könnten. Deswegen wären gerade bei einem solchen Inhibitor die Anforderungen einer hohen Spezifität und einer guten Patientenverträglichkeit zu stellen. Außerdem sollte er oral applizierbar und für eine gute Resorption wasserlöslich sein.

Mittels einer *SL-3* „knock out“ Maus wurde gezeigt, dass bei Tumorinduktion durch Überexpression des Onkogens *RAS* zwar weniger Primärtumore durch die fehlende SL-3 Expression entstehen, sich dafür aber mehr Metastasen zu einem früheren Zeitpunkt bilden [Andarawewa *et al.*, 2003]. Dieser Effekt könnte durch das benutzte System bedingt sein, z.B. ist es möglich, dass *SL-3* „knock out“ Mäuse das Expressionsprofil anderer Gene, insbesondere anderer Proteasen ändern, um den SL-3 Verlust während der Embryonalentwicklung zu kompensieren. So wurde z.B. beschrieben, dass das Expressionsmuster von mehreren MMPs in Matrilysin „knock out“ Mäusen verändert ist [Rudolph-Owen *et al.*, 1997]. Dadurch könnte es zu SL-3 unspezifischen Effekten kommen, die nicht während einer Inhibition von SL-3 im erwachsenen Menschen während einer Tumorthherapie auftreten würden. Wenn sich aber diese anscheinend duale Funktion von SL-3 in der Tumorgenese als allgemeingültig herausstellen sollte, also z.B. auch bei einer Inhibition von SL-3 in Xenograft Tumormodellen eine vermehrte Metastasenbildung auftritt, wäre dies eine nicht zu tolerierende Nebenwirkung. Besonders, da die Haupttodesursache von Tumorpatienten nicht der Primärtumor, sondern Metastasen sind [Bast *et al.*, 2000].

Es kann also festgestellt werden, dass SL-3 den bisherigen Daten zufolge einen viel versprechenden Kandidaten für das Medikamentendesign darstellt. Als nächster Schritt der Validierung von SL-3 als mögliches Zielmolekül eines spezifischen Therapieansatzes müsste die Langzeitwirkung einer SL-3 Hemmung *in vivo* untersucht werden.

4.11 Abschließende Betrachtungen zu LIV-1 und Stromelysin-3

Anhand von cDNA Microarray Daten wurden die Gene LIV-1 und Stromelysin-3, die in Brusttumoren im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe überexprimiert waren, für weitere Analysen ihrer potentielle Rolle als Onkogene ausgewählt. Beide Gene waren in der Literatur bereits als brusttumorassoziert beschrieben worden [Manning *et al.*, 1995], [Basset *et al.*, 1990]. Für beide Gene waren außerdem anhand von Sequenzhomologien mit verwandten Proteinen putative Funktionsvorhersagen getroffen worden: Stromelysin-3 als Matrix Metalloprotease und LIV-1 als Zinktransporterprotein [Basset *et al.*, 1990], [Taylor, 2000]. Weiterhin bestand bei beiden Proteinen die Möglichkeit, dass sie durch Inhibitoren potentiell extrazellulär angreifbar wären. Stromelysin-3 besitzt eine Signalsequenz und könnte somit ein sekretiertes Protein darstellen, wohingegen LIV-1 mit seinen acht vorhergesagten Transmembrandomänen in der Plasmamembran lokalisiert sein könnte (siehe Abschnitt 1.4.2. und 1.5.).

Allerdings war sowohl die physiologische Funktion als auch der Mechanismus in der Tumorgenese für beide Proteine unbekannt. Für beide Gene wurde nach Bestätigung des mRNA Expressionsmusters im Brusttumor durch weitere unabhängige Methoden die Expression auf Proteinebene untersucht. Dabei stellte sich für Stromelysin-3 eine Korrelation zwischen mRNA und Proteindaten heraus, d.h. Stromelysin-3 wird auch auf Proteinebene im Brusttumor überexprimiert. Für das Protein LIV-1 allerdings zeigte sich keine Überexpression in Brusttumoren. Die LIV-1 Proteinexpression war in den Tumoren tendentiell sogar niedriger als im entsprechenden Normalgewebe, so dass es nicht weiter als potentielles Onkogen betrachtet wurde.

Da LIV-1 somit als potentielles Zielmolekül einer Medikamentenentwicklung ungeeignet erschien, wurden ausschliesslich für Stromelysin-3 funktionelle Analysen durchgeführt, die eine Erhöhung der Tumorgenität von Brusttumorzellen durch Stromelysin-3 zeigten.

Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass LIV-1, wie bereits für Stromelysin-3 beschrieben [Ahmed *et al.*, 1998], prognostische Kapazität für Brusttumore besitzt. Allerdings korreliert eine hohe LIV-1 Proteinexpression mit einem längeren krankheitsfreien Überleben, wobei eine hohe Stromelysin-3 Expression Tumore mit schlechterer Prognose kennzeichnet.

Somit wurde in dieser Arbeit für eines der beiden bearbeiteten Gene, LIV-1, die Eignung als neuer prognostischen Marker gezeigt aber die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes über eine Hemmung des Proteins ausgeschlossen. Das zweite bearbeitete Gen, Stromelysin-3, ging als guter Kandidat für eine weitere Validierung als therapeutisches Zielmolekül hervor.

4.11 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Gene LIV-1 und Stromelysin-3 (SL-3) hinsichtlich ihrer Eignung als Zielmoleküle für die Entwicklung therapeutischer Inhibitoren bzw. als neue prognostische Marker untersucht.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass sowohl die *LIV-1* mRNA- als auch Proteinexpressionshöhen viel versprechende neue prognostische Marker für das Mammakarzinom darstellen. Die *LIV-1* mRNA Mengen reflektieren die Funktionalität des Östrogenrezeptors besser als der bisher im klinischen Alltag eingesetzte Progesteronrezeptorstatus. Daher wäre eine Bestimmung der *LIV-1* mRNA Expressionshöhe zur Auswahl der Patienten, die eine anti-hormonale Therapie erhalten sollen, empfehlenswert. Auch die von der mRNA-Menge unabhängig regulierte LIV-1 Proteinexpressionshöhe kann als prognostischer Marker eingesetzt werden, da eine hohe LIV-1 Proteinexpression mit einem längeren krankheitsfreien Intervall signifikant korreliert. Für die klinische Diagnostik wäre die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers notwendig, da der in dieser Studie validierte und verwendete polyklonale Antikörper limitiert ist.

Außerdem kann festgestellt werden, dass *LIV-1* als Zielmolekül einer *in vivo* Hemmung im Rahmen einer Anti-Tumorthherapie ungeeignet ist. Dies ist begründet durch die relativ hohe Expression des Proteins in Normalgeweben lebenswichtiger Organe und vor allem der gezeigten von der mRNA-Menge abweichenden Proteinexpressionshöhe. Aufgrund des ermittelten Proteinexpressionsmusters kann LIV-1 als neues putatives Tumorsuppressorgen des Mammakarzinoms angesehen werden. Um diese Daten zu erhärten, wären funktionelle Studien *in vitro* und *in vivo* notwendig. Beispielsweise könnten die funktionellen Auswirkungen einer Inhibition der LIV-1 Expression durch interferierende RNA-Moleküle („RNAi“) in gut differenzierte Brusttumorzellen untersucht werden.

