

***SASH1* und *PLAGL1* - zwei Kandidatengene für die Suppression der frühen Metastasierung des Mammakarzinoms**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der
Universität Regensburg

vorgelegt von

Anya Krefft

aus
München

September 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 26. September 2011

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. Christoph A. Klein

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Witzgall

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dresselhaus

2. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Klein

3. Prüfer: Prof. Dr. Warth

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	3
Epidemiologie des Mammakarzinoms	3
Klassifikation des Mammakarzinoms	5
Progression des Mammakarzinoms	6
Metastasierung von Tumorzellen	7
Notwendigkeit der Entwicklung von zielgerichteten Therapien zur Behandlung des Mammakarzinoms	9
Detektion und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen (DTCs)	11
Zielsetzung	11
Patientinnen, Kooperationspartner und verwendete Materialien	13
Patientinnen	13
Kooperationspartner	15
Materialien	16
Zusammensetzung von selbst hergestellten Puffer, Lösungen und Medien	26
Methoden	29
In silico Analyse der Region 6q24.2-25.1	29
Molekularbiologische Methoden	29
Immunzytochemische Färbungen von Zytospins	38
Immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten	40
Funktionelle Charakterisierung der Niederregulierung von <i>SASH1</i> bzw. <i>PLAGL1</i>	41
Statistische Auswertung	47
Verwendete Standardprotokolle	48
Ergebnisse	49
Übersicht über die erlangten Ergebnisse	49
Identifizierung einer häufig deletierten 6 Mbp-Region auf Chromosom 6q in disseminierten Tumorzellen (DTC) (laboreigene Vorarbeiten)	51
<i>SASH1</i> und <i>PLAGL1</i> : zwei Kandidatengene für die Suppression einer systemischen Streuung von Mammakarzinomzellen	52
<i>SASH1/PLAGL1</i> sind heterogen in Primärtumorzellen deletiert	55
<i>SASH1</i> und <i>PLAGL1</i> sind in Mammakarzinomzelllinien meist kodeletiert	57
Identifizierung und Charakterisierung einer <i>SASH1/PLAGL1</i> -Translokation in Mammapithelzelllinien	60

<i>SASH1</i> bzw. <i>PLAGL1</i> sind in hHME-tert-Zellklonen mit <i>SASH1/PLAGL1</i> -Translokation niederreguliert	64
Die lentivirale Transduktion bewirkt eine effiziente Niederregulierung von <i>SASH1</i> bzw. <i>PLAGL1</i>	71
Durch die Niederregulierung von <i>SASH1</i> bzw. <i>PLAGL1</i> proliferieren mehr Zellen	74
Die zelluläre Lokalisation von <i>SASH1</i> in Mammakarzinomzelllinien ist abhängig vom Zellzyklus	84
Zellen mit einer verminderten Expression von <i>SASH1</i> bzw. <i>PLAGL1</i> stimulieren parakrin die Proliferation in Zellen ohne Niederregulierung von <i>SASH1/PLAGL1</i>	87
<i>SASH1</i> bzw. <i>PLAGL1</i> beeinflussen nur geringfügig das Migrations- bzw. Invasionsverhalten von Mammazellen	89
Die Niederregulierung von <i>SASH1</i> und <i>PLAGL1</i> erhöht die Anoikisresistenz und das Stammzell- bzw. Progenitorpotenzial von Mammazellen	96
Die <i>SASH1</i> -Deletion ist ein prognostischer Faktor und ist mit besonders aggressiven Mammakarzinomen assoziiert	103
Diskussion	114
Der Bedarf an effizienteren systemischen Therapien zur Behandlung von Patientinnen mit Mammakarzinom	114
Identifizierung einer früher genetischen Aberrationen auf Chromosom 6q	115
<i>PLAGL1</i>	116
<i>SASH1</i>	117
Die Deletion von <i>SASH1/PLAGL1</i> in malignen und nicht malignen Mammaepithelzelllinien	118
<i>SASH1</i> und <i>PLAGL1</i> beeinflussen die Proliferation und die Stammzell- bzw. Progenitorzeleigenschaften von Mammaepithelzellen	120
<i>SASH1</i> und <i>PLAGL1</i> regulieren zelluläre Kooperation über parakrine und zelluläre Mechanismen	128
Die <i>SASH1/PLAGL1</i> -Deletion in Primärtumorproben von Mammakarzinompatientinnen und der klinische Verlauf	131
Literaturverzeichnis	136
Abkürzungsverzeichnis	146
Danksagung	148
Erklärung	150

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt mit jährlich über 55 000 Neuerkrankungen und über 15 000 Todesfällen in Deutschland die häufigste, bösartige Tumorerkrankung der Frau dar. Um neue und effiziente zielgerichtete Therapien zu entwickeln, ist es notwendig, die Mammakarzinogenese und insbesondere die Metastasierung zu verstehen. Ein Ansatzpunkt hierfür ist die Identifikation von genetischen Defekten, welche zur Metastasierung des Tumors beitragen. Disseminierte Tumorzellen (DTCs) besitzen nur wenige subchromosomale Aberrationen und stellen vermutlich frühe Zellen der Tumorprogression dar. Durch die genomische Analyse dieser Zellen könnten somit bislang unbekannte frühe Mutationen sporadischer Mammakarzinome identifiziert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Gene mit einer Rolle in der Entstehung und systemischen Progression des Mammakarzinoms zu identifizieren und zu charakterisieren.

Vorversuche der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Region 6q24.2-25.1 häufig in DTCs von Mammakarzinompatientinnen deletiert ist. Zu Beginn der vorliegenden Dissertation waren 37 Gene in dieser 6 Mbp-Deletion bekannt, welche somit alle potenzielle Tumorsuppressorgene mit einer Rolle in der frühen Mammakarzinogenese darstellen. Durch Literaturrecherchen und Genexpressionsanalysen erfolgte eine Eingrenzung auf die vielversprechendsten Kandidatengene - *SASH1* und *PLAGL1*. Die Rolle dieser Gene in der frühen Metastasierung sollte daher in der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) der vorliegenden Arbeit zeigten, dass eine klonale Deletion dieser Gene in 7 % der Patientinnen vorhanden ist. Somit stellt die Deletion vermutlich ein frühes Ereignis in der Tumorprogression einiger Patientinnen dar. Auch in Mammakarzinomzelllinien wiesen diese beiden Gene häufig Deletionen oder Translokationen auf. Sogar in der nicht malignen Mammaepithelzelllinie hHME-tert konnte eine komplexe Translokation identifiziert werden, welche *SASH1* und *PLAGL1* einschließt und mit einer Niederregulierung dieser Gene assoziiert war. Um die Rolle von *SASH1* bzw. *PLAGL1* in der frühen Tumorprogression näher zu charakterisieren, wurden Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation sowie Zellen, in denen *SASH1* bzw. *PLAGL1*

lentiviral niederreguliert worden war, verglichen und verschiedene Zellfunktionen untersucht. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass sowohl *SASH1* als auch *PLAGL1* die Proliferation von Mammaepithelzellen regulieren. Dabei ist die zelluläre Lokalisation von *SASH1* in Mammaepithelzellen abhängig vom Proliferationsstatus der Zelle. Beide Tumorsuppressoren beeinflussten zwar nur geringfügig die Invasion und Migration von Mammaepithelzellen, bewirkten jedoch bei verminderter Expression eine Erhöhung der Anoikisresistenz sowie des Stammzellpotenzials der jeweiligen Zellen. Dieser Befund deutet möglicherweise auf eine Rolle von *SASH1/PLAGL1* in der Metastasierung hin. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Klone mit *SASH1* bzw. *PLAGL1*-Niederregulierung die Proliferation und Stammzeleigenschaften von Zellen ohne diese Niederregulierung beeinflussen.

Um zu überprüfen, ob die Deletion auch den klinischen Verlauf des Mammakarzinoms beeinflusst, wurde die *SASH1*-Deletion in Primärtumorproben eines Mammakarzinompatientenkollektivs detektiert und mit klinischen Parametern assoziiert. Dabei stellte sich heraus, dass die *SASH1*-Deletion in stark proliferierenden und wenig differenzierten Primärtumoren vermehrt vorhanden war. Diese Ergebnisse sind somit konsistent mit den *in vitro* Daten. Die Assoziation der *SASH1*-Deletion mit besonders aggressiven Primärtumoren zeigte sich auch dadurch, dass die *SASH1*-Deletion einen unabhängigen prognostischen Faktor für das metastasefreie Überleben darstellt, insbesondere bei Patientinnen mit lumbalem Mammakarzinom (positiv für Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor). Zudem war die *SASH1*-Deletion vermehrt in Patientinnen mit trippelnegativem (negativ für Östrogen- und Progesteronrezeptor, sowie fehlende HER2-Überexpression) Mammakarzinom nachweisbar.

In dieser Arbeit wurden somit erste Hinweise darüber erlangt, dass die frühe Niederregulierung von *SASH1* und *PLAGL1* vermutlich die Disseminierung und Metastasierung der jeweiligen Tumorzellen und Ausbildung besonders aggressiver Primärtumore fördert.

Einleitung

Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom (Brustkrebs) ist der häufigste maligne epitheliale Tumor (Karzinom) der Frau. Allein in Deutschland werden jährlich über 55 000 Neuerkrankungen registriert [1, 2]. Die Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) ist zwar zwischen 1980 und 2000 stetig angestiegen, in den letzten zehn Jahren aber in etwa gleich geblieben [2, 3]. Auch wenn aufgrund früherer Tumordetektion und effizienterer Therapien die Mortalität gegenüber den letzten Jahren gesunken ist, stellt das Mammakarzinom die häufigste krebsassoziierte Todesursache bei Frauen dar. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate wird in Deutschland auf ca. 83 % bis 87 % geschätzt [1-3]. Trotzdem bedeutet dies, dass allein in Deutschland mehr als 15 000 Frauen aufgrund dieser Erkrankung pro Jahr versterben [2]. Weltweit werden laut der „World Health Organization“ (WHO) jährlich etwa 460 000 Todesfälle durch das Mammakarzinoms geschätzt [4]. Bei Männern kann zwar die Brustdrüse ebenfalls maligne entarten, ist jedoch mit einer Inzidenz von 1 pro 100 000 Mammakarzinomfällen sehr selten [2, 5].

Als epidemiologisch gesichert für die Entstehung des Mammakarzinoms gelten derzeit die in Tabelle 1 zusammengefassten Risikofaktoren. Den stärksten Risikofaktor stellt dabei die familiäre Prädisposition dar. Frauen, bei deren Mutter Brustkrebs bereits auftrat, haben ein bis zu 13,6-fach erhöhtes Risiko für ein Mammakarzinom im Vergleich zu Frauen ohne familiäre Belastung. Im Zusammenhang mit diesen hereditären Mammakarzinomen werden vor allem die Gene „breast cancer 1“ (*BRCA1*) und „breast cancer 2“ (*BRCA2*) beschrieben. Frauen mit einer Mutation in einem der genannten Gene besitzen ein 60 bis 85 % erhöhtes Risiko an Brustkrebs und 15 bis 40 Prozent erhöhtes Risiko an Eierstockkrebs zu erkranken [6, 7]. Allerdings lassen sich Mutationen in diesen Genen nur in einem relativ kleinen Anteil der Patientinnen mit familiärer Vorgeschichte nachweisen, so dass vermutet wird, dass weitere Gene an der Entstehung des hereditären Mammakarzinoms beteiligt sind [2]. Bei sporadisch (nicht hereditär) auftretenden Brustkrebserkrankungen stellt dagegen das Alter den

größten Risikofaktor dar: Frauen, die mindestens 50 Jahre alt sind, weisen ein 6,5-fach erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken im Vergleich zu Frauen unter 50 Jahren auf. Weitere gesicherte Risikofaktoren für das Mammakarzinom stellen das Alter bei Menarche (Auftreten der ersten Menstruation), Menopause und erster Lebendgeburt dar. Allerdings wurde auch eine Risikosteigerung durch Übergewicht und Bewegungsmangel, vor allem nach der Menopause, beschrieben [2].

Tabelle 1: Epidemiologisch gesicherte Risikofaktoren des Mammakarzinoms (modifiziert nach [8])

Risikofaktor	Relatives Risiko
Alter (≥ 50 versus <50 Jahre)	6,5
Familiäre Belastung	
Verwandschaft ersten Grades	1,4 – 13,6
Verwandschaft zweiten Grades	1,5 - 1,8
Alter bei Menarche (< 12 versus ≥ 14 Jahre)	1,2 - 1,5
Alter bei Menopause (≥ 55 versus < 55 Jahre)	1,5 - 2,0
Alter bei erster Lebendgeburt (> 30 versus < 20)	1,3 - 2,2
Benigne Erkrankung der Brust	
Biopsie (jeglicher histologischer Befund)	1,5 - 1,8
Atypische Hyperplasie	4,0 - 4,4
Hormonersatztherapie	1,0 - 1,5

Klassifikation des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom stellt eine sehr heterogene Erkrankung dar, welche sich aus verschiedenen Subtypen zusammensetzt. Diese Subtypen unterscheiden sich in ihren histologischen und biologischen Eigenschaften sowie klinischem Verhalten (z. B. Therapierbarkeit) [9]. Brustkrebs wird in der klinischen Routine wie auch andere Tumorarten durch die TNM-Klassifikation, den histologischen Differenzierungsgrad und dem histologischen Subtyp beschrieben. Die Klassifizierung dient dabei der Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung [10].