Aus den Daten des zweiten Teils der Arbeit kann geschlossen werden, dass eine Überexpression der sekretierten Matrix-Metalloprotease SL-3 *in vitro* und *in vivo* zu einer Steigerung der Tumorgenität von Brustkarzinomzellen führt. Dieser Mechanismus ist, wie hier erstmals gezeigt, zumindest zum Teil abhängig von dem IGF-1 / IGF-1 Rezeptor Signalweg. Das für die funktionellen Analysen entwickelte 3D Zellkulturmodell kann für weitere Studien verwendet werden, in denen z.B. untersucht werden könnte, ob SL-3 in der Lage ist Tumorzellen vor Apoptose zu schützen. Auf Grund der vorhergesagten Funktion von SL-3 als Matrix-Metalloprotease sollte auch für die Testung von potentiellen Inhibitoren dieses Kulturmodell den Standard 2D Zellkulturen vorgezogen werden. Außerdem könnte durch die Analyse der in dieser Arbeit hergestellten SL-3 überexprimierenden Zellklone mittels Genchip Hybridisierung möglicher Weise Signalwege identifiziert werden, die den beobachteten SL-3 spezifischen Effekt vermitteln. Eventuell könnten somit auch neue SL-3 Substrate gefunden werden.

Anhand der gezeigten Überexpression und Tumorrelevanz von SL-3 stellt dieses Protein einen viel

versprechenden Kandidaten zur Medikamentenentwicklung für die Behandlung des Mammakarzinoms dar. Da eine kürzlich erschienene Studie eine erhöhte Metastasierungsrate in SL-3 „knock out“ Mäusen beschreibt [Andarawewa *et al.*, 2003], wäre es notwendig die Folgen einer Langzeitinhibition von SL-3 in Hinblick auf das Metastasierungsverhalten zu klären. Dies könnte z.B. durch die Verabreichung kürzlich identifizierter spezifischer Inhibitoren in Xenograft Tumormodellen erfolgen [Matziari *et al.*, 2004].

Literatur

- Aamdal, S., Bormer, O., Jorgensen, O., Host, H., Eliassen, G., Kaalhus, O. & Pihl, A. (1984). Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer. *Cancer*, **53**, 2525-9.
- Adams, M.D., Fields, C. & Venter, J.C. (1994). *Automated DNA Sequencing and Analysis*. Academic Press: London.
- Ahmad, A., Hanby, A., Dublin, E., Poulson, R., Smith, P., Barnes, D., Rubens, R., Anglard, P. & Hart, I. (1998). Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. *Am J Pathol*, **152**, 721-8.
- Ahmad, A., Marshall, J.F., Basset, P., Anglard, P. & Hart, I.R. (1997). Modulation of human stromelysin 3 promoter activity and gene expression by human breast cancer cells. *Int J Cancer*, **73**, 290-6.
- Ali, S. & Coombes, R.C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*, **2**, 101-12.
- Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M. & Clark, G.M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, **11**, 155-68.
- Andarawewa, K.L., Boulay, A., Masson, R., Mathelin, C., Stoll, I., Tomasetto, C., Chenard, M.P., Gintz, M., Bellocq, J.P. & Rio, M.C. (2003). Dual stromelysin-3 function during natural mouse mammary tumor virus-ras tumor progression. *Cancer Res*, **63**, 5844-9.
- Anderson, I.C., Sugarbaker, D.J., Ganju, R.K., Tsarwhas, D.G., Richards, W.G., Sunday, M., Kobzik, L. & Shipp, M.A. (1995). Stromelysin-3 is overexpressed by stromal elements in primary non-small cell lung cancers and regulated by retinoic acid in pulmonary fibroblasts. *Cancer Res*, **55**, 4120-6.
- Armstrong, B.K. (1988). Oestrogen therapy after the menopause--boon or bane? *Med J Aust*, **148**, 213-4.
- Artagaveytia, N., Le Penven, S., Falette, N., Lucero, R., Garofalo, E.G. & Saez, S. (1997). Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNA expression in human breast cancer biopsies; analysis in relation to estradiol, progesterone and EGF receptor content. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **60**, 221-8.
- Arteaga, C.L., Coffey, R.J., Jr., Dugger, T.C., McCutchen, C.M., Moses, H.L. & Lyons, R.M. (1990). Growth stimulation of human breast cancer cells with anti-transforming growth factor beta antibodies: evidence for negative autocrine regulation by transforming growth factor beta. *Cell Growth Differ*, **1**, 367-74.
- Baker, A.H., Edwards, D.R. & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, **115**, 3719-27.

- Baker, L.H. (1982). Breast Cancer Detection Demonstration Project: five-year summary report. *CA Cancer J Clin*, **32**, 194-225.
- Baserga, R. (1999). The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res*, **253**, 1-6. Basset, P., Bellocq, J.P., Lefebvre, O., Noel, A., Chenard, M.P., Wolf, C., Anglard, P. & Rio, M.C. (1997). Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol*, **26**, 43-53.
- Basset, P., Bellocq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C. & Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, **348**, 699-704.
- Basset, P., Wolf, C., Rouyer, N., Bellocq, J.P., Rio, M.C. & Chambon, P. (1994). Stromelysin-3 in stromal tissue as a control factor in breast cancer behavior. *Cancer*, **74**, 1045-9.
- Bast, R.C., Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Holland, J.F. & Frei, E. (2000). *Cancer Medicine*. BC Decker: Hamilton.
- Battaglia, F., Polizzi, G., Scambia, G., Rossi, S., Panici, P.B., Iacobelli, S., Crucitti, F. & Mancuso, S. (1988). Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in human breast cancer. *Oncology*, **45**, 424-7.
- Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M. & Issa, J.P. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*, **72**, 141-96.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. & Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, **2**, 737-44.
- Bettag, M., Blatt-Bodewig, M., Clemens, M., Distler, L., Dornhoff, W., Folprecht, G., Freitag, E.M., Frick, S., Glass, B., Hagemann, F.G., Hamann, V., Haupt, M., Hertel, F., Hübner, G., Jacobs, G., Koehne, C.H., Krämer, I., Link, H., Matzdorff, A., Neis, K.J., Neisius, D., Preiß, J., Preiß, J.C., Schäfers, H.J., Schmieder, A., Siemer, S., Thill, B., Trümper, L., Ukena, D., Uppenkamp, M., Voigt, H. & Voigt, J. (2004). *Onkologie 2004/2005*. Zuckschwerdt Verlag: München.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Borden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. & Engler, J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, **4**, 197-250.
- Bishop, J.M. (1985). Viral oncogenes. *Cell*, **42**, 23-38.
- Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-48.
- Bissell, M.J., Weaver, V.M., Lelievre, S.A., Wang, F., Petersen, O.W. & Schmeichel, K.L. (1999). Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res*, **59**, 1757-1763s; discussion 1763s-1764s.
- Bloom, H.J. & W.W., R. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer*, **11**, 359-377.
- Bonfield, J.K., Smith, K. & Staden, R. (1995). A new DNA sequencing assembly program. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4992-4999.
- Borst, M.J. & Ingold, J.A. (1993). Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. *Surgery*, **114**, 637-41; discussion 641-2.
- Boulay, A., Masson, R., Chenard, M.P., El Fahime, M., Cassard, L., Bellocq, J.P., Sautes-Fridman, C., Basset, P. & Rio, M.C. (2001). High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res*, **61**, 2189-93.
- Buring, J.E., Hennekens, C.H., Lipnick, R.J., Willett, W., Stampfer, M.J., Rosner, B., Peto, R. & Speizer, F.E. (1987). A prospective cohort study of postmenopausal hormone use and risk of breast cancer in US women. *Am J Epidemiol*, **125**, 939-47.

- Burtrum, D., Zhu, Z., Lu, D., Anderson, D.M., Prewett, M., Pereira, D.S., Bassi, R., Abdullah, R., Hooper, A.T., Koo, H., Jimenez, X., Johnson, D., Apblett, R., Kussie, P., Bohlen, P., Witte, L., Hicklin, D.J. & Ludwig, D.L. (2003). A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. *Cancer Res*, **63**, 8912-21.
- Butte, A. (2002). The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 951-60.
- Carter, C.L., Allen, C. & Henson, D.E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, **63**, 181-7.
- Chang, H.Y., Sneddon, J.B., Alizadeh, A.A., Sood, R., West, R.B., Montgomery, K., Chi, J.T., Rijn Mv, M., Botstein, D. & Brown, P.O. (2004). Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression: Similarities between Tumors and Wounds. *PLoS Biol*, **2**, E7. Epub 2004 Jan 13.
- Chen, Y., Chen, C.F., Riley, D.J., Allred, D.C., Chen, P.L., Von Hoff, D., Osborne, C.K. & Lee, W.H. (1995). Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer. *Science*, **270**, 789-91.
- Chimienti, F., Seve, M., Richard, S., Mathieu, J. & Favier, A. (2001). Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochem Pharmacol*, **62**, 51-62.
- Cifone, M.A. & Fidler, I.J. (1980). Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine fibrosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1039-43.
- Clarke, P.A., te Poele, R., Wooster, R. & Workman, P. (2001a). Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. *Biochem Pharmacol*, **62**, 1311-36.
- Clarke, R., Leonessa, F., Welch, J.N. & Skaar, T.C. (2001b). Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev*, **53**, 25-71.
- Colditz, G.A., Willett, W.C., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Hennekens, C.H. & Rosner, B.A. (1993). Family history, age, and risk of breast cancer. Prospective data from the Nurses' Health Study. *Jama*, **270**, 338-43.
- Collan, Y.U., Eskelinen, M.J., Nordling, S.A., Lipponen, P., Pesonen, E., Kumpusalo, L.M., Pajarinen, P. & Kettunen, K.O. (1994). Prognostic studies in breast cancer. Multivariate combination of nodal status, proliferation index, tumor size, and DNA ploidy. *Acta Oncol*, **33**, 873-8.
- Contesso, G., Mouriesse, H., Friedman, S., Genin, J., Sarrazin, D. & Rouesse, J. (1987). The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol*, **5**, 1378-86.
- Coppock, H.A., White, A., Aplin, J.D. & Westwood, M. (2004). Matrix Metalloprotease-3 and -9 Proteolyse Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1. *Biol Reprod*, **7**, 7.
- Cousins, R.J. (1998). A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proc Nutr Soc*, **57**, 307-11.
- Coussens, L.M., Fingleton, B. & Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, **295**, 2387-92.
- Cox, D.R. (1972). Regression models and life tables. *J Roy Stat Soc B*, **34**, 187-220.
- Dandachi, N., Hauser-Kronberger, C., More, E., Wiesener, B., Hacker, G.W., Dietze, O. & Wirl, G. (2001). Co-expression of tenascin-C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins. *J Pathol*, **193**, 181-9.
- David, H. (1990). *Wörterbuch der Medizin*. Verlag Gesundheit GmbH: Berlin.

- Debnath, J., Walker, S.J. & Brugge, J.S. (2003). Akt activation disrupts mammary acinar architecture and enhances proliferation in an mTOR-dependent manner. *J Cell Biol*, **163**, 315-26. Epub 2003 Oct 20.
- Delany, A.M. & Canalis, E. (1998). Dual regulation of stromelysin-3 by fibroblast growth factor-2 in murine osteoblasts. *J Biol Chem*, **273**, 16595-600.
- Delany, A.M. & Canalis, E. (2001). The metastasis-associated metalloproteinase stromelysin-3 is induced by transforming growth factor-beta in osteoblasts and fibroblasts. *Endocrinology*, **142**, 1561-6.
- Doerffel, K. (1984). *Statistik in der analytischen Chemie*. Wiley-VCH: Weinheim.
- Dorr, F.A. (1993). Prognostic factors observed in current clinical trials. *Cancer*, **71**, 2163-8.
- Dressman, M.A., Walz, T.M., Lavedan, C., Barnes, L., Buchholtz, S., Kwon, I., Ellis, M.J. & Polymeropoulos, M.H. (2001). Genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in microarray analysis of breast biopsies. *Pharmacogenomics J*, **1**, 135-41.
- Elston, C.W. & 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**, 403-10.
- el-Tanani, M.K. & Green, C.D. (1995). Oestrogen-induced genes, pLIV-1 and pS2, respond divergently to other steroid hormones in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol*, **111**, 75-81.
- el-Tanani, M.K. & Green, C.D. (1996a). Insulin/IGF-1 modulation of the expression of two estrogen-induced genes in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol*, **121**, 29-35.
- el-Tanani, M.K. & Green, C.D. (1996b). Interaction between estradiol and cAMP in the regulation of specific gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, **124**, 71-7.
- El-Tanani, M.K. & Green, C.D. (1997). Interaction between estradiol and growth factors in the regulation of specific gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **60**, 269-76.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-95.
- Feng, P., Liang, J.Y., Li, T.L., Guan, Z.X., Zou, J., Franklin, R. & Costello, L.C. (2000). Zinc induces mitochondria apoptosis in prostate cells. *Mol Urol*, **4**, 31-6.
- Finlay, T.H., Tamir, S., Kadner, S.S., Cruz, M.R., Yavelow, J. & Levitz, M. (1993). alpha 1-Antitrypsin- and anchorage-independent growth of MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, **133**, 996-1002.
- Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S. & Ullrich, A. (2003). Beyond Herceptin and Gleevec. *Curr Opin Chem Biol*, **7**, 490-5.
- Fisher, E.R., Redmond, C. & Fisher, B. (1983). Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. VIII. Relationship of chemotherapeutic responsiveness to tumor differentiation. *Cancer*, **51**, 181-91.
- Foekens, J.A., Rio, M.C., Seguin, P., van Putten, W.L., Fauque, J., Nap, M., Klijn, J.G. & Chambon, P. (1990). Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res*, **50**, 3832-7.
- Frisch, S.M. & Screaton, R.A. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 555-62.
- Fromigue, O., Louis, K., Wu, E., Belhacene, N., Loubat, A., Shipp, M., Auberger, P. & Mari, B. (2003). Active stromelysin-3 (MMP-11) increases MCF-7 survival in three-dimensional Matrigel culture via activation of p42/p44 MAP-kinase. *Int J Cancer*, **106**, 355-63.
- Fuchs, O., Babusiak, M., Vyoral, D. & Petrak, J. (2003). Role of zinc in eukaryotic cells, zinc transporters and zinc-containing proteins. Review article. *Sb Lek*, **104**, 157-70.