Die TNM-Klassifikation setzt sich aus der Größe des Tumors (T), der Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und das etwaige Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zusammen. Durch Zuordnung von Indexzahlen werden die einzelnen Ausbreitungsstadien genauer definiert.

Der Differenzierungsgrad (engl. Grading) eines Tumors beschreibt die Änderung in der Zell- und Gewebearchitektur und korreliert mit Aggressivität und Rezidivrisiko des Tumors [11]. Er wird aus dem Prozentsatz der Tubulusbildung (histologische Ausdifferenzierung des Tumorgewebes im Vergleich zum Normalgewebe), dem Grad der Kernpolymorphie (Größe und Form der Zellkerne) und dem mitotischen Index (Anteil der proliferierenden Zellen) ermittelt [12].

Maligne Tumore aus Mammaepithelzellen sind in der Regel Adenokarzinome [13]. Das häufigste Mammakarzinom ist das sogenannte invasive duktale Karzinom, welches aufgrund mangelnder Charakteristika nicht weiter spezifiziert werden kann (engl.: invasive ductal carcinoma not otherwise specified; IDC-NOS). Ein Viertel der Mammakarzinome, machen dagegen die sogenannten speziellen Mammakarzinomsubtypen aus, von denen 2003 17 Subtypen durch die WHO beschrieben wurden [14]. Der häufigste dieser Subtypen ist das invasive lobuläre Karzinom (engl.: Invasive lobular carcinoma, ILC) und ist mit einer Prävalenz von 5-15 % nach dem invasiven dukталen Karzinom der zweithäufigste Mammakarzinomsubtyp [14, 15]. Die Bezeichnungen „duktral“ und „lobulär“ beschreiben dabei nicht das Ursprungsgewebe, sondern werden lediglich aufgrund ihrer zytologischen Eigenschaften, immunhistochemischen Profile und Architektur als solche bezeichnet.

Basierend auf Genexpressionsdaten werden Mammakarzinome auch oft in fünf molekulare Subtypen (luminal A, luminal B, basal, HER2 positiv und „normal breast like“) eingeteilt, welche sich hauptsächlich durch die Expression des Östrogenrezeptors (ER), Progesteronrezeptors (PR), HER2-Rezeptors, epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und Zytokeratin 5 und 6 (CK5/6) unterscheiden [16, 17]. Weitere Genexpressionstudien beschrieben in den letzten Jahren noch die zusätzlichen Subtypen „molecular apocrine“, „claudin-low“ und „Interferon-related“ [18-20]. Allerdings hat sich die Klassifizierung von Primärtumoren durch Genexpressionsanalyse bislang noch nicht gegenüber der immunhistochemischen Einteilung in der Routinediagnostik durchgesetzt.

Progression des Mammakarzinoms

Die Entstehung des invasiven Mammakarzinoms wird in der Regel als eine schrittweise, lineare Entwicklung aus dem gesunden Mammaepithel über die Stadien der Hyperplasie, der atypischen Hyperplasie und des Carcinoma *in situ* beschrieben (Abb. 1) [21]. In den letzten Jahrzehnten wurde dabei vermehrt gezeigt, dass nicht nur genetische und epigenetische Aberrationen zur Progression des Tumors beitragen, sondern auch das Tumorstroma eine entscheidende Rolle spielt. Vor allem für krebsassoziierte Fibroblasten, Myoepithelzellen und Immunzellen wurde ein tumorförderndes Potenzial nachgewiesen [22].

Für den Ursprung der krebsinitiierenden Zelle werden hauptsächlich zwei unterschiedliche Modelle beschrieben, das klonale Evolutionsmodell und die Stammzellhypothese. Letztere geht davon aus, dass lediglich Stamm- oder Progenitorzellen krebsinitiierend sein können, während Vertreter der klonalen Theorie annehmen, dass eine Mammaepithelzelle durch geeignete genetische und epigenetische Aberrationen und anschließende Selektion tumorigen wirken kann. Beide Theorien schließen sich dabei nicht zwingend gegenseitig aus.

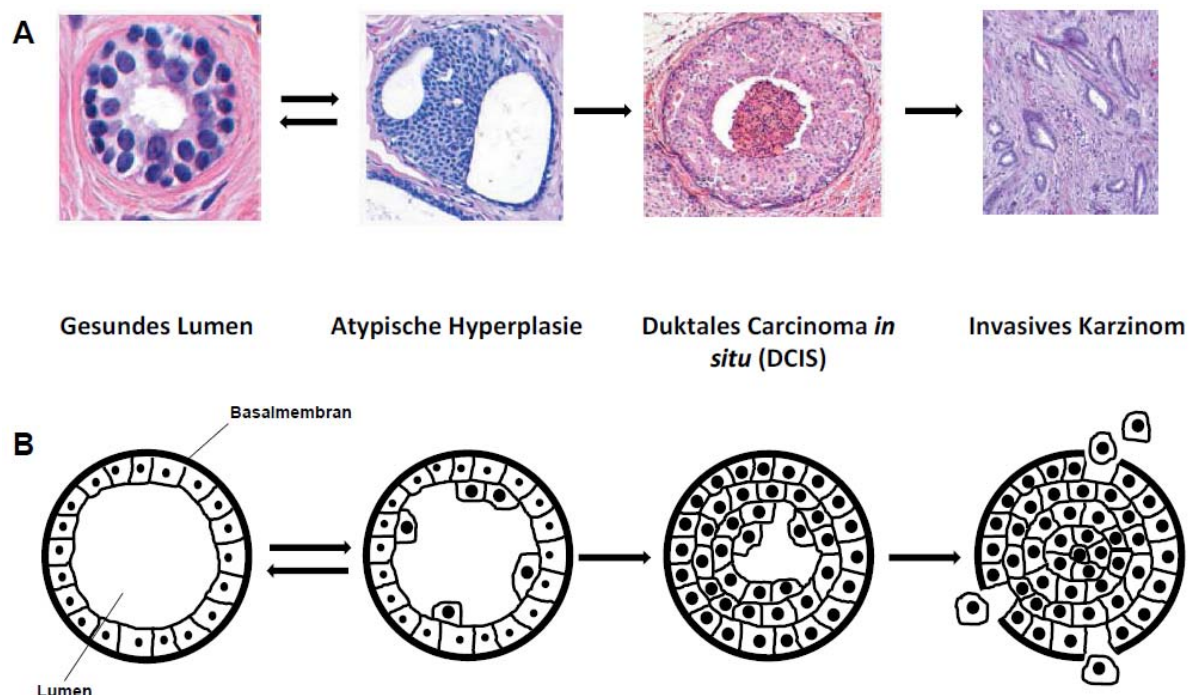


Abb. 1: Progression des Mammakarzinoms

Dargestellt sind Gewebsschnitte einzelner Stufen der Progression des Mammakarzinoms (A, aus [23]) sowie die entsprechenden schematischen Darstellungen (B). Während der Tumorentwicklung des Mammakarzinoms wachsen zunächst vermehrt Zellen (Hyperplasie), welche sich schließlich in der atypischen Hyperplasie morphologisch von den gesunden Zellen unterscheiden (im Schema durch größere Zellkerne angedeutet). In der weiteren Progression verändern sich neben den luminalen Zellen (Zellen, welche ans Lumen angrenzen) auch die basalen Zellen (Zellen, welche an die Basalmembran angrenzen) morphologisch (Duktales Carcinoma *in situ*). Erst wenn die Basalmembran durchbrochen ist, spricht man von einem invasiven Karzinom.

Metastasierung von Tumorzellen

Trotz der Fortschritte in der Diagnose und Behandlung des Mammakarzinoms sind weiterhin Fernmetastasen die Haupttodesursache bei Mammakarzinompatientinnen [24]. Etwa 6 % der Patientinnen weisen schon zum Zeitpunkt der Diagnose Metastasen auf und 20-50 % der M0-Patientinnen (keine Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose) entwickeln im Verlauf der Krankheit Metastasen [25-27]. Am weitestgehend akzeptiert ist dabei die Theorie, dass einzelne Tumorzellen den Primärtumor verlassen und über Lymph- und/oder Blutgefäße zu entfernten Organen (z. B. Lunge, Leber, Knochen) disseminieren (streuen). Tumorzellen, welche im Blutstrom zirkulieren, werden dabei als CTCs (aus dem Englischen: circulating tumor cells) bezeichnet. Im Gegensatz dazu spricht man von disseminierten Tumorzellen

(DTC), wenn die Tumorzellen schon extravadiert (aus Blut bzw. Lympheflüssigkeit ausgetreten) sind.

Die zeitliche Einordnung der Disseminierung von Tumorzellen ist allerdings umstritten, so dass zwei verschiedene Modelle zur Metastasierung bestehen. Das weiter verbreitete Modell basiert auf der schrittweisen Progression der Tumorzellen durch zunehmende epigenetische und genetische Aberrationen und Selektion der jeweils aggressivsten Tumorzellen [28, 29] (Abb. 2A). In diesem sogenannten linearen Progressionsmodell findet eine Disseminierung spät im Verlauf der Tumorprogression statt, so dass die Aberrationen dieser Zellen denen des Primärtumors sehr ähneln. Im Gegensatz dazu beschreibt das Modell der parallelen Progression eine frühe Disseminierung von Tumorzellen, welche zum Zeitpunkt der Disseminierung nur wenige Aberrationen aufweisen (Abb. 2B). Diese Zellen akkumulieren anschließend weitere genetische Aberrationen unabhängig von der genetischen Evolution des Primärtumors. Folglich divergiert das Genom der disseminierten Zellen von denen des Primärtumors [30]. Mit Hilfe des Modells der frühen Disseminierung kann auch erklärt werden, warum viele Patienten, welche zum Zeitpunkt der Diagnose als M0 (keine Fernmetastasen) und N0 (keine Lymphknotenmetastasen) klassifiziert wurden, trotz Therapie Fernmetastasen entwickeln: Da in den Patienten schon vor dem Zeitpunkt der Resektion des Primärtumors Tumorzellen gestreut haben, können diese verbleibenden Zellen (engl. minimal residual disease) letztlich zur Bildung von Fernmetastasen führen.

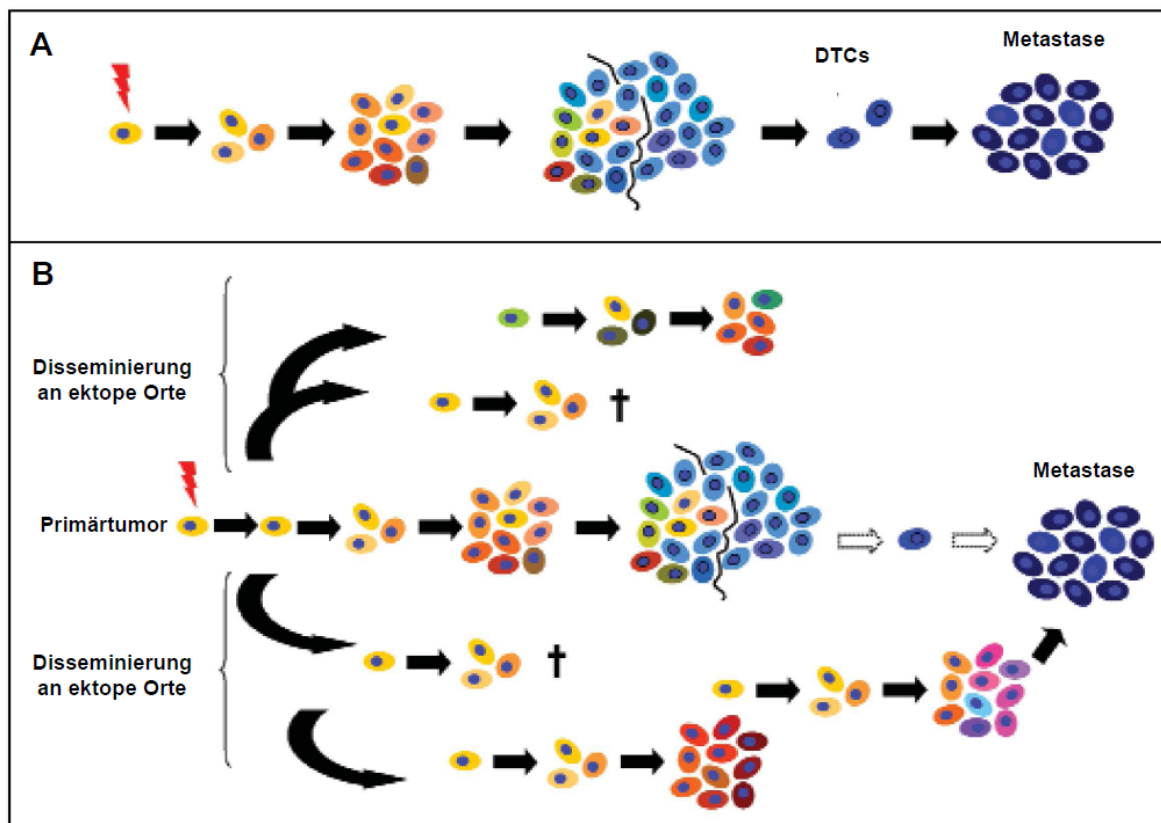


Abb. 2: Modelle der Metastasierung (modifiziert nach [31])

Abgebildet ist der Vergleich der Modelle der linearen Tumorprogression (A) und der parallelen Tumorprogression (B). Das länger bekannte Modell der linearen Progression beschreibt, dass disseminierte Tumorzellen (DTCs) erst spät in der Tumorprogression den Primärtumor verlassen. Analysen von DTCs zeigten allerdings, dass diese andere genetische Aberrationen als der Primärtumor und die Metastase aufweisen (angedeutet durch unterschiedliche Färbung der Zellen). Somit scheint die Disseminierung vor der chromosomalen Instabilität des Primärtumors statt zu finden, so dass DTCs andere Aberrationen als der Primärtumor akkumulieren. Abhängig von den akquirierten Aberrationen können die DTCs überleben und einige sogar zu einer Metastase heranwachsen.