- Gago, F.E., Tello, O.M., Diblasi, A.M. & Ciocca, D.R. (1998). Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular prognostic factors in breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **67**, 431-7.
- Garrett, M.D. & Workman, P. (1999). Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium. *Eur J Cancer*, **35**, 2010-30.
- Goepfert, T.M., McCarthy, M., Kittrell, F.S., Stephens, C., Ullrich, R.L., Brinkley, B.R. & Medina, D. (2000). Progesterone facilitates chromosome instability (aneuploidy) in p53 null normal mammary epithelial cells. *Faseb J*, **14**, 2221-9.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Senn, H.J., Glick, J.H. & Gelber, R.D. (1995). Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **87**, 1441-5.
- Gordon, L.A., Mulligan, K.T., Maxwell-Jones, H., Adams, M., Walker, R.A. & Jones, J.L. (2003). Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype. *Int J Cancer*, **106**, 8-16.
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. & Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*, **4**, 117. Epub 2003 Aug 29.
- Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta*, **1465**, 190-8.
- Gunther, K., Merkelbach-Bruse, S., Amo-Takyi, B.K., Handt, S., Schroder, W. & Tietze, L. (2001). Differences in genetic alterations between primary lobular and ductal breast cancers detected by comparative genomic hybridization. *J Pathol*, **193**, 40-7.
- Gupta, R., Jung, E. & Brunak, S. (2002). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation*.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. & Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, **19**, 1720-30.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Henderson, B.E., Ross, R.K., Judd, H.L., Krailo, M.D. & Pike, M.C. (1985). Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer*, **56**, 1206-8.
- Henderson, I.C. (1993). Risk factors for breast cancer development. *Cancer*, **71**, 2127-40.
- Henshall, S.M., Afar, D.E., Rasiah, K.K., Horvath, L.G., Gish, K., Caras, I., Ramakrishnan, V., Wong, M., Jeffry, U., Kench, J.G., Quinn, D.I., Turner, J.J., Delprado, W., Lee, C.S., Golovsky, D., Brenner, P.C., O'Neill, G.F., Kooner, R., Stricker, P.D., Grygiel, J.J., Mack, D.H. & Sutherland, R.L. (2003). Expression of the zinc transporter ZnT4 is decreased in the progression from early prostate disease to invasive prostate cancer. *Oncogene*, **22**, 6005-12.
- Henson, D.E., Ries, L., Freedman, L.S. & Carriaga, M. (1991). Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer*, **68**, 2142-9.
- Heppner, K.J., Matrisian, L.M., Jensen, R.A. & Rodgers, W.H. (1996). Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol*, **149**, 273-82.
- Herbst, R.S. & Kies, M.S. (2002). ZD1839 (Iressa) in non-small cell lung cancer. *Oncologist*, **7**, 9-15.
- Ho Hong, S., Young Nah, H., Yoon Lee, J., Chan Gye, M., Hoon Kim, C. & Kyoo Kim, M. (2004). Analysis of estrogen-regulated genes in mouse uterus using cDNA microarray and laser capture microdissection. *J Endocrinol*, **181**, 157-67.
- Honig, S.F. (1996). *Treatment of metastatic disease*. Diseases of the Breast. Lippincott-Raven: Philadelphia.

- Horton, P. & Nakai, K. (1997). Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **5**, 147-52.
- Horwitz, K.B., McGuire, W.L. & Pearson, O.H. (1975). Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: A hypothesis. *Science*, **189**, 726.
- Hotary, K.B., Allen, E.D., Brooks, P.C., Datta, N.S., Long, M.W. & Weiss, S.J. (2003). Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell*, **114**, 33-45.
- Huang, L., Kirschke, C.P. & Gitschier, J. (2002). Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem*, **277**, 26389-95. Epub 2002 May 7.
- Iitaka, M., Kakinuma, S., Fujimaki, S., Oosuga, I., Fujita, T., Yamanaka, K., Wada, S. & Katayama, S. (2001). Induction of apoptosis and necrosis by zinc in human thyroid cancer cell lines. *J Endocrinol*, **169**, 417-24.
- Jain, S., Fisher, C., Smith, P., Millis, R.R. & Rubens, R.D. (1993). Patterns of metastatic breast cancer in relation to histological type. *Eur J Cancer*, **29A**, 2155-7.
- Jin, R., Bay, B.H., Chow, V.T. & Tan, P.H. (2001). Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, **66**, 265-72.
- Johnston, S.R. & Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer*, **3**, 821-31.
- Kannan, R., Ruff, M., Kochins, J.G., Manly, S.P., Stoll, I., El Fahime, M., Noel, A., Foidart, J.M., Rio, M.C., Dive, V. & Basset, P. (1999). Purification of active matrix metalloproteinase catalytic domains and its use for screening of specific stromelysin-3 inhibitors. *Protein Expr Purif*, **16**, 76-83.
- Kawamura, I., Lacey, E., Mizota, T., Tsujimoto, S., Nishigaki, F., Manda, T. & Shimomura, K. (1994). The effect of droloxifene on the insulin-like growth factor-I-stimulated growth of breast cancer cells. *Anticancer Res*, **14**, 427-31.
- Kelsey, J.L. & Gammon, M.D. (1991). The epidemiology of breast cancer. *CA Cancer J Clin*, **41**, 146-65.
- Kim, I., Manni, A., Lynch, J. & Hammond, J.M. (1991). Identification and regulation of insulin-like growth factor binding proteins produced by hormone-dependent and -independent human breast cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol*, **78**, 71-8.
- Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-3.
- Korkola, J.E., DeVries, S., Fridlyand, J., Hwang, E.S., Estep, A.L., Chen, Y.Y., Chew, K.L., Dairkee, S.H., Jensen, R.M. & Waldman, F.M. (2003). Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res*, **63**, 7167-75.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, **305**, 567-80.
- Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Amer Statist Assoc*, **47**, 583-621.
- Kurokawa, H. & Arteaga, C.L. (2003). ErbB (HER) receptors can abrogate antiestrogen action in human breast cancer by multiple signaling mechanisms. *Clin Cancer Res*, **9**, 511S-5S.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lanari, C. & Molinolo, A.A. (2002). Progesterone receptors--animal models and cell signalling in breast cancer. Diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res*, **4**, 240-3. Epub 2002 Sep 12.