Notwendigkeit der Entwicklung von zielgerichteten Therapien zur Behandlung des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom kann durch Operation, Bestrahlung, Hormontherapie oder Chemotherapie behandelt werden. Die Resektion des Tumors und die Radiotherapie stellen dabei lokale Therapieansätze dar, da sie Krebszellen nur in der Brust, also lokal, eliminieren. Die restlichen der zuvor genannten Therapiemöglichkeiten wirken dagegen systemisch und werden mit dem Ziel eingesetzt, Tumorzellen, welche vom Primärtumor gestreut haben, zu eliminieren [32].

Problematisch bei der Therapie von Mammakarzinompatientinnen ist die Tatsache, dass Patientinnen mit ähnlichen histologischen Charakteristika häufig unterschiedlich auf die gleichen Therapeutika ansprechen [33]. Diese Beobachtung konnte allerdings durch molekulare Unterschiede der jeweiligen Primärtumore erklärt werden. Folglich ist man zunehmend bemüht, den Primärtumor molekular zu charakterisieren, so dass zielgerichtete Therapien gegen spezielle molekulare Eigenschaften des Primärtumors eingesetzt werden können.

Ist der Tumor der Patientin beispielsweise positiv für den Östrogenrezeptor (ER) und/oder den Progesteronrezeptor (PR) und hormonempfindlich, so ist eine endokrine Therapie indiziert [34]. Da bislang alle getesteten Medikamente, welche die tumorfördernde Wirkung des PRs behandeln mit starken Nebenwirkungen einhergehen, wird i. d. R. zunächst die wachstumsfördernde Wirkung des Östrogenrezeptors gehemmt. Neben der Inhibierung von Hormonrezeptoren wird zunehmend auch nach neuen Zielstrukturen gesucht. Das bekannteste Beispiel einer zielgerichteten Therapie zur Behandlung des Mammakarzinoms ist Trastuzumab. Bei diesem Medikament handelt es sich um einen Antikörper, welcher spezifisch die extrazelluläre Domäne des HER2-Proteins bindet. Dadurch kommt es zur Inhibierung der proliferativen und antiapoptotischen Effekte von HER2 sowie zur Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems zur Eliminierung der HER2⁺-Krebszellen [35].

Trotz der enormen Kosten zielgerichteter Therapien wie z. B. mit Trastuzumab zur Behandlung des Mammakarzinoms oder Erlotinib zur Behandlung des Lungenkarzinoms ist der Überlebensvorteil meist relativ gering. Die Behandlung von Mammakarzinompatientinnen mit Trastuzumab beispielsweise verlängert das Leben der Patienten im Schnitt nur um sieben Monate [36]. Somit ist es notwendig, Therapien zu entwickeln, welche geringe Nebenwirkungen besitzen und einen deutlichen Überlebensvorteil für den Patienten bewirken. Für den Erfolg der Therapie ist es dabei ausschlaggebend, dass einerseits das Molekül, gegen das die zielgerichtete Therapie gerichtet ist, von allen Tumorzellen exprimiert wird und andererseits eine Abhängigkeit der Tumorzellen von dem Zielmolekül besteht [37]. Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Zielproteinen für eine solche Therapie könnte dabei die genomische Analyse von DTCs darstellen.

Detektion und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen (DTCs)

Es konnte bereits durch verschiedene Studien gezeigt werden, dass die Detektion von DTCs mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv und einem verminderten Gesamtüberleben einhergeht [26, 38, 39]. Aufgrund dieser prognostischen Relevanz wird vermutet, dass sich unter den DTCs die Vorläuferzellen der Metastasen befinden. Somit haben Methoden zur Detektion und Charakterisierung von DTCs in Patienten in den letzten Jahren zunehmend Beachtung gefunden.

Da DTCs sehr selten sind (1-2 pro 1 Million mononukleärer Zellen aus Lymphknoten oder Knochenmark), werden die mononukleären Zellen, welche auch die DTCs enthalten, mittels eines Dichtegradienten angereichert [40]. Die Detektion der DTCs erfolgt meist durch den immunzytochemischen Nachweis epithelialer Proteine wie z. B. Zytokeratinen (CK) oder dem epithelialen Adhäsionsmolekül (EpCAM). Diese epithelialen Proteine werden von DTCs exprimiert, sind jedoch auf den umgebenden mesenchymalen Zellen (Zellen aus Knochenmark oder Lymphknoten) nicht oder seltener vorhanden. Durch genomische Analysen mittels mCGH (Metaphase Comparative Genomic Hybridization) wurde gezeigt, dass DTCs von M0-Patientinnen oft einen normalen Karyotyp aufweisen und nur mit hochauflösenden genomischen Methoden als aberrant charakterisiert werden können [41, 42]. Somit streuen DTCs früh in der Tumorprogression und die genomischen Aberrationen, welche typisch für vollständig maligne Metastasenzellen sind, werden erst später akquiriert [42, 43].

Zielsetzung

Die Untersuchung von CGH-normalen DTCs aus M0-Patientinnen könnte dazu verwendet werden, frühe und möglicherweise sogar initiierende genomische Aberration zu identifizieren, welche für die Progression des sporadischen Mammakarzinoms von Bedeutung sind. Da frühe Aberrationen eine hohe Wahrscheinlichkeit besitzen von allen Tumorzellen (DTCs, Metastasen, Primärtumor) geteilt zu werden, könnten zielgerichtete Therapien gegen solche Moleküle die

Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom verbessern.

Im Zuge ihrer Dissertation analysierte Dr. Andrea Eberhardt DTCs von M0-Patientinnen mit einem normalen CGH-Profil. Dabei konnte sie zwei häufig deletierte Regionen auf Chromosom 6q identifizieren. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die durch die Deletionen betroffenen Gene zu identifizieren und vielversprechende Kandidaten näher zu charakterisieren. Auf diese Weise können möglicherweise ein oder mehrere Tumorsuppressorgene identifiziert werden, welche eine Rolle in der frühen Progression des sporadischen Mammakarzinoms spielen.

Patientinnen, Kooperationspartner und verwendete Materialien

Patientinnen

In dieser Arbeit wurden zunächst die Primärtumorproben von 97 Patientinnen (25-82 Jahre, mittleres Alter 55) mit invasiv lobulärem oder duktal unilateralem primären Mammakarzinom untersucht. Die Patientinnen wurden zwischen 1992 und 2002 operiert und sowohl als R0 (negativer Resektionsrand) und M0 (keine Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose) charakterisiert. Die mediane Follow-up Zeit betrug 136 Monate. Es verstarben 45 der 97 Patientinnen (46,4 %) tumorbedingt und 47 der 97 Patientinnen (48,5 %) entwickelten eine Metastase. Die klinischen Parameter des Patientenkollektivs sind unter Tabelle 2 zu finden. Da bei einer ersten Analyse ein gehäuftes Auftreten der *SASH1*-Deletion bei trippelnegativen (negativ für den Östrogen- und Progesteronrezeptor sowie fehlende Überexpression des HER2-Rezeptors) Patienten nachweisbar war, wurde des Weiteren die FFPE-Primärtumorproben von 30 Patientinnen mit trippelnegativen Tumoren (28-81 Jahre, mittleres Alter 56) auf das Vorhandensein einer *SASH1*-Deletion untersucht. Diese Patientinnen wurden zwischen 2004 und 2008 operiert und ebenfalls als R0 und M0 charakterisiert. Die mediane Follow-up Zeit betrug 44 Monate. Es verstarben 9 der 30 Patientinnen (30 %) tumorbedingt und 5 der 30 Patientinnen (17 %) entwickelten Metastasen. Die klinischen Parameter dieser zusätzlichen Patientinnen mit trippelnegativem Mammakarzinom sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 2: Klinische Daten der 97 Mammakarzinompatientinnen

	Patienten 97	[%] 100		Patienten 97	[%] 100
Geschlecht			Differenzierungsgrad		
männlich	0	[0]	G1	12	[12]
weiblich	97	[100]	G2	39	[40]
			G3	46	[47]
Alter der Patientinnen bei Diagnose			Resektionsrand		
< 30 Jahre	1	[1]	R0	97	[100]
31-40 Jahre	10	[10]	R1	0	[0]
41-50 Jahre	26	[27]	R2	0	[0]
51-60 Jahre	26	[27]			
61-70 Jahre	20	[21]	ER-Status des Primärtumors		
71-80 Jahre	13	[13]	positiv	64	[66]
> 80 Jahre	1	[1]	negativ	27	[28]
			nicht bestimmbar*	6	[6]
Rezidiv (systemisch)			PR-Status des Primärtumors		
ja	47	[48]	positiv	44	[45]
nein	50	[52]	negativ	49	[51]
			nicht bestimmbar*	4	[4]
Überleben			HER2-Status des Primärtumors		
ja	52	[54]	positiv	36	[37]
nein	45	[46]	negativ	37	[38]
			nicht bestimmbar*	24	[25]
Histologie			Ki67-Färbung		
DCIS	0	[0]	≤10% positive Zellen	38	[39]
LCIS	0	[0]	>10 % positive Zellen	30	[31]
			nicht bestimmbar*	31	[32]
Primärtumorgröße			EGFR-Färbung		
pT1	24	[25]	0	8	[8]
pT2	55	[57]	1	1	[1]
pT3	7	[7]	2	6	[6]
pT4	11	[11]	3	0	[0]
			nicht bestimmbar*	82	[85]
lokale Lymphknotenmetastasen			CK5/6-Färbung		
pN0	44	[45]	positiv	6	[6]
pN1	22	[23]	negativ	9	[9]
pN2	17	[18]	nicht bestimmbar*	82	[85]
pN3	13	[13]			
unbekannt	1	[1]			
Fernmetastasen					
M0	97	[100]			
M1	0	[0]			

*keine Analyse möglich z.B. da kein Tumormaterial mehr vorhanden

Tabelle 3: Klinische Daten der zusätzlichen 30 Patientinnen mit trippelnegativem Mammakarzinom

	Patienten 30	[%] 100		Patienten 30	[%] 100
Geschlecht			Fernmetastasen		
männlich	0	[0]	M0	30	[100]
weiblich	30	[100]	M1	0	[0]
Alter der Patientinnen bei Diagnose			Differenzierungsgrad		
< 30 Jahre	2	[7]	G1	0	[0]
31-40 Jahre	5	[17]	G2	6	[20]
41-50 Jahre	6	[20]	G3	24	[80]
51-60 Jahre	5	[17]	Resektionsrand		
61-70 Jahre	7	[23]	R0	30	[100]
71-80 Jahre	4	[13]	R1	0	[0]
> 80 Jahre	1	[3]	R2	0	[0]
Rezidiv (systemisch)			Ki67-Färbung		
ja	5	[17]	≤10% positive Zellen	3	[10]
nein	25	[83]	>10 % positive Zellen	25	[83]
Überleben			nicht bestimmbar*	2	[7]
ja	21	[70]	EGFR-Färbung		
nein	9	[30]	0	16	[53]
Histologie			1	9	[30]
DCIS	0	[0]	2	3	[10]
LCIS	0	[0]	3	2	[7]
Primärtumorgroße			nicht bestimmbar*	0	[0]
pT1	11	[37]	CK5/6-Färbung		
pT2	16	[53]	positiv	10	[33]
pT3	1	[3]	negativ	20	[67]
pT4	2	[7]	nicht bestimmbar*	0	[0]
lokale Lymphknotenmetastasen					
pN0	20	[67]			
pN1	5	[17]			
pN2	3	[10]			
pN3	2	[7]			
unbekannt	0	[0]			

*keine Analyse möglich z. B. da kein Tumormaterial mehr vorhanden

Kooperationspartner

Das Kaninchen-Serum zur Detektion des SASH1-Proteins in Mammakarzinomzelllinien stellte freundlicherweise PD Dr. Janssen (Technische Universität München) zur Verfügung. Zur besseren Charakterisierung der detektierten SASH1/PLAGL1-Translokation wurden in Kooperation mit Prof. Schröck (Technische Universität Dresden) Spektrale Karyotypisierung (SKY) sowie Painting-FISH-Analysen durchgeführt. Die aCGH-Analysen der DNA aus Zellen mit

SASH1/PLAGL1-Translokation erfolgte in Kooperation mit Dr. Hackmann (Technische Universität Dresden).

Für die Analyse der 97 Mammakarzinompatientinnen (siehe Tabelle 2) wurden uns von PD Dr. Gero Brockhoff (Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg) Gewebemicroarrays aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumormaterial zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten FFPE-tissue microarrays (TMAs) von trippelnegativen Mammakarzinompatientinnen zur selektiven Erweiterung des Patientenkollektivs (n = 30) wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Ortmann, PD Dr. Gero Brockhoff und Dr. Anna Machleidt (Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg) sowie Florian Weber (Universitätsklinikum Regensburg) hergestellt. Die Follow-up Daten ermittelte das Tumorzentrum Regensburg. Die pathologische Beurteilung der EGFR- bzw. CK5/6 gefärbten Präparate erfolgte durch PD Dr. Petra Rümmele.