- Le Doussal, V., Tubiana-Hulin, M., Friedman, S., Hacene, K., Spyrtos, F. & Brunet, M. (1989). Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer*, **64**, 1914-21.
- Lee, E.Y. (1995). Tumor suppressor genes and their alterations in breast cancer. *Semin Cancer Biol*, **6**, 119-25.
- Lee, R., Woo, W., Wu, B., Kummer, A., Duminy, H. & Xu, Z. (2003). Zinc accumulation in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumors is accompanied by an altered expression of ZnT-1 and metallothionein. *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 689-96.
- Lefebvre, O., Regnier, C., Chenard, M.P., Wendling, C., Chambon, P., Basset, P. & Rio, M.C. (1995). Developmental expression of mouse stromelysin-3 mRNA. *Development*, **121**, 947-55.
- Lefebvre, O., Wolf, C., Limacher, J.M., Hutin, P., Wendling, C., LeMeur, M., Basset, P. & Rio, M.C. (1992). The breast cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed during mouse mammary gland apoptosis. *J Cell Biol*, **119**, 997-1002.
- Lelievre, S.A., Weaver, V.M., Nickerson, J.A., Larabell, C.A., Bhaumik, A., Petersen, O.W. & Bissell, M.J. (1998). Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14711-6.
- Liang, J.Y., Liu, Y.Y., Zou, J., Franklin, R.B., Costello, L.C. & Feng, P. (1999). Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth. *Prostate*, **40**, 200-7.
- Lichtinghagen, R., Musholt, P.B., Lein, M., Romer, A., Rudolph, B., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Schnorr, D., Loening, S.A. & Jung, K. (2002). Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol*, **42**, 398-406.
- Lippman, M.E., Dickson, R.B., Gelmann, E.P., Rosen, N., Knabbe, C., Bates, S., Bronzert, D., Huff, K. & Kasid, A. (1987). Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion. *J Cell Biochem*, **35**, 1-16.
- Luo, L., Salunga, R.C., Guo, H., Bittner, A., Joy, K.C., Galindo, J.E., Xio, H., Rogers, K.E., Wan, J.S. & Jackson, M.R. (1999). Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat. Med.*, **5**, 117-22.
- Manes, S., Mira, E., Barbacid, M.M., Cipres, A., Fernandez-Resa, P., Buesa, J.M., Merida, I., Aracil, M., Marquez, G. & Martinez, A.C. (1997). Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem*, **272**, 25706-12.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Manning, D.L., Daly, R.J., Lord, P.G., Kelly, K.F. & Green, C.D. (1988). Effects of oestrogen on the expression of a 4.4 kb mRNA in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol*, **59**, 205-12.
- Manning, D.L., McClelland, R.A., Knowlden, J.M., Bryant, S., Gee, J.M., Green, C.D., Robertson, J.F., Blamey, R.W., Sutherland, R.L., Ormandy, C.J. & et al. (1995). Differential expression of oestrogen regulated genes in breast cancer. *Acta Oncol*, **34**, 641-6.
- Manning, D.L., Robertson, J.F., Ellis, I.O., Elston, C.W., McClelland, R.A., Gee, J.M., Jones, R.J., Green, C.D., Cannon, P., Blamey, R.W. & et al. (1994). Oestrogen-regulated genes in breast cancer: association of pLIV1 with lymph node involvement. *Eur J Cancer*, **30A**, 675-8.
- Mari, B.P., Anderson, I.C., Mari, S.E., Ning, Y., Lutz, Y., Kobzik, L. & Shipp, M.A. (1998). Stromelysin-3 is induced in tumor/stroma cocultures and inactivated via a tumor-specific and basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **273**, 618-26.

- Masson, R., Lefebvre, O., Noel, A., Fahime, M.E., Chenard, M.P., Wendling, C., Kebers, F., LeMeur, M., Dierich, A., Foidart, J.M., Basset, P. & Rio, M.C. (1998). In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. *J Cell Biol*, **140**, 1535-41.
- Matziari, M., Beau, F., Cuniasse, P., Dive, V. & Yiotakis, A. (2004). Evaluation of P1'-diversified phosphinic peptides leads to the development of highly selective inhibitors of MMP-11. *J Med Chem*, **47**, 325-36.
- McCarthy, J.E. (1998). Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1492-553.
- McClelland, R.A., Manning, D.L., Gee, J.M., Anderson, E., Clarke, R., Howell, A., Dowsett, M., Robertson, J.F., Blamey, R.W., Wakeling, A.E. & Nicholson, R.I. (1996). Effects of short-term antiestrogen treatment of primary breast cancer on estrogen receptor mRNA and protein expression and on estrogen-regulated genes. *Breast Cancer Res Treat*, **41**, 31-41.
- McClelland, R.A., Manning, D.L., Gee, J.M., Willsher, P., Robertson, J.F., Ellis, I.O., Blamey, R.W. & Nicholson, R.I. (1998). Oestrogen-regulated genes in breast cancer: association of pLIV1 with response to endocrine therapy. *Br J Cancer*, **77**, 1653-6.
- McNeish, I.A., Bell, S.J. & Lemoine, N.R. (2004). Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther*, **11**, 497-503.
- Meuret, G. (1995). *Grundlagen. Mammakarzinom*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
- Mobley, J.A. & Brueggemeier, R.W. (2004). Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis*, **25**, 3-9. Epub 2003 Sep 26.
- Moll, R., Mitze, M., Frixen, U.H. & Birchmeier, W. (1993). Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol*, **143**, 1731-42.
- Mulligan, C., Rochford, J., Denyer, G., Stephens, R., Yeo, G., Freeman, T., Siddle, K. & O'Rahilly, S. (2002). Microarray analysis of insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor signaling reveals the selective up-regulation of the mitogen heparin-binding EGF-like growth factor by IGF-1. *J Biol Chem*, **277**, 42480-7. Epub 2002 Sep 3.
- Murgia, C., Vespignani, I., Cerase, J., Nobili, F. & Perozzi, G. (1999). Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *Am J Physiol*, **277**, G1231-9.
- Murphy, G. & Knauper, V. (1997). Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol*, **15**, 511-8.
- Nagata, S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*, **33**, 29-55.
- Nakamura, T., Furukawa, Y., Nakagawa, H., Tsunoda, T., Ohigashi, H., Murata, K., Ishikawa, O., Ohgaki, K., Kashimura, N., Miyamoto, M., Hirano, S., Kondo, S., Katoh, H., Nakamura, Y. & Katagiri, T. (2004). Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene*, **23**, 2385-400.
- Nakopoulou, L., Giannopoulou, I., Gakiopoulou, H., Liapis, H., Tzonou, A. & Davaris, P.S. (1999). Matrix metalloproteinase-1 and -3 in breast cancer: correlation with progesterone receptors and other clinicopathologic features. *Hum Pathol*, **30**, 436-42.
- Nawrocki Raby, B., Polette, M., Gilles, C., Clavel, C., Strumane, K., Matos, M., Zahm, J.M., Van Roy, F., Bonnet, N. & Birembaut, P. (2001). Quantitative cell dispersion analysis: new test to measure tumor cell aggressiveness. *Int J Cancer*, **93**, 644-52.
- NCI. (2003). National Cancer Institute, USA.
<http://www.nci.nih.gov/cancerinfo/pdq/treatment/breast/healthprofessional>.