Materialien

Reagenzien

Reagenz	Hersteller
AB-Serum	Bio-Rad, Dreieich
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
B27	Invitrogen, Darmstadt
bFGF	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bluing Reagent	Ventana, USA
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA 30 % (für Durchflusszytometrie)	Biotest, Dreeich
BSA (für PCR)	Roche, Mannheim
CEP6 Spectrum Orange	Vysis Inc, USA

Reagenz	Hersteller
CEP Hybridisierungspuffer	Vysis Inc, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroquine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Colcemidlösung (KaryoMAX)	Invitrogen, Darmstadt
C0t1-DNA (1 µg/µL)	Roche, Mannheim
DAPI	Roche, Mannheim
DAB-Substrat	DAKO, Hamburg
DEPC-H2O	Invitrogen, Darmstadt
Diluent	DAKO, Hamburg
Dinatriumhydrogenphosphat	
DMEM	Pan-Biotech, Aidenbach
DMEM/F12	Pan-Biotech, Aidenbach
DNA-Leiter 1kb	Invitrogen, Darmstadt
dNTPs (100 mM)	GE Healthcare, München
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epidermal growth factor (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol absolut	J.T. Baker, Griesheim
Fötales Kälberserum (FKS) Gold	PAA Laboratories, Österreich
Fixogum	Marabu, Tamm
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidinisothiocyanat	Fluka, Hamburg
Hämatoxylin	Ventana, USA

Reagenz	Hersteller
Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heringssperma-DNA (10 µg/µL)	Invitrogen, Darmstadt
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Fluka, Hamburg
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200 mM)	Pan-Biotech, Aidenbach
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
MEBM	Lonza, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazetat 2M pH 4	Calbiochem, Hamburg
Natriumzitat	Applichem, Darmstadt
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (10 U/µL)	Pan-Biotech, Aidenbach
Peroxidase Blocking Solution	DAKO, USA
Phytohemagglutinin	Invitrogen, Darmstadt
Polybren	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyhäma	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti-Aqua-Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640	Pan-Biotech, Aidenbach
Salzsäure (37 %)	J.T. Baker, Griesheim
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt

Reagenz	Hersteller
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	AppliChem, Darmstadt
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ultra Conditioner 1	Ventana, USA
UltraPure DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen, Darmstadt
Vectashield-DAPI	Vector Laboratories, USA
Vectashield H-1000	Vector Laboratories, USA
Waschpuffer (Ki67-Färbung)	DAKO, Hamburg
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zeozin	Invitrogen, Darmstadt
Zitronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt

Enzyme

Enzym	Hersteller
HaeIII	New England Biolabs, USA
HpyCH4III	New England Biolabs, USA
HpyCH4V	New England Biolabs, USA
HpyCH4VIII	New England Biolabs, USA
NcoI	New England Biolabs, USA
Protease 1	Ventana, USA
RNAse	Roche, Mannheim
SfaNI	New England Biolabs, USA
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim

Primärantikörper

Antigen (Klon)	Hersteller	Methode	Verdünnung	Endkonzentration
SASH1 (---; Kaninchen-serum)	AG Janssen, TU München	IF*	1:150	unbekannt
Kaninchen Antigen –Isotypkontrolle (Rabbit Ig Fraction Normal)	DAKO, Hamburg	IF*	1:100	200 µg/mL
Ki67 (M7240)	DAKO, USA	IHC**	1:500	70 µg/L
EGFR (D38B1)	Cell Signaling, USA	DFZ***	1:50	unbekannt
CK 5/6 (D5/16 B4)	DAKO, Hamburg	IHC**	1:200	315 µg/L
EGFR (E30)	DAKO, Hamburg	IHC**	1:100	unbekannt

*IF = Immunfluoreszenz, ** IHC = Immunhistochemie, *** DFZ = Durchflusszytometrie

Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Markierung	Verdünnung	Endkonzentration
Ziege-anti-Kaninchen Labelled Polymer, Envision	Dianova, Hamburg	Cy3	1:100	15 µg/mL
	DAKO, Hamburg	MP*	---	unbekannt

*MP = Meerrettich Peroxidase

Plasmide

Plasmidname	Funktion
pMD2G	envelope Plasmid
psPAX2	packaging Plasmid mit gag/pol/rev/tat
pGIPZ	lentivirales Plasmid; enthält shRNAmir gegen das jeweilige Zielgen

Folgende „Sense“-Sequenzen sind in den jeweiligen pGIPZ-Vektoren enthalten:

Vektorname	"Sense"-Sequenz der shRNA
shSASH-A	CACTTGCTAGGCTCAAGGA
shSASH-B	GCAGCAGTATGCAGATTAT
shSASH-C	GAAAGAACCAGAAAGGAAT
shPLAGL1-A*	CTGCTTAAGTTCTTAAGTA
shPLAGL1-B*	TGGGAGAATTTTCAAATA
shNS	ATCTCGCTTGGGCGAGAGTAAG

Die verwendeten shRNA-Sequenzen binden alle bekannten *PLAGL1*-Transkripte (*PLAGL1/ZAC1/LOT1*)

Alle pGIPZ-Vektoren wurden als *E. coli*-Klone von OpenBiosystems erworben.

Oligonukleotide

Zielgen		Oligonukleotidsequenz	Annealing Temperatur (Standard PCR)	Annealing Temperatur (qPCR)
<i>SASH1</i>	5'	CGGGAAAGCGTCAAGTCGGA	58°C	58°C
	3'	CCGACTTTGTTGTTTCAGCAG	58°C	58°C
<i>PLAGL1</i>	5'	CCAGTTATGTGGCAAGACGTT	58°C	58°C
	3'	TCTGGGGGAGAATGGGTAGC	58°C	58°C
<i>HER2</i>	5'	AGCCGCGAGCACCCAAGT	58°C	58°C
	3'	TTGGTGGGCAGGTAGGTGAGTT	58°C	58°C
<i>PPIA</i>	5'	GCTCGTGCCGTTTTGCA	58°C	58°C
	3'	GCAAACAGCTCAAAGGAGACG	58°C	58°C
<i>PUM1</i>	5'	GCAAACATCGATGGCCTACT	58°C	58°C
	3'	TCCTTTTGGTCCATCTTTGC	58°C	58°C
<i>TBP</i>	5'	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	58°C	58°C
	3'	TTCTTGGCAAACCAGAAACC	58°C	58°C
<i>HMBS</i>	5'	GGAATGCATGTATGCTGTGG	58°C	58°C
	3'	CAGGTACAGTTGCCCATCCT	58°C	58°C
<i>OAS1</i>	5'	CAAGCTCAAGAGCCTCATCC	58°C	58°C
	3'	TGGGCTGTGTTGAAATGTGT	58°C	58°C
<i>OAS2</i>	5'	CTGATCGACGAGATGGTGAA	58°C	58°C
	3'	AGGATGTCACGTTGGCTTCT	58°C	58°C
<i>IFI6</i>	5'	GTTCTGGAAGGCCCTGACC	58°C	58°C
	3'	CATTCAGGATCGCAGACCAG	58°C	58°C

Humane Zelllinien

Name	Beschreibung
HEK-293T	embryonale Nierenepithelzellen
BT-20	Basale Mammakarzinomzellen aus Primärtumor isoliert
CAL-51	Basale Mammakarzinomzellen aus pleuraler Flüssigkeit isoliert
CAMA	Luminale Mammakarzinomzellen aus pleuraler Flüssigkeit isoliert
hHME-tert	Mammaepithelzellen
Hs 578T	Basale Mammakarzinomzellen aus Primärtumor isoliert
MCF 10A*	Mammaepithelzellen
MCF7	Luminale Mammakarzinomzellen aus pleuraler Flüssigkeit isoliert
SK-OV-3	Ovarialkarzinomzelllinie aus Aszites isoliert
SK-BR-3	Luminale Mammakarzinomzellen aus pleuraler Flüssigkeit isoliert
T-47D	Luminale Mammakarzinomzellen aus pleuraler Flüssigkeit isoliert

* bei der in dieser Arbeit verwendeten MCF10A-Zelllinie handelte es sich tatsächlich um hHME-tert

Geräte

Gerät	Firma
Axio Imager Z1 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Göttingen
BenchMark Ultra	Ventana, USA
DM RXA Fluoreszenzmikroskop	Leica, USA
ELISA-Messgerät	Molecular Devices, USA
FACS Canto II	BD Biosciences, USA
Gelkammer	Biostep, Jahnsdorf

Gerät	Firma
GeneQuant II (Photometer)	Pharmacia Biotech, USA
LightCycler 480	Roche, Mannheim
MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200	Bio-Rad, USA
MJ Research Peltier Thermal Cycler Tetrad	Bio-Rad, USA
Multipipette Stream	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Schubert und Weiß, München
Pipetten (2 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim
Power Supply PCR	MRC, Israel
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Hanau
Zellkultursicherheitswerkbank S1	Heraeus, Hanau
Zellkultursicherheitswerkbank S2	Heraeus, Hanau
Zytospin-Zentrifuge	Hettich, USA

Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Amicon Ultra-15 zentrifugale Filtereinheit	Milipore, Irland
CIM-Platten	Roche, Mannheim
Combitips Plus 1 mL	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser 18 x 18 mm	Engelbrecht, Edermünde
E-Platten	Roche, Mannheim

Verbrauchsmaterial	Firma
Falcon-Röhrchen (15 und 50 mL)	Becton Dickinson, USA
Fixogum	Marabu, Tamm
Glasobjektträger, geschliffen 90°	Roth, Karlsruhe
Hellendahl-Küvetten	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Nunc, Dänemark
LightCycler 480 Multiwell Platte	Roche, Mannheim
Polypropylen-Reaktionsgefäße (200 µL; 1,5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Polystyren Röhrchen für Durchflusszytometrie	BD Biosciences, USA
Polystyrol Petrischalen (6 cm)	Becton Dickinson, Frankreich
Zellkulturflaschen	Sarstedt, USA
Zellkulturplatten (6-Well, 24-Well, 96-Well)	Greiner-Bio, USA
96-Well Platten Verschlussfolie	Roche, Mannheim

Verwendete Kits

Name des Kits	Firma
Nick Translation Kit	Abbott Molecular, USA
LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green I	Roche, Mannheim
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Qiagen Plasmid Purification	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
UltraView Universal DAB Detektions Kits	Ventana, USA
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega, USA
Wizard SV Gel and PCR Clean Up System	Promega, USA

Verwendete Software

Software	Firma
AxioVision 4.5	Zeiss, Göttingen
Diva 6.1.1	BD Biosciences, USA
FlowJo 8.8.6	TreeStar, Inc.USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, USA
LightCycler 480-Software V1.5	Roche, Mannheim
Q-FISH V 2.2	Leica, Jena
RTCA-Software V 1.2.1	Roche, Mannheim
SPSS V13.0	SPSS Inc., USA

Zusammensetzung von selbst hergestellten Puffer, Lösungen und Medien

20x SSC (Saline–Sodium Citrate)	0,3 M Natriumcitrat
	3 M NaCl
70 % Ethanol	70 g Ethanol
	30 g Wasser
85 % Ethanol	85 g Ethanol
	15 g Wasser
Carnoy-Fixativ	7,5 mL Methanol
	2,5 mL Eisessig
DAPI-Lösung	10 µg/mL DAPI
	4x SSC / 0,2 % Tween-20
GT-Mix	4 M Guanidinisoithiocyanat
	25 mM Nacitrat
	0,5 % N-Laurylsarcosin
	0,1 M β-Mercaptoethanol

Hämatoxylin-Lösung	2 g Hämatoxylin 0,4 g Natriumiodat 100 g Aluminiumkaliumsulfat 100 g Chloralhydrat 2 g Zitronensäure
Leukozytenkulturmedium	RPMI Medium ohne L-Glutamin 15 % FCS 200 U/mL Penicillin 200 U/mL Streptomycin 2 mM L-Glutamin 3 mg Phytohemagglutinin
LB (liquid broth)	1 % NaCl 1 % Trypton 5 % Yeast Extract; pH 7,0
Medium für HME und MCF10A	DMEM/F12 10 % FCS 200 U/mL Penicillin 200 U/mL Streptomycin 2 ng/ mL EGF 0,5 µg/mL Hydrocortison 10 µg/mL Insulin
PBS (Phosphate Buffer Saline)	8,5 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ NaCl 150 mM NaCl pH 7,4

PCR-Puffer + dNTPs	100 mM Tris-HCl
	500 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	1mM des jeweiligen Nukleotids
TBE-Puffer	89 mM TRIS
	89 mM Borsäure
	2 mM EDTANa ₂
	pH 8,3
TE-Puffer	10 mM TRIS-HCl
	1 mM EDTA
	pH 7,4

Methoden

In silico Analyse der Region 6q24.2-25.1

Um herauszufinden, welche Gene in der Zielregion 6q24.2-25.1 liegen, wurde die webbasierte Applikation Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview) zu Hilfe genommen. Für eine erste Reduktion der potenziellen Tumorsuppressorgene wurde mit Hilfe der Website Unigene des National Center for Biotechnology Information (NCBI) die vorhandene Genexpression in gesundem Mammagewebe überprüft [44]. Im Anschluss erfolgte eine Assoziation der Kandidatengene mit dem Mammakarzinom mit publizierten Daten. Zu diesem Zweck wurden die Datenbanken PUBMED und CGEMS („Cancer Genetic Markers of Susceptibility“) durchsucht sowie publizierte Genexpressionsdaten aus der Literatur [45-83] mit einem selbstgeschriebenen perl-basierten Programm analysiert. Dieses Programm vergleicht die Genliste der 6 Mbp Region mit den zu untersuchenden publizierten Daten und zeigt die übereinstimmenden Gennamen an.

Molekularbiologische Methoden

Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Isolierung von großen Mengen Plasmid-DNA („Maxipreps“)

Zur Isolation großer Mengen Plasmid-DNA durch alkalische Lyse wurden 500 mL einer Bakterien-Übernachtskultur unter Verwendung der für das jeweilige Plasmid vom Hersteller angegebenen Antibiotikakonzentrationen hergestellt. Die Isolation der Plasmid-DNA mit dem QIAfilter Maxi Plasmid Kit (Qiagen) unter Verwendung der QIAfilter Maxi Cartridges wurde nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Falls die aufgereinigten Plasmide für die Produktion von Lentiviren verwendet werden sollten, mussten die Plasmide möglichst salzfrei sein, so dass ein

zusätzlicher Waschschrift mit 70 % Ethanol durchgeführt wurde. Die Ausbeuten variierten zwischen 500 und 1000 µg Plasmid-DNA.

Herstellung von Metaphasepräparaten

a) von Leukozyten

20 mL Blut eines gesunden männlichen Spenders wurden mit 280 mL Leukozytenkulturmedium (RPMI Medium ohne L-Glutamin, 15 % FCS, Penicillin 200 U/mL, Streptomycin 200 U/mL, L-Glutamin 2 mM, 3 mg Phytohemagglutinin) vermischt und in T25 Zellkulturflaschen für 72 h unter zweimaligem Schwenken pro Tag inkubiert (37 °C, 5 % CO₂, relative Luftfeuchtigkeit 95 %). Zur Arretierung der Chromosomen in der Metaphase wurde 100 µL Colzemidlösung (10 µg/mL) in jede Kulturflasche hinzugefügt und die Blutzellen nach einer einstündigen Inkubation pelettiert (500 g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden durch eine achtminütige Inkubation des Pellets in 10 mL KCl-Lösung (75 mM) bei 37 °C hypoton behandelt und anschließend vorsichtig in 10 mL eiskaltem Carnoy-Fixativ (Methanol : Eisessig = 3:1) resuspendiert. Die lysierten Erythrozyten wurden durch wiederholtes Waschen mit je 10 mL Fixativ entfernt. Abschließend wurden die Leukozyten in 3 mL Fixativ resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Über Nacht in Ethanol (70 %) gereinigte Glasobjektträger wurden mit Wasser (4 °C) gewaschen und die Leukozytensuspension mit einer Pasteurpipette aus einer Entfernung von ca. 50 cm auf die Objektträger getropft. Das Fixativ wurde durch Inkubation in wasserdampfgesättigter Atmosphäre auf einer Heizplatte (40 °C) entfernt.

b) von Zelllinien

Zur Metaphasepräparation von Zelllinien wurden Zellen (70-prozentige Konfluenz) mit Colzemid-versetztem Medium (0,01 µg/mL Colzemid) für 4 h inkubiert und nach Trypsinierung der Zellen geerntet. Die Zellen wurden nach Verwerfen des Überstandes 20-25 min in 75 mM KCl bei 37 °C inkubiert und im Anschluss wie Blutzellen fixiert, gewaschen und auf Objektträger aufgetropft.

Herstellung von genspezifischen FISH-Sonden

Da keine *SASH1* bzw. *PLAGL1*-spezifischen Sonden kommerziell verfügbar waren, wurde die BAC-DNA der Klone RP11-472O21 für *SASH1* und RP11-214F10 für *PLAGL1* aus dem „Human genome high-resolution BAC re-arrayed clone set (the “32k set”)“ des Children’s Hospital Oakland Research Institute (<http://bacpac.chori.org/pHumanMinSet.htm>) mittels Maxiprep isoliert und durch Nicktranslation markiert.

Die Nicktranslation erfolgte mit dem CGH Nick Translation Kit der Firma Abbott Molecular unter Verwendung von markierten Nukleotiden (Spectrum Green) derselben Firma. Pro Reaktion wurde 1 µg der jeweiligen BAC-DNA eingesetzt.

Die Proben wurden analog dem SCOMP-Protokoll [84] unter Einsatz von 20 µL (*SASH1*) bzw. 25 µL (*PLAGL1*) nicktranslatierter DNA gefällt: Nach Zugabe von 1 µg C0t1- und 0,125 µg Heringssperma-DNA pro µL Sonde wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3M) und 2,5-fachem Volumen Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Präzipitation (45 min; 25000 g; 4 °C), Waschen mit 70-prozentigem Ethanol und erneuter Zentrifugation (45 min; 6000g; 4 °C) wurde das DNA-Pellet getrocknet und dann in 7 µL Hybridisierungspuffer (Vysis), 3 µL H₂O und 0,6 µL CEP6-Sonde bei 75 °C für mindestens 10 min gelöst.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von Metaphasepräparaten (mFISH)

Parallel zur Präzipitation, zum Waschen und zur Aufnahme der Sonde in Hybridisierungspuffer wurden die Metaphasepräparate vorbehandelt. Dazu wurden die Objektträger kurz in 2x SSC (pH 7,4, RT) gewaschen und anschließend die Zellen mit Pepsin für 2-4 min verdaut (100 mg/mL in 10 mM HCl, pH 2,0, 42 °C). Nach dreimaligem Waschen der Objektträger in 1x PBS (pH 7,4; 42 °C) und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 85 %, 100 % Ethanol, je 3 min) wurden die Chromosomen mittels eines Formamid-haltigen Puffers (70 % Formamid in 2x SSC, pH 7,0) bei 70 °C für 105 s denaturiert. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 85 %, 100 % Ethanol, je 3 min) wurden die Objektträger erneut getrocknet und die im Hybridisierungsmix gelöste Sonden-DNA auf den Objektträger aufgetragen, ein Deckgläschen aufgelegt und mit Fixogum luftdicht versiegelt. Die

Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 42 °C für 16 h. Am nächsten Tag wurde der Objektträger nach Entfernen des Fixogums und des Deckgläschens zunächst 7 min in 4x SSC mit 0,2 % Tween (pH 7,4, 42 °C) und dann drei Mal je 5 min in Formamidlösung (50 % Formamid in 2x SSC, pH 7,5, 42 °C) gewaschen. Nach vier fünfminütigen Waschschritten in 1x SSC (42 °C) und drei fünfminütigen Waschschritten in 4x SSC mit 0,2 % Tween (pH 7,4) wurde der Objektträger mit 1 mL einer DAPI-Lösung (2 µg/mL DAPI; 4x SSC mit 0,2 % Tween-20) zur Bänderung der Chromosomen und Anfärben der Zellkerne inkubiert. Abschließend wurde der Objektträger kurz in destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und mit Vectashield H-1000 eingedeckelt.

Auswertung der mFISH

Zur Visualisierung der FISH-Signale von Metaphasepräparaten wurde das Fluoreszenzmikroskop Leica DMRXA mit einer angegliederten CCD-Kamera benutzt. Zellkerne und Chromosomen wurden durch den eingebauten Filter für DAPI visualisiert, während für die Spectrum Green markierten *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Sonden ein FITC-Filter und für die Spectrum Orange markierten Zentromere des Chromosoms 6 ein Cy3.5-Filter verwendet wurde. Zur Ergebnisdokumentation wurde die Software QFISH eingesetzt. Es wurde eine Deletion der Gene *SASH1* bzw. *PLAGL1* detektiert, wenn die Anzahl der genspezifischen Signale geringer als die Anzahl der Chromosom 6 (CEP6)-spezifischen Signale derselben Zelle war. Entsprechend handelte es sich um eine Amplifikation, wenn die genspezifischen Signale vermehrt im Vergleich zu den CEP6-Signalen vorlagen.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von FFPE-Gewebeschnitten

Die Entparaffinierung der auf Objektträger aufgezogenen FFPE-Gewebeschnitte erfolgte durch eine 25-minütige Inkubation bei 72 °C im Brutschrank und zweimaligem Waschen in Xylol (10 min, RT). Anschließend wurde das Gewebe je 20 min in Carnoy-Fixativ (20 °C), Aceton (-20 °C) und Methanol (-20 °C) nachfixiert. Nach Rehydratisierung des Gewebes in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 85 %, 70 % Ethanol) wurden die Objektträger 40 min in 0,01 M Natriumcitrat (pH 6,0)

bei 95 °C und anschließend in einer Pepsinlösung (0,1 % Pepsin in 0,01M HCl) bei 37 °C inkubiert. Das Gewebe wurde dann durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 85 %, 100 % Ethanol) dehydratisiert, zweimal kurz in 2x SSC und einmal in destilliertem Wasser gewaschen. Schließlich wurde 10 µL Sonde, welche zuvor 10 min bei 75 °C denaturiert wurde, auf den FFPE-Gewebeschnitt aufgebracht, mit einem Deckglas und Fixogum luftdicht versiegelt und für 16 h im Brutschrank in der feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde das Deckgläschen vorsichtig entfernt und der Objektträger je 10 min bei 50 °C in 4x SSC, 2x SSC und 1x SSC gewaschen. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser wurde der Objektträger mit zwei Tropfen Vectashield-DAPI eingedeckelt und anschließend bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Mikroskopie und Auswertung der FFPE-Gewebemicroarrays

Die Visualisierung der FISH-Signale erfolgte mit dem Axio Imager Z.1 (Zeiss, Göttingen). Dabei kamen drei verschiedene Filter zum Einsatz, um einerseits Zellkerngröße und -form mittels DAPI-Fluoreszenz (Anregung: 365 nm, Emission: 450 nm) und andererseits die zum jeweiligen Zellkern gehörigen *SASH1*- und Zentromersignale mittels grüner bzw. roter Fluoreszenz detektieren zu können. Zur Detektion der Zentromer 6-spezifischen Sonden wurden Filter für rote Fluoreszenz (Anregung: 545 nm, Emission: 610 nm) und zur Visualisierung der *SASH1*-spezifischen Signale Filter für grüne Fluoreszenz (Anregung 500 nm, Emission 535 nm) verwendet [85]. Die Bilder zur Ergebnisdokumentation wurden durch eine Plan-Apochromat Linse (63x, numerische Apertur 1.4) mit Hilfe der CCD (charge coupled device) Kamera AxioCam MRm (Zeiss) aufgenommen. Das ApoTome™ Modul ermöglichte die Aufnahme von pseudokonfokalen und out-of-focus Aufnahmen über mehrere Ebenen mit Hilfe von Transmissionsgittern und entsprechenden Algorithmen. Um keine FISH-Signale zu verlieren, wurden dreidimensionale Z-Stapel mit definierter Schichtdicke angefertigt. Jede Fluoreszenz wurde einzeln aufgenommen und durch Farb- und Kontrastverstärkung mit Hilfe der AxioVision 4.5 Software digital zu einem zusammengesetzten Bild prozessiert.

Es wurden die FISH-Signale von mindestens 48 Zellen einer Stanze ausgezählt, allerdings konnten aufgrund mangelnden Tumormaterials in acht Fällen nur 20-40

Zellen gewertet werden. Dabei wurden nur Zellkerne ausgewertet, die nicht oder nur wenig überlappten und die in der DAPI-Färbung intakt aussahen. Große Zellkerne wurden bevorzugt untersucht.

RNA-Isolierung aus Zelllinien

Die RNA-Isolierung aus Zelllinien basierte auf dem von Chomczynski 1987 veröffentlichten Protokoll [86]. Nach Ernte der Zellen wurden diese bei 500g pelletiert und die in Tabelle 4 genannten Reagenzien in der aufgeführten Reihenfolge jeweils nach gründlichem Vortexen des Zellpellets hinzugegeben.

Tabelle 4: Menge und Reihenfolge der für die RNA-Isolation verwendeten Reagenzien

Volumen	Reagenz
500 µL	GT-Mix
50 µL	Natriumazetat (2 M; pH 4)
500 µL	Roti-Aqua-Phenol
100 µL	Chloroform

Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 20 min zentrifugiert (20 000g, 4 °C). Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µL Isopropanol gut vermischt. Anschließend wurde die Probe für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Das durch eine erneute Zentrifugation (20 min, 20 000g, 4 °C) erhaltende Pellet wurde mit 300 µL GT-Mix und 300 µL Isopropanol gut vermischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Probe wurde am nächsten Tag 30 min bei 4 °C und 20 000g zentrifugiert und das Pellet mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation (20 000g, 4 °C) wurde das Pellet getrocknet, in RNase-freiem H₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Ermittlung der Sequenzen für cDNA-spezifische Oligonukleotide

Die Sequenzen für die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ermittelt. Als gewünschte Fragmentlänge wurde dabei 140-220 bp angegeben, die restlichen Einstellungen wurden belassen. Um cDNA-spezifische Oligonukleotide zu generieren, wurden die Oligonukleotidbindestellen über Exon-Exon Grenzen oder in unterschiedliche Exone gelegt. Die Spezifität der Oligonukleotide wurde mittels Blastn (<http://130.14.29.110/BLAST/>) unter Verwendung der Datenbank „human genomic plus transcript“ und die Sekundärstruktur durch den „DNA-Calculator“ (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>) untersucht.