- Newman, L.A., Buzdar, A.U., Singletary, S.E., Kuerer, H.M., Buchholz, T., Ames, F.C., Ross, M.I. & Hunt, K.K. (2002). A prospective trial of preoperative chemotherapy in resectable breast cancer: predictors of breast-conservation therapy feasibility. *Ann Surg Oncol*, **9**, 228-34.
- Nishizaki, T., Chew, K., Chu, L., Isola, J., Kallioniemi, A., Weidner, N. & Waldman, F.M. (1997). Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer*, **74**, 513-7.
- Noel, A., Boulay, A., Kebers, F., Kannan, R., Hajitou, A., Calberg-Bacq, C.M., Basset, P., Rio, M.C. & Foidart, J.M. (2000). Demonstration in vivo that stromelysin-3 functions through its proteolytic activity. *Oncogene*, **19**, 1605-12.
- Noel, A., Santavicca, M., Stoll, I., L'Hoir, C., Staub, A., Murphy, G., Rio, M.C. & Basset, P. (1995). Identification of structural determinants controlling human and mouse stromelysin-3 proteolytic activities. *J Biol Chem*, **270**, 22866-72.
- Noel, A.C., Lefebvre, O., Maquoi, E., VanHoorde, L., Chenard, M.P., Mareel, M., Foidart, J.M., Basset, P. & Rio, M.C. (1996). Stromelysin-3 expression promotes tumor take in nude mice. *J Clin Invest*, **97**, 1924-30.
- Oesterreich, S. & Fuqua, S.A. (1999). Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, **6**, 405-19.
- Ofit, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H. & Reichmann, E. (1996). TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev*, **10**, 2462-77.
- Okada, A., Saez, S., Misumi, Y. & Basset, P. (1997). Rat stromelysin 3: cDNA cloning from healing skin wound, activation by furin and expression in rat tissues. *Gene*, **185**, 187-93.
- Olsson, H. (1989). Oral contraceptives and breast cancer. A review. *Acta Oncol*, **28**, 849-63.
- Overall, C.M. & Lopez-Otin, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, **2**, 657-72.
- Page, D.L., Jensen, R.A. & Simpson, J.F. (1998). Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **51**, 195-208.
- Palmiter, R.D., Cole, T.B., Quaife, C.J. & Findley, S.D. (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14934-9.
- Pan, W., Arnone, M., Kendall, M., Grafstrom, R.H., Seitz, S.P., Wasserman, Z.R. & Albright, C.F. (2003). Identification of peptide substrates for human MMP-11 (stromelysin-3) using phage display. *J Biol Chem*, **278**, 27820-7. Epub 2003 May 8.
- Park, C.C., Bissell, M.J. & Barcellos-Hoff, M.H. (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today*, **6**, 324-9.
- Park, K.S., Ahn, Y., Kim, J.A., Yun, M.S., Seong, B.L. & Choi, K.Y. (2002). Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21(Cip/WAF1) and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br J Pharmacol*, **137**, 597-607.
- Parkin, D.M. & Muir, C.S. (1992). Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ*, 45-173.
- Pei, D., Majmudar, G. & Weiss, S.J. (1994). Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem*, **269**, 25849-55.
- Pei, D. & Weiss, S.J. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*, **375**, 244-7.
- Perou, C.M., Jeffrey, S.S., van de Rijn, M., Rees, C.A., Eisen, M.B., Ross, D.T., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Zhu, S.X., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Brown, P.O. & Botstein, D. (1999). Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9212-7.

- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**, 747-52.
- Pike, M.C., Henderson, B.E., Casagrande, J.T., Rosario, I. & Gray, G.E. (1981). Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *Br J Cancer*, **43**, 72-6.
- Pinder, S.E., Murray, S., Ellis, I.O., Trihia, H., Elston, C.W., Gelber, R.D., Goldhirsch, A., Lindtner, J., Cortes-Funes, H., Simoncini, E., Byrne, M.J., Golouh, R., Rudenstam, C.M., Castiglione-Gertsch, M. & Gusterson, B.A. (1998). The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer*, **83**, 1529-39.
- Pozzi, A., Moberg, P.E., Miles, L.A., Wagner, S., Soloway, P. & Gardner, H.A. (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2202-7.
- Radisky, D., Muschler, J. & Bissell, M.J. (2002). Order and disorder: the role of extracellular matrix in epithelial cancer. *Cancer Invest*, **20**, 139-53.
- Rajasekhar, V.K., Viale, A., Socci, N.D., Wiedmann, M., Hu, X. & Holland, E.C. (2003). Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell*, **12**, 889-901.
- Richards, S.J. (1999). Cell immortalisation--a few words of caution. *Neuroreport*, **10**, i.
- Rodgers, W.H., Matrisian, L.M., Giudice, L.C., Dsupin, B., Cannon, P., Svitek, C., Gorstein, F. & Osteen, K.G. (1994). Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest*, **94**, 946-53.
- Ronov-Jessen, L., Petersen, O.W. & Bissell, M.J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev*, **76**, 69-125.
- Roudabush, F.L., Pierce, K.L., Maudsley, S., Khan, K.D. & Luttrell, L.M. (2000). Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells. *J Biol Chem*, **275**, 22583-9.
- Rouyer, N., Wolf, C., Chenard, M.P., Rio, M.C., Chambon, P., Bellocq, J.P. & Basset, P. (1994). Stromelysin-3 gene expression in human cancer: an overview. *Invasion Metastasis*, **14**, 269-75.
- Rozengurt, E., Sinnett-Smith, J. & Taylor-Papadimitriou, J. (1985). Production of PDGF-like growth factor by breast cancer cell lines. *Int J Cancer*, **36**, 247-52.
- Rudolph, P., Alm, P., Heidebrecht, H.J., Bolte, H., Ratjen, V., Baldetorp, B., Ferno, M., Olsson, H. & Parwaresch, R. (1999). Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 271-8.
- Rudolph-Owen, L.A., Hulboy, D.L., Wilson, C.L., Mudgett, J. & Matrisian, L.M. (1997). Coordinate expression of matrix metalloproteinase family members in the uterus of normal, matrilysin-deficient, and stromelysin-1-deficient mice. *Endocrinology*, **138**, 4902-11.
- Ruggero, D. & Pandolfi, P.P. (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*, **3**, 179-92.
- Sager, R. (1997). Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 952-5.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 5463-5467.
- Scarff, R.W. & Torloni, H. (1968). Histological typing of breast tumors. In *International histological classification of tumors*, Organization, W.H. (ed), Vol. 2. pp. 13-20: Geneva.
- Schäffler, A. & Schmitt, S. (1993). *Mensch, Körper, Krankheit*. Jungjohann Verlag Neckarsulm.