Die verwendeten Sequenzen sind auf S. 22 zu finden.

Genspezifische PCR

Für eine genspezifische PCR wurde wie in Tabelle 5 beschrieben zunächst ein Amplifikationsansatz angesetzt und zu 0,5 µL Matrize (mindestens 250 ng DNA) hinzugegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Amplifikationsansatzes (genspezifische PCR)

Volumen	Reagenz
7,25 µL	Ultra Pure DEPC-behandeltes Wasser
1 µL	PCR-Puffer + dNTPs
0,5 µL	5`Oligonukleotid (8 µM)
0,5 µL	3`Oligonukleotid (8 µM)
0,25 µL	BSA (20 µg/µL)
0,1 µL	Taq DNA-Polymerase (5 U/µL)

Das Standard PCR-Programm für die genspezifische PCR ist unter Tabelle 6 zu finden:

Tabelle 6: PCR-Programm für die genspezifische-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	94 °C	2:00 min
2.	58 °C	0:30 min
3.	72 °C	2:00 min
4.	94 °C	0:15 min
5.	58 °C	0:30 min
6.	72 °C	0:20 min
7.	Wiederholung der Schritte 4 – 6 (14 Mal)	
8.	94 °C	0:15 min
9.	58 °C	0:30 min
10.	72 °C	0:30 min
11.	Wiederholung der Schritte 8 - 10 (24 Mal)	
12.	72 °C	2:00 min
13.	4 °C	∞

Restriktionsverdau zur Spezifitätskontrolle des erhaltenen PCR-Amplifikats

Um zu überprüfen, ob die erhaltenen Amplifikate der angenommenen Amplikonsequenz und somit dem jeweiligen Gens entsprechen, wurde ein Restriktionsverdau für jedes PCR-Produkt durchgeführt. Geeignete Restriktions-enzymschnittstellen wurden mit Hilfe des NEB-Cutters V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) so ausgewählt, dass die durch den Verdau mit dem jeweiligen Enzym entstandenen Fragmente um mindestens 15 bp in ihrer Länge divergierten. Die Inkubation der Reaktionsansätze (PCR-Produkt und

Restriktionsenzym) erfolgte 3 h bei den für das jeweilige Enzym laut Herstellerangaben optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen.

Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Für die quantitative Real Time PCR (qPCR) wurde die cDNA der jeweiligen Proben mit cDNA-spezifischen Oligonukleotiden (siehe S. 22) unter Verwendung des LightCycler-Faststart-DNA-master-SYBRGreenI-Kit durch ein geeignetes Temperaturprogramm (Tabelle 7) im Lightcycler LC480 amplifiziert. Die Spezifität der Amplifikationen wurde dabei durch Analyse der jeweiligen Schmelzkurve überprüft, welche durch Erhitzen des Amplifikats von 50 °C mit einer Heizrate von 0,11 °C/s auf 95 °C erhalten wurde. In den Reaktionsansatz zur Amplifikation der SASH1-cDNA wurde zusätzlich 1 % Formamid zugegeben.

Tabelle 7: Temperaturprogramm zur Genexpressionsanalyse mittels qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	95 °C	5:00 min
2.	95 °C	0:20 min
3.	58 °C	0:15 min
4.	72 °C	0:15 min
5.	Wiederholung der Schritte 2 - 4 (39 Mal)	

Die Bestimmung der Expression bestimmter Gene auf RNA-Ebene erfolgte durch effizient-korrigierte relative Quantifizierung [87]. Dabei wird die Genexpression des Zielgens auf ein nicht reguliertes sogenanntes „Haushaltsgen“ (HHG) unter Einbeziehung der unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen bezogen:

$$Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta Ct_{Zielgen} (Kontrolle - Behandlung)}}{(E_{Haushaltsgen})^{\Delta Ct_{Haushaltsgen} (Kontrolle - Behandlung)}}$$

Für die Ermittlung der Effizienz wurde dabei eine Verdünnungsreihe aus einem PCR-Amplifikat des jeweiligen Gens mit den entsprechenden Oligonukleotiden durch qPCR amplifiziert. Aus der Steigung m des Graphen, welche man durch logarithmische Auftragung der Verdünnungsstufe gegen den jeweiligen Ct-Wert erhält, kann die Effizienz E mittels der Formel $E = 10^{(-1/m)}$ berechnet werden.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass das gewählte Haushaltsgen im untersuchten Gewebe trotzdem reguliert wird, wurde in dieser Arbeit die Expression des Zielgens auf vier HHG bezogen (*PUM1*, *TBP*, *PPIA*, *HMBS*) und jeweils der Mittelwert aller vier Ratios gebildet.

Immunzytochemische Färbungen von Zytospins

Herstellung von Zytospins

Für die Detektion des SASH1- bzw. Ki67- Proteins wurden Zytospins der jeweils zu analysierenden Zelllinie hergestellt. Dazu wurden je 100 000 Zellen pro Objektträger mit Hilfe von Zytospineinsätzen und einer Zytospin-Zentrifuge entsprechend der Anleitung des Herstellers auf die Objektträger zentrifugiert. Die Zytospins wurden über Nacht bei 20 °C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Immunzytochemische Detektion des SASH1-Antigens

Falls die zu färbenden Zytospins bei -20 °C gelagert worden sind, mussten die Zellen zunächst für ca. 20 min bei 20 °C aufgetaut werden. Vor der eigentlichen Färbung wurden die Zellen zunächst permeabilisiert. Dazu wurden die Zellen für drei Minuten bei 20 °C mit PBS/0,1 % TritonX100 inkubiert und anschließend viermal für je 1 min mit PBS gewaschen. Der pH-Wert des PBS dieser und aller folgenden Schritte der Immunfluoreszenzfärbung betrug pH 7,0. Anschließend erfolgte ein Blockierungsschritt für 25 min mit PBS/20 % AB-Serum bei 20 °C sowie eine 45-minütige Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (anti-SASH1: 1:150; anti

IgG als Isotypkontrolle: 1:100) in PBS/20 % AB-Serum. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 1 min erfolgte die Detektion mit dem markierten Sekundärantikörper. Dazu wurde ein Cy3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper 1:100 in PBS/20 % AB-Serum verdünnt und für 30 min mit den Zellen im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 1 min erfolgte die Anfärbung des Kerns mit einer DAPI-Lösung (2 µg/mL DAPI in PBS/20 % AB-Serum) für 2 min. Die Objektträger wurden drei Mal für je 1 min in destilliertem Wasser gewaschen und bis zur mikroskopischen Visualisierung in PBS aufbewahrt.

Immunzytochemische Detektion des Ki67-Antigens

Für die Detektion des Ki67-Antigens wurden Zytospins der zu untersuchenden Zellen zunächst für 24 h in Formalin fixiert und die Zellen im Anschluss durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 85 %, 100 % Ethanol) entwässert. Nach kurzer Hydratisierung in destilliertem Wasser wurden die Objektträger 40 min in Zitratpuffer (0,2 mM Zitronensäuremonohydrat und 10 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat in Wasser) bei 100 °C gekocht und anschließend kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Für die folgenden Schritte wurden alle von DAKO gelieferten Reagenzien für eine immunhistochemische Färbung gegen das Ki67-Antigen verwendet. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 20 °C mit der Peroxidase Blocking Solution erfolgte ein fünfminütiges Waschen in dem 1:10 verdünnten Waschpuffer. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit dem Ki67-Antikörper (1:500 in „Diluent“ verdünnt) wurde erneut für fünf Minuten gewaschen. Nach 30-minütiger Inkubation mit dem „labelled Polymer, HRP“ erfolgte ein weiterer Waschschrift. Das Ki67-Antigen wurde schließlich durch 10-minütige Inkubation mit der nach Herstellerangaben vorbereiteten DAB-Substrat-Lösung visualisiert, welche von der Meerrettichperoxidase des Polymers umgesetzt wird. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser erfolgte eine einminütige Färbung in Hämatoxylinlösung und anschließende Bläuung der Zellen durch kurzes Waschen in Leitungswasser. Nach einer kurzen Entwässerung der Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 85 %, 100 % Ethanol) wurden die Zellen eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 20°C gelagert.

Immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten

Die immunhistochemische Färbung der FFPE-Gewebemicroarrays wurde mit Hilfe des BenchMark Ultra-Systems (Ventana) durchgeführt. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Antikörper wurden von Ventana speziell für diese Plattform bezogen.

Nach Entparaffinierung durch Erhitzen der Objektträger (75 °C) erfolgte je nach durchzuführender Färbung eine unterschiedliche Vorbehandlung und Detektion des Antigens.

CK5/6-Immunhistochemische Färbung

Probenmaterial, welches mit CK5/6 gefärbt werden sollte, wurde zunächst hitzevorbehandelt (52 min, 95 °C in Ultra CC1). Nach Inkubation mit dem anti-CK5/6 Antikörper (1:200, 32 min, RT) erfolgte ein „Ultra-Wasch“-Schritt.

EGFR-Immunhistochemische Färbung

Vor einer Detektion des EGFR-Antigens musste das zu färbende Material enzymatisch vorbehandelt werden (vierminütige Inkubation mit Protease 1, anschließend achtminütige Inkubation in 3 % H₂O₂ in Methanol). Nach der Inkubation mit anti-EGFR-Antikörper (1:100, 1 h, RT) erfolgte ein ultraBlock-Schritt.

Die Visualisierung des CK5/6 bzw. EGFR-Antigens erfolgte jeweils durch eine vierminütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus Anti-Rabbit HRP Multimer) aus dem ultraView Universal DAB Detektions Kit. Die Gegenfärbung wurde bei jeder Färbung durch eine je achtminütige Inkubation mit Hämatoxylin und Bluing Reagent erreicht.

Funktionelle Charakterisierung der Niederregulierung von SASH1 bzw. PLAGL1

Klonierung von Zelllinien aus Einzelzellen

Um aus Einzelzellen homogene Zelllinien (Zellklone) zu generieren, wurde jeweils eine Einzelzelle aus einer stark verdünnten Zellsuspension unter dem Mikroskop mit einer 10 µL-Pipette isoliert und in eine Kavität einer 96-Well-Platte mit 200 µL Zellmedium gegeben. Sobald die Konfluenz an einigen Stellen 100 % betrug, wurde der generierte Zellklon jeweils in eine größere Kavität (zunächst in 24-Well, dann in 6-Well-Platte) überführt. Zum Zeitpunkt der Überführung in T25-Zellkulturflaschen wurden die generierten Zellklone als Passage 1 (P1) bezeichnet.

Transfektion von HEK-293T-Zellen zur Herstellung von Lentiviren

$3,5 \times 10^6$ HEK-293T Zellen wurden ca. 18 h vor der Transfektion in 9 cm Petrischalen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion zu ca. 60 % konfluent waren. 45 min vor Beginn der Transfektion wurde das Medium durch Transfektionsmedium (DMEM/10 % FKS/25 µM Chloroquine) ersetzt. Chloroquine wirkt lysosomotrop, so dass die Plasmide nach Aufnahme nicht in den Endosomen/Lysosomen abgebaut werden und somit die Transfektionsrate erhöht wird [88, 89]. Sobald die HEK-293T Zellen ihre Filopodien wieder zurückgebildet hatten, wurden 500 µL 2x HEBS-Puffer (37 °C) in ein steriles Polystyrol-Röhrchen vorgelegt. In einem weiteren Polystyrol-Röhrchen wurden 5 µg pMD2G (envelope Plasmid), 20 µg psPAX2 (packaging Plasmid mit gag/pol/rev/tat) und 20 µg lentivirales Plasmid (enthält shRNA mir gegen das jeweilige Zielgen) in 0,25 M CaCl_2 -Lösung gemischt. Der HEBS-Puffer wurde mit Hilfe eines Vortexers auf der Röhrchenwand verteilt und die DNA/ CaCl_2 -Lösung tropfenweise direkt auf die Oberfläche des HEBS-Puffers zugegeben. Nach einer Inkubation von 25 min bei 20 °C wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die HEK-293T Zellen pipettiert. Nach 6-stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM/10 % FKS.