- Schmid, K.W., Ellis, I.O., Gee, J.M., Darke, B.M., Lees, W.E., Kay, J., Cryer, A., Stark, J.M., Hittmair, A., Ofner, D. & et al. (1993). Presence and possible significance of immunocytochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, **422**, 153-9.
- Schnitt, S.J. (2001). Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 22-6.
- Schwartz, M.A. (2001). Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol*, **11**, 466-70.
- Schwarzbauer, J. (1999). Basement membranes: Putting up the barriers. *Curr Biol*, **9**, R242-4.
- Scott, G.K., Seow, H.F. & Tse, C.A. (1989). Investigations into the nature of growth-related proteolysis in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, **1010**, 160-5.
- Sellers, T.A., Kushi, L.H., Potter, J.D., Kaye, S.A., Nelson, C.L., McGovern, P.G. & Folsom, A.R. (1992). Effect of family history, body-fat distribution, and reproductive factors on the risk of postmenopausal breast cancer. *N Engl J Med*, **326**, 1323-9.
- Sens, M.A., Somji, S., Garrett, S.H., Beall, C.L. & Sens, D.A. (2001). Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis. *Am J Pathol*, **159**, 21-6.
- Shao, W. & Brown, M. (2004). Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*, **6**, 39-52. Epub 2003 Nov 7.
- Shimamura, M., Garcia, J.M., Prough, D.S. & Hellmich, H.L. (2004). Laser capture microdissection and analysis of amplified antisense RNA from distinct cell populations of the young and aged rat brain: effect of traumatic brain injury on hippocampal gene expression. *Brain Res Mol Brain Res*, **122**, 47-61.
- Singer, M. & Berg, P. (1992). *Gene und Genome*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg Berlin New York.
- Singh, P., Dai, B., Dhruva, B. & Widen, S.G. (1994). Episomal expression of sense and antisense insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 complementary DNA alters the mitogenic response of a human colon cancer cell line (HT-29) by mechanisms that are independent of and dependent upon IGF-I. *Cancer Res*, **54**, 6563-70.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein Lonning, P. & Borresen-Dale, A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10869-74.
- Stamenkovic, I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*, **10**, 415-33.
- Statistisches Bundesamt. (2002). <http://www.gbe-bund.de/>.
- Sternlich, M.D. & Bergers, G. (2000). Matrix metalloproteases as emerging targets in anticancer therapy: status and prospects. *Emerg. Therapeut. Targets*, **4**, 609-633.
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I.M., Matlashewski, G. & Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, **393**, 229-34.
- Surmacz, E. (2000). Function of the IGF-I receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **5**, 95-105.
- Suzuki, A. & Endo, T. (2002). Ermelin, an endoplasmic reticulum transmembrane protein, contains the novel HELP domain conserved in eukaryotes. *Gene*, **284**, 31-40.
- Taub, M., Wang, Y., Szczesny, T.M. & Kleinman, H.K. (1990). Epidermal growth factor or transforming growth factor alpha is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4002-6.

- Taylor, K.M. (2000). LIV-1 breast cancer protein belongs to new family of histidine-rich membrane proteins with potential to control intracellular Zn²⁺ homeostasis. *IUBMB Life*, **49**, 249-53.
- Taylor, K.M., Morgan, H.E., Johnson, A., Hadley, L.J. & Nicholson, R.I. (2003). Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem J*, **375**, 51-9.
- Taylor, K.M., Morgan, H.E., Johnson, A. & Nicholson, R.I. (2004). Structure-function analysis of HKE4, a member of the new LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochem J*, **377**, 131-9.
- Taylor, K.M. & Nicholson, R.I. (2003). The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta*, **1611**, 16-30.
- Tetu, B., Brisson, J., Wang, C.S., Lapointe, H., Beaudry, G. & Blanchette, C. (2001). Expression of cathepsin D, stromelysin-3, and urokinase by reactive stromal cells on breast carcinoma prognosis. *Cancer*, **92**, 2957-64.
- Toillon, R.A., Descamps, S., Adriaenssens, E., Ricort, J.M., Bernard, D., Boilly, B. & Le Bourhis, X. (2002). Normal breast epithelial cells induce apoptosis of breast cancer cells via Fas signaling. *Exp Cell Res*, **275**, 31-43.
- Truong-Tran, A.Q., Ho, L.H., Chai, F. & Zalewski, P.D. (2000). Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J Nutr*, **130**, 1459S-66S.
- Ueno, N.T., Buzdar, A.U., Singletary, S.E., Ames, F.C., McNeese, M.D., Holmes, F.A., Theriault, R.L., Strom, E.A., Wasaff, B.J., Asmar, L., Frye, D. & Hortobagyi, G.N. (1997). Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at M. D. Anderson Cancer Center. *Cancer Chemother Pharmacol*, **40**, 321-9.
- Vallee, B.L. & Auld, D.S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, **29**, 5647-59.
- van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R. & Friend, S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, **415**, 530-6.
- Verma, I.M. & Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature*, **389**, 239-42.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, **9**, 138-41.
- Wahli, W. & Martinez, E. (1991). Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *Faseb J*, **5**, 2243-9.
- Wang, C.S. & Tetu, B. (2002). Stromelysin-3 expression by mammary tumor-associated fibroblasts under in vitro breast cancer cell induction. *Int J Cancer*, **99**, 792-9.
- Watahiki, J., Yamaguchi, T., Irie, T., Nakano, H., Maki, K. & Tachikawa, T. (2004). Gene expression profiling of mouse condylar cartilage during mastication by means of laser microdissection and cDNA array. *J Dent Res*, **83**, 245-9.
- Weiss, S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, **320**, 365-76.
- Werner, H., Woloschak, B., Stammard, Z., Shen-Orr, C.T., Roberts, J. & LeRoith, D. (1991). *The insulin-like growth factor receptor: Molecular biology, heterogeneity, regulation*. Insulin like growth factors: Molecular and Cellular Aspects. CRC-Press: Boca-Raton.
- Wolf, C., Chenard, M.P., Durand de Grossouvre, P., Bellocq, J.P., Chambon, P. & Basset, P. (1992). Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol*, **99**, 870-2.

- Wolf, C., Rouyer, N., Lutz, Y., Adida, C., Lorient, M., Bellocq, J.P., Chambon, P. & Basset, P. (1993). Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1843-7.
- Woodward, W.A., Strom, E.A., Tucker, S.L., McNeese, M.D., Perkins, G.H., Schechter, N.R., Singletary, S.E., Theriault, R.L., Hortobagyi, G.N., Hunt, K.K. & Buchholz, T.A. (2003). Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol*, **21**, 3244-8.
- Workman, P. (2000). Towards genomic cancer pharmacology: innovative drugs for the new millenium. *Curr Opin Oncol Endocr Metab Invest Drugs*, **2**, 21-25.
- Wright, R.J., Holly, J.M., Galea, R., Brincat, M. & Mason, H.D. (2002). Insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-4 on human granulosa cell steroidogenesis. *Biol Reprod*, **67**, 776-81.
- Xu, J., Rodriguez, D., Petitclerc, E., Kim, J.J., Hangai, M., Moon, Y.S., Davis, G.E., Brooks, P.C. & Yuen, S.M. (2001). Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol*, **154**, 1069-79.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, **14**, 163-76.
- Zhang, R., Zhang, H., Wei, H. & Luo, X. (2000). Expression of metallothionein in invasive ductal breast cancer in relation to prognosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **19**, 95-7.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich meinem Betreuer von Seiten der TU-Berlin, Prof. Dipl. Ing. Dr. Ulf Stahl für die freundliche und unkomplizierte Unterstützung meiner Doktorarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Lehmann für die sehr engagierte und motivierende Betreuung dieser Arbeit sowie die Übernahme organisatorischer Angelegenheiten und die stete Bereitschaft über Fragen, Probleme u.ä. konstruktiv zu diskutieren.

Frau Prof. Mina Bissell danke ich für die Möglichkeit am Lawrence Berkeley National Laboratory Teile dieser Arbeit anfertigen zu können und vor allem für die anregenden Diskussionen und herzliche Aufnahme in ihrem Labor.

Dank gilt auch Frau Dr. Uta Schwidetzky, die das erste Jahr meiner Arbeit betreut hat.

Außerdem möchte ich mich bei dem Team der metaGen bedanken. Ganz besonders sind hier Frau Dr. Esmeralda Heiden, die mir bei pathologischen Fragestellungen stets zur Seite stand und Herr Dr. Matthias Reule, der die tierexperimentellen Arbeiten ausgeführt hat, zu erwähnen. Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Detlev Mennerich für seine stete Hilfsbereitschaft und seine Ratschläge bedanken. Ohne ihn wäre diese Arbeit in der Form nicht zustande gekommen. Außerdem habe ich die 3 Jahre sehr gern mit Dr. Thomas Plath, Dr. Kathrin Gottlob und Dr. Gunda Herbert in der Zellbiologie zusammengearbeitet.

Dr. Mewes Böttner danke ich nicht nur für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern auch für seine Unterstützung auf dem Weg dorthin.

Der Pathologie der Universität Regensburg danke ich für die Bereitstellung der Brusttumorproben.

Anhang

Publikationen / Patente

DE 101 59 215.9 und PCT/DE02/04309 „Verwendung eines KMO-Inhibitors (Kynurenine monooxygenase) zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung“ (**Kasper, G.**: 5% Erfinderanteil)

Kasper G., Weiser A.A., Rump A., Sparbier K., Dahl E., Hartmann A., Wild P., Schwidetzky U., Castaños-Vélez E. & Lehmann K. "LIV-1: association with a better outcome of breast cancer patients and its potential role as a suppressor of tumorprogression" *Am. J. Pathology*, in Vorbereitung

Kasper G., Vogel A., Klamann I., Gröne J., Petersen I., Weber B., Castaños-Vélez E., Staub E. & Mennerich D. "The Gene LAPT4b is highly upregulated in solid tumors and seems to play a functional role during tumor progression" *Br. J. Cancer*, eingereicht

Kasper G., Taudien S., Staub E., Mennerich D., Rieder M., Hinemann B., Dahl E., Schwidetzky U., Rosenthal A. & Rump A. (2002) „Different structural organization of the encephalopsin gene in man and mouse.“ *Gene*. **295**(1):27-32.

Rump A., **Kasper G.**, Wen G. P., Starke H., Liehr T., Lehmann R., Langemann D. & Rosenthal A. (2001) "An example for nonfunctionalization and subfunctionalization of genes within a 220 kb region of double-duplicated DNA on human 2q37.1" *Genomics* **73**: 50-55

Kasper G., Brown A., Eberl M., Vallar L., Kiefer N., Berry C., Girdwood K., Eggleton P., Quinell R. & Pritchard D.I. (2001) "A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins" *Parasite Immunology* **23**(3): 141-152

Pritchard D.I., Brown A., **Kasper G.**, McElroy P., Loukas A., Hewitt C., Berry C., Füllkrug R. & Beck E. (1999) "A hookworm allergen which strongly resembles calreticulin" *Parasite Immunology* **21**: 439-450

Lebenslauf

Grit Kasper
Wichertstr. 54
Berlin

geboren am 17.08.1973 in Jena 10439
ledig

PREISE: 2002 Erwin Stephan Preis der TU-Berlin

STIPENDIEN: 1997-1998 Socrates/Erasmus Stipendium
2000-2003 Promotionsstipendium der metaGen Pharmaceuticals GmbH

BERUFSPRAXIS / AUSBILDUNG:

Charité, Abteilung Gastroenterologie 01/2004-04/2004
Abschluss der Promotion, da die metaGen Pharmaceuticals GmbH
zum 31.12.2003 liquidiert wurde Berlin, Deutschland

metaGen Pharmaceuticals GmbH 01/2001-12/2003
Promotion bei Prof. Ulf Stahl (TU-Berlin) Berlin, Deutschland
Betreuerin: Dr. Kerstin Lehmann (metaGen Pharmaceuticals GmbH)

Lawrence Berkeley National Laboratory 06/2002-09/2002
Forschungsaufenthalt bei Prof. Mina Bissell Berkeley, USA

Technische Universität Berlin 10/1995-11/2000
Studium in der Fachrichtung medizinische Biotechnologie Berlin, Deutschland

University of York 03/2000 – 04/2000
Praktikum bei Professor R. Alan Wilson York, UK

University of Nottingham 08/1998-04/1999
Diplomarbeit bei Professor David I. Pritchard Nottingham, UK
Betreuer der TU-Berlin: Prof. Ulf Stahl

Technische Universität Berlin 06/1998 – 10/1999
Tutor im Fachbereich Mikrobiologie / Genetik Berlin, Deutschland

Institut für Molekulare Biotechnologie Jena 07/1997 – 11/1997
Betreuer: Dr. Andreas Rump Jena, Deutschland
Betreuer der TU-Berlin: Prof. Ulf Stahl

Hans Knöll Institut 07/1996 – 10/1996
Praktikum bei Professor Werner F. Fleck Jena, Deutschland

Humboldt Universität Berlin 10/1994-09/1995
Studium in der Fachrichtung Gartenbau Berlin, Deutschland

Freie Universität Berlin 10/1993-09/1994
Studium in der Fachrichtung Pharmazie Berlin, Deutschland

Gymnasium "Am Anger" 09/1990-07/1992
Hochschulreife Jena, Deutschland

POS Julius Schaxel II 09/1981-08/1990
Schulbildung mit erweitertem Sprachunterricht Jena, Deutschland