Ernte der Lentiviren

48 h nach Transfektion enthält der Zellkulturüberstand die generierten Lentiviren. Um höhere Virustiter zu erhalten, wurde der Zellkulturüberstand nach 48 h bei 4 °C aufbewahrt und mit dem Zellkulturüberstand von 72 h vermischt. Der Überstand wurde dann durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatz-Filter filtriert und anschließend mit Hilfe der Zentrifugationseinheiten Amicon Ultra-15 100 kDa etwa um das Zehnfache aufkonzentriert. Das aufkonzentrierte Filtrat wurde nach Aliquotierung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Bestimmung des Virustiters

Für die Titerbestimmung wurden jeweils 4×10^4 zu transduzierende Zellen in einer 12-Kavitäten-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen abgenommen und jeweils 500 µL Virussuspension in den Verdünnungen 1:20, 1:200, 1:300, 1:1000 und 1:2000 sowie unverdünnter Kulturüberstand auf die Zellen gegeben. Zusätzlich wurde auf die Zellen 500 µL Medium mit 10 µg/mL Polybren gegeben, so dass die Virussuspension letztlich 1:40, 1:400, 1:600, 1:2000 und 1:4000 verdünnt wurden. Das Polykation Polybren wurde verwendet, da angenommen wird, dass es die elektrostatischen Ladungen zwischen Viruspartikeln und Zellmembran neutralisiert und sich dadurch die Transduktionseffizienz erhöht [90]. Da die für die Transduktion verwendeten Vektoren das Gen für das grün-fluoreszierende Protein GFP unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimieren, fluoreszieren die Zielzellen nach Transduktion grün. Deswegen wurden die transduzierten Zellen 48 h nach Transduktion geerntet, mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und die Anzahl der GFP-positiven Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS-Canto II bestimmt. Der Titer des Virusstocks wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Titer} = \text{Anzahl der GFP-positiven Zellen [\%]} * \text{Anzahl an ausgesäten Zellen} / \text{Infektionsvolumen}$$

Bestimmung der zur Selektion benötigten Puromycinkonzentration

Da nur transduzierte Zellen durch die Integration der lentiviralen DNA puromycinresistent sind, sollten nicht transduzierte durch das Antibiotikum Puromycin eliminiert werden. Um die für diese Selektion notwendige Puromycinkonzentration zu bestimmen, wurden 50 000 nicht transduzierte Zielzellen in einer 24-Well-Platte ausgesät und ein Tag nach Aussaat mit unterschiedlichen Puromycinkonzentrationen (0-15 µg/mL) für vier Tage behandelt. Jene Konzentration, die nach 1-4 Tagen 100 % der Zellen eliminiert, wird zur Selektion von transduzierten Zellen gegenüber nicht transduzierten Zellen benötigt. Für die in dieser Arbeit verwendeten hHME-tert-Zellen war eine Puromycinkonzentration von 15 µg/mL zur Entfernung nicht transduzierter Zellen notwendig.

Herstellung stabil transduzierter Zelllinien

Zur Herstellung stabil transduzierter Zelllinien wurden in 24-Well-Platten je 5×10^4 Zielzellen 24 h vor Transduktion ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Der Virusstock wurde je nach gewünschter MOI (multiplicity of infection) mit dem entsprechenden Medium der Zielzellen, welches mit 5 µg/mL Polybren versetzt wurde, verdünnt und je 2 mL Virusverdünnung auf die Zellen gegeben. 48 Stunden nach Transduktion erfolgt die Selektion mit Puromycin, um nicht transduzierte Zellen vollständig zu eliminieren. Bei den verwendeten Zielzellen war dafür eine Konzentration von 15 µg Puromycin pro mL Medium erforderlich. Nach vier Passagen wurde die Puromycinkonzentration auf 10 µg pro mL Medium herabgesetzt.

Untersuchung des Wachstumsverhalten von Zelllinien mit Hilfe des XTT-Assays

Die Veränderung der Zellzahl der einzelnen Zelllinien wurde näherungsweise durch Darstellung ihrer metabolischen Aktivität mit Hilfe des XTT-Tests über einen Zeitraum von fünf Tagen nachgewiesen. Das gelbe Tetrazolium-Salz XTT (Natrium 3'-[1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) Benzol-sulfonsäure) wird durch mitochondriale Dehydrogenasen in oranges wasserlösliches

Formazan umgewandelt. Diese Farbveränderung wurde colorimetrisch mit Hilfe des ELISA-Messgeräts Emax detektiert. Die Farbintensität des Zellüberstands korreliert dabei mit der Menge des gebildeten Formazans und somit mit der Menge lebender Zellen. Für den XTT-Test wurde das Arbeitsprotokoll des Herstellers (Roche, Mannheim, Deutschland) leicht abgewandelt. Am Vortag der ersten Messung wurden die zu testenden Zelllinien in einer Dichte von 500 bzw. 1000 Zellen/Kavität in einem Volumen von 100 µL in einer 96-Well-Platte in Triplikaten ausgesät. Jeweils zur gleichen Uhrzeit wurden an den folgenden vier Tagen das elektronenkoppelnde Reagenz (EKR) 1:1000 mit dem XTT-Reagenz verdünnt und je 50 µL EKR/XTT-Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach vierstündiger Inkubation wurde die Substratumsetzung bei einem Wellenlängenbereich von $A_{492\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$ im ELISA-Messgerät bestimmt und die jeweiligen Werte um den Leerwert (zellfreies Medium) reduziert. Die Ergebnisse wurden grafisch über die vier Messtage zusammengefasst und zeigen den Median von vier Experimenten. Die Verdopplungszeiten wurden durch nicht-lineare Regression der exponentiellen Wachstumskurven mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 errechnet und die prozentuale Veränderung der Verdopplungszeit auf die non-silencing Kontrolle bezogen.

Propidiumiodid-basierte Zellzyklusanalyse

Für die Propidiumiodid-basierte Zellzyklusanalyse wurden die Zellen (ca. 50-70 % Konfluenz) zwei Tage nach Aussaat geerntet und 600 000 Zellen in 600 µL 70 % Methanol für mindestens 16 h bei 4 °C fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS/0,2 % BSA wurden die Zellen mit 285 µL PBS/0,2 % BSA/0,1 U/mL RNase resuspendiert und bei 37 °C im Wasserbad für 20 min inkubiert. Nach Zugabe von 15 µL (1 mg/mL) Propidiumiodid wurden die Zellen bis zur Messung am FACS Canto II auf Eis im Dunkeln gelagert. Propidiumiodid interkaliert zufällig und dosisabhängig in DNA und spiegelt somit den Gesamt-DNA-Gehalt einer jeden Zelle wieder. Die Berechnung der prozentualen Anteile der Zellen in der G1, S bzw. G2/M-Phase erfolgte mit der Software FlowJo 8.8.6 unter Verwendung des Watson Models [91].

Migrationsassay/Invasionsassay

Um die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurde das Real-time Cell Analyzer System xCELLigence (Roche, Penzberg) verwendet. Dieses System ermöglicht im Gegensatz zum klassischen Boyden-Kammer-Assay nicht nur eine Endpunktanalyse, sondern auch die Betrachtung des Verhaltens der Zellen in Echtzeit. Die Versuche wurden in CIM-Platten durchgeführt, mit Hilfe derer eine Impedanzmessung auf dem Boden des Wells durchgeführt wird. Die Impedanz ist dabei proportional zu der Anzahl der Zellen, welche migriert bzw. invadiert sind und wird in Echtzeit als Änderung des Zellindex dargestellt.

In den unteren Teil der CIM-Plate wurde als Chemoattraktans 160 µL konditioniertes Medium von normalen humanen dermalen Fibroblasten (FKM) gegeben. Nach dem Zusammensetzen mit dem oberen Teil der CIM-Plate wurde zur Messung der Migration 27 µL DMEM ohne FKS auf den Filter, welcher im oberen Teil der Platte enthalten ist, pipettiert. Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens wurde der Filter mit 20 µL Matrigel (Verdünnung 1:60 mit DMEM/F12) beschichtet. Während der ein- (Migrationsassay) bzw. zweistündigen (Invasionsassay) Äquilibration der CIM-Plate bei 37 °C, wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt und auf 30 000 Zellen/100 µL DMEM-FKS (Migrationsassay) bzw. 150 000 Zellen/100 µL DMEM-FKS (Invasionsassay) eingestellt. Nach der Messung der Hintergrundimpedanz im Analyzer wurden pro Well 100 µL Zellsuspension zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die CIM-Plate schließlich in den Analyzer eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe der integrierten RTCA-Software.

Um auszuschließen, dass die gemessenen Zellindize durch Proliferation der jeweiligen Zelllinie hervorgerufen werden, wurde im Zuge der Etablierung ein Proliferationsassay unter Verwendung einer E-Plate durchgeführt. Dazu wurde 100 µL Medium in die Kavität pipettiert und nach Äquilibration der Elektrode (37 °C, 5 % CO₂, 30 min) je 1500 Zellen in einem Volumen von 100 µL zugegeben.

Herstellung von Polyhämaplatten für die Sphärenkultur

Für die Herstellung von Polyhämaplatten wurde zunächst eine sterile Polyhämalösung hergestellt. Dazu wurde das Polyhämapulver (120 mg/mL) für acht Stunden bei 65°C in 95 % Ethanol gelöst, auf 12 mg/mL verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Beschichtung von 6 cm Platten werden 1,5 mL Polyhämalösung gleichmäßig in jeder Platte verteilt, über Nacht unter dem Zellkulturabzug getrocknet und im Anschluß bei 4°C gelagert. Vor der Kultivierung von Zellen wurden die Platten für 10 min mit UV-Licht bestrahlt.

Herstellung einer Sphärenkultur aus Zelllinien

Für die Generierung von Sphären wurden 150 000 Zellen in 5 mL Sphärenmedium (MEBM; 10 ng/mL EGF, 10 ng/mL bFGF, 4 µg/mL Heparin, 1x B27) in 6 cm Polyhämaplatten (12 mg/mL) ausgesät und nach drei Tagen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nach acht Tagen wurden, die Sphären gezählt und die Sphärenanzahl ins Verhältnis zur Sphärenanzahl der jeweiligen Kontrolle (ohne Translokation bzw. transduziert mit NS-shRNAmir) gesetzt. Während der Kultivierung (37 °C, 5 % CO₂) wurde jeden zweiten Tag 500 µL frisches Sphärenmedium hinzugegeben.

Herstellung von Sphärenkokulturen

Um nach Sphärenbildung beurteilen zu können, ob die gebildeten Sphären aus nur einer oder beiden Zellklonen, die miteinander kultiviert wurden bestehen, wurden zunächst doppelt so viele HME-OT1-Zellen wie benötigt mit dem PKH26 Cell Linker Kit nach Angaben des Herstellers markiert. Im Anschluss wurden 90 000 PKH26-markierte HME-OT1-Zellen mit 60 000 der jeweiligen zweiten Zelllinie analog der Sphäreneinzelkulturen kultiviert und nach acht Tagen ausgezählt.

Durchflusszytometrische Bestimmung der EGFR-Proteinexpression

Aufgrund der schnellen Internalisierung des EGFR-Rezeptors wurden die zu färbenden Zellen gleich nach der Ernte für 10 min bei 37 °C mit 4-prozentiger Formaldehydlösung fixiert. 600 000 Zellen wurden mit PBS/0,5 % BSA gewaschen und anschließend in dieser Waschlösung zur Blockierung unspezifischer Proteininteraktionen für 10 min bei 20 °C inkubiert. Zur Visualisierung des EGFR-Antigens wurde der Alexa-647 markierte anti-EGFR Antikörper der Firma Cell Signaling 1:50 mit PBS/0,5 % BSA verdünnt und mit den Zellen für eine Stunde im Dunkeln bei 20 °C inkubiert. Nach Waschen der Zellen und Aufnahme des Zellpellets in 300 µL PBS/0,5 % BSA wurde die EGFR-Expression am Durchflusszytometer FACS Canto II gemessen. Aufgrund der Überlappung der Emissionsspektren von GFP und Alexa 647 erfolgte eine Kompensation mit Hilfe von ungefärbten und einfach gefärbten Zellen.

Statistische Auswertung

Sowohl die Student-t-Test Analysen als auch die Fisher Exakt Berechnungen wurden mit Hilfe der Internetseite <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> durchgeführt. Bei Verwendung des Student-t-Tests erfolgte dabei eine Normalisierung der Rohwerte der zu testenden Probe auf die Rohwerte jener Probe desselben Replikats mit der ein Vergleich stattfinden sollte.

Für univariate und multivariate Überlebensanalysen der Patientendaten wurde dagegen die Software PASW Statistic Version 18 eingesetzt. Dabei wurde bei den univariaten Überlebensanalysen der log-rank Test eingesetzt und bei den multivariaten Überlebensanalysen die Methode „Vorwärts LR“ verwendet.

Verwendete Standardprotokolle

Zellkultur: Durchführung wie von der „American Type Culture Collection“ (ATCC) empfohlen [92]

Agarose Gelelektrophorese: 1,5 % Agarose in 1x TBE, Durchführung analog [93]

Aufreinigung von PCR Produkten: Verwendung des Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega)

cDNA-Synthese: Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)

DNA-Extraktion aus Agarose-Gel: Verwendung des Wizard SV Gel and PCR Clean Up System

DNA-Isolierung aus Vollblut: Verwendung des Wizard Genomic DNA Purification Kits (Promega)

DNA-Isolierung aus Zelllinien: QIAMP DNA Mini Kit (50) (Qiagen)

Photometrische DNA Bestimmung: Durchführung analog [93]

Ergebnisse

Übersicht über die erlangten Ergebnisse

In Abbildung 3 ist der experimentelle Ablauf meiner Dissertation zum besseren Verständnis schematisch zusammengefasst. Ausgangspunkt war die Identifizierung einer häufig deletierten 6 Mbp-Region auf Chromosom 6q in disseminierten Tumorzellen (DTCs) durch Dr. Andrea Eberhardt [94]. Nach der *in silico* Analyse der 6 Mbp-Region und Eingrenzung der potenziellen Tumorsuppressorgene auf *SASH1* und *PLAGL1* wurde das Vorhandensein der *SASH1/PLAGL1*-Deletion in Primärtumorproben und Mammakarzinomzelllinien validiert. Zudem wurde eine komplexe Translokation von *SASH1/PLAGL1* in der Mammaepithelzelllinie hHME-tet identifiziert. Um den Einfluss der *SASH1/PLAGL1*-Translokation auf die *SASH1/PLAGL1*-Genexpression zu untersuchen, wurden Zellklone aus Einzelzellen generiert. Da die *SASH1/PLAGL1*-Translokation eine Niederregulierung von *SASH1/PLAGL1* bewirkt, ist durch den Vergleich von Zellklonen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation und Zellklonen ohne diese Translokation ein Modell zur funktionellen Charakterisierung von *SASH1/PLAGL1* vorhanden. Des Weiteren wurden die funktionellen Analysen mit Zellklonen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation durchgeführt, welche stabil mit shRNAmir gegen *SASH1* bzw. *PLAGL1* bzw. einer non-silencing-shRNAmir transduziert worden waren. Schließlich wurde das Vorhandensein einer *SASH1*-Deletion in Primärtumoren von Mammakarzinompatientinnen in Zusammenhang mit klinischen Parametern gesetzt.

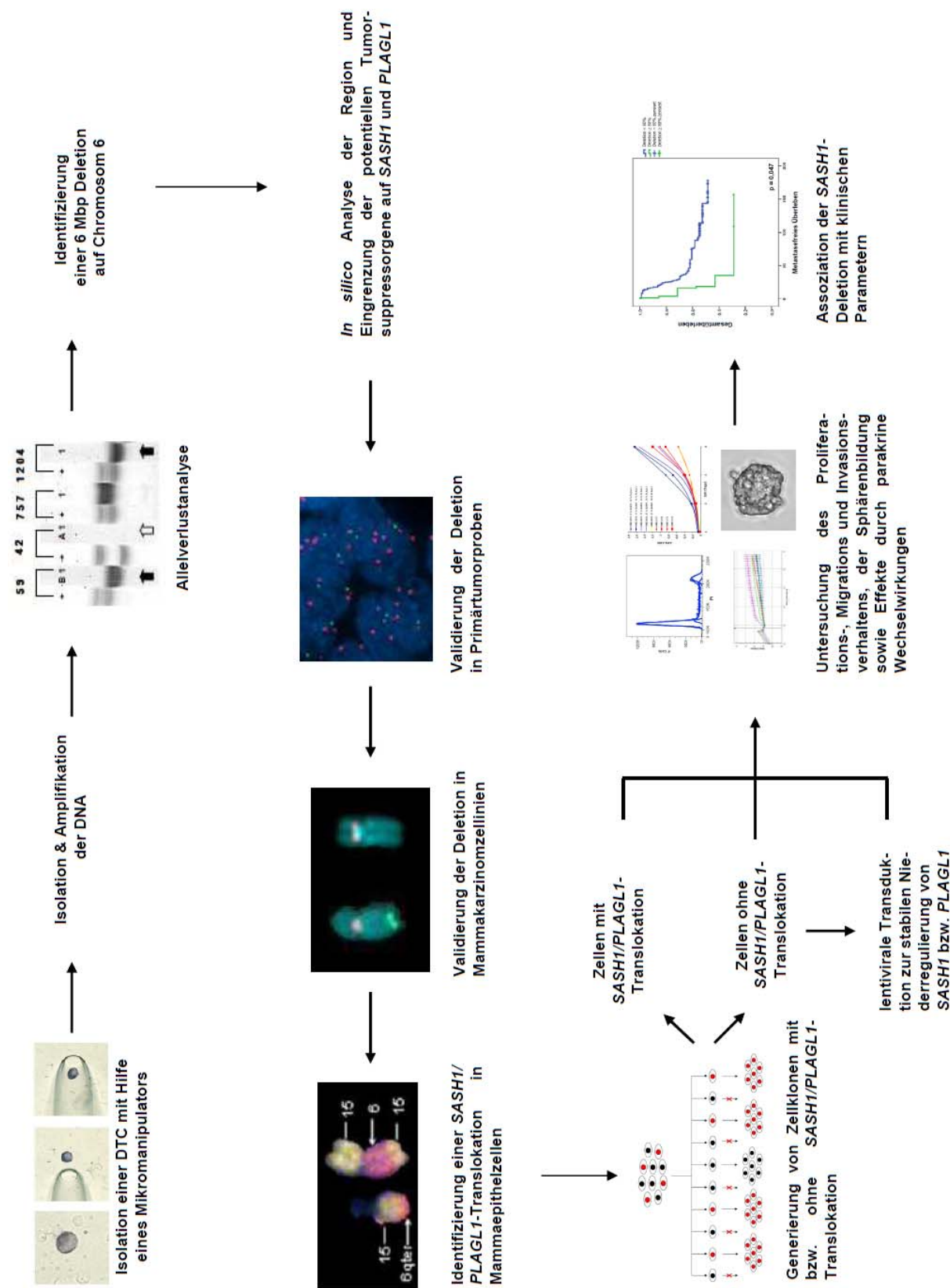


Abb. 3: Übersicht des experimentellen Vorgehens

Identifizierung einer häufig deletierten 6 Mbp-Region auf Chromosom 6q in disseminierten Tumorzellen (DTC) (laboreigene Vorarbeiten)

Basis der vorliegenden Arbeit ist die Dissertation von Dr. Andrea Eberhardt [94]. Ziel ihrer Untersuchung war es, genomische Aberrationen zu identifizieren, welche früh in der Tumorprogression auftreten. Mit Hilfe von Mikrosatelliten- und SNP-Analysen (Abb. 4A) untersuchte sie die DNA von Zytokeratin-positiven DTCs, welche aus dem Knochenmark von Patientinnen im Stadium M0 isoliert worden waren und entweder keine Veränderungen in der mCGH (engl. Metaphase Comparative Genomic Hybridization) aufwiesen (n = 38) oder aber zumindest auf Chromosom 6q keine genomische Aberration zeigten (n = 8). Um auszuschließen, dass die durch Mikrosatelliten- und SNP-Analysen detektierte Aberrationen Artefakte der verwendeten Vorgehensweise (globale Amplifikation der Einzelzell-DNA, mCGH, spezifische Analyse der polymorphen Marker) darstellen, wurden einzelne Zytokeratin-negative Leukozyten isoliert (n = 54) und diese identisch behandelt. Die Analyse von 16 SNP- und Mikrosatellitenmarkern auf einer 34 Mbp großen DNA Region auf Chromosom 6q (Abb. 4A) wies auf einen häufigen DNA-Verlust in der DNA-Region um die Polymorphismusmarker 6, 7 bzw. 11 und 12 in den untersuchten DTCs hin (Abb. 4B). Der Vergleich der Häufigkeit der jeweiligen Allelverluste in den DTCs mit der Häufigkeit der Allelverluste in den Kontrollzellen konnte diese Beobachtung bestätigen ($p < 0,05$; Abb. 4C). Zur Eingrenzung der Bruchpunkte wurde des Weiteren die Häufigkeit der Allelverluste zweier benachbarter Marker für die Zytokeratin-positiven Zellen miteinander verglichen (Abb. 4C). Dabei stellte sich heraus, dass eine maximal 4 Mbp große Region auf 6q24.1 (zwischen Marker 6 und 7) und eine maximal 6 Mbp große Region (6q24.2-6q25.1) zwischen Marker 11 (in *PLAGL1* lokalisiert) und 12 (in *SASH1* lokalisiert) vermehrt in DTCs deletiert sind. Da in diesen häufig deletierten DNA-Regionen potenzielle Tumorsuppressorgene liegen, welche eine Rolle in der frühen Progression des Mammakarzinoms spielen könnten, sollten als nächstes die in den beiden DNA-Regionen lokalisierten Gene identifiziert und durch Literaturrecherchen charakterisiert werden.

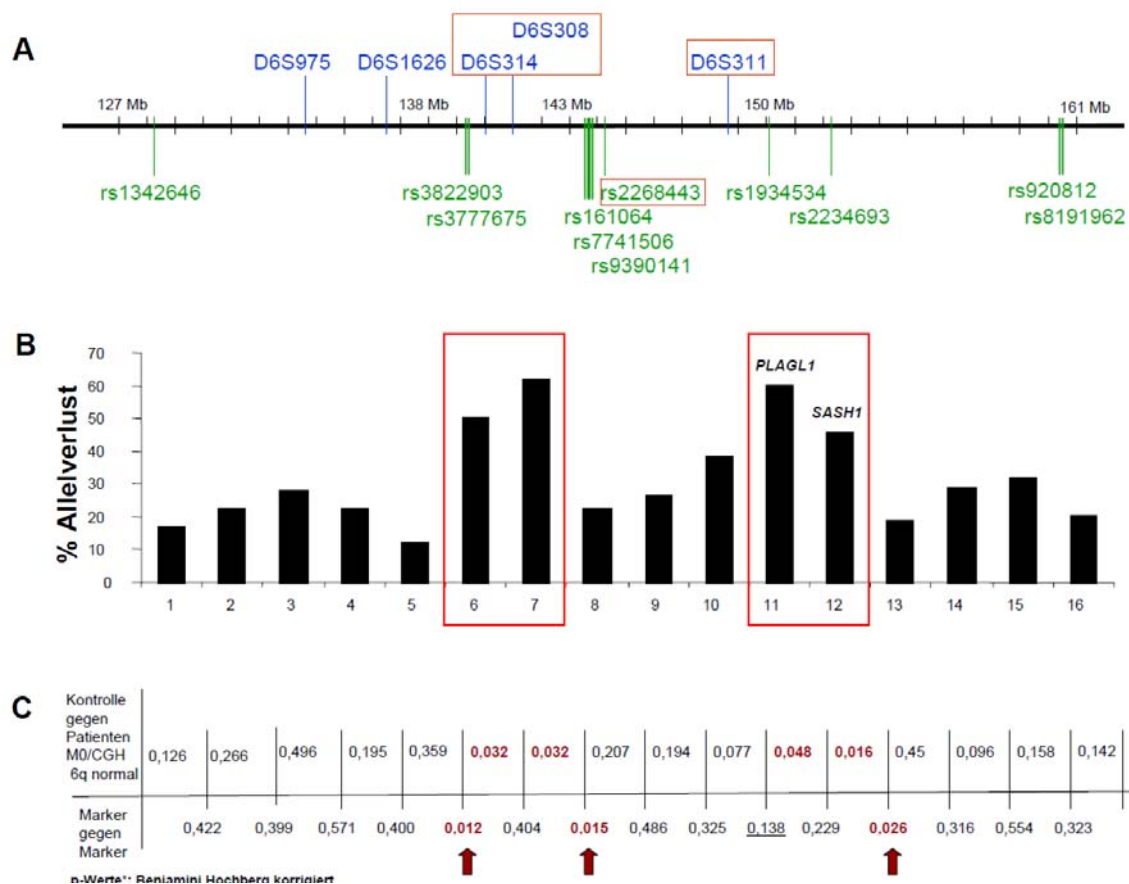


Abb. 4: Allelverlustanalyse einer 34 Mbp großen DNA-Region auf Chromosom 6q (modifiziert nach [94])

- A) Lokalisation der 16 Polymorphismenmarker (blau: verwendete Mikrosatellitenmarker, grün: verwendete SNP-Marker) mit denen eine 34 Mbp große DNA-Region auf Chromosom 6q untersucht wurde.
- B) Darstellung der prozentualen Häufigkeit der detektierten Allelverluste in Mammakarzinompatientinnen im Stadium M0.
- C) Statistische Auswertung der Allelverlust-Analysen von Zytokeratin-positiven Zellen im Vergleich zu Zellen der Kontrollgruppe (nicht gefärbte Patientenzellen) für die jeweiligen Marker. Signifikante p-Werte (Deletion in den disseminierten Tumorzellen) sind rot markiert. Durch statistische Auswertung der Häufigkeit von Allelverlusten von benachbarten Markern kann ein Hinweis auf die Bruchpunkte erlangt werden.

SASH1 und PLAGL1: zwei Kandidatengene für die Suppression einer systemischen Streuung von Mammakarzinomzellen

Zunächst sollten die in der 4 Mbp- bzw. 6 Mbp-Deletion lokalisierten Gene identifiziert werden. Da zu Beginn dieser Dissertation das web-basierte Analyseprogramm Map Viewer des National Center for Biotechnology Information (NCBI) kein einziges Gen in der 4 Mbp Region lokalisieren konnte (Stand: Februar

2007, NCBI Build 36.2), wurde die *in silico* Charakterisierung lediglich mit der 6 Mbp-Region durchgeführt. Im Februar 2007 war die Lokalisation von 37 Genen in dieser Region bekannt, von denen 17 zum damaligen Zeitpunkt als hypothetisch klassifiziert wurden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Auflistung der 37 Gene, welche in der 6 Mbp-Region lokalisiert sind

Zytobande	Position [Mbp]*	Gensymbol**	Genname
6q24.2	144,2	LTV1	LTV1 homolog (S. cerevisiae)
6q24.2	144,2	C6orf94	Chromosome 6 open reading frame 94
6q24-q25	144,3	PLAGL1	Pleiomorphic adenoma gene-like 1
6q24	144,4	<i>HYMAI</i>	Hydatidiform mole associated and imprinted
6q24.2	144,5	SF3B5	Splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa
6q24.2	144,5	<i>MRPL42P3</i>	Mitochondrial ribosomal protein L42 pseudogene 3
6q24.2	144,5	STX11	Syntaxin 11 similar to Translationally-controlled tumor protein (TCTP)
6q24.2	144,6	<i>LOC285741</i>	
6q24	144,7	UTRN	Utrophin
6q24.3	145,9	<i>LOC645749</i>	similar to putative transcription factor ZNF131
6q24	146,0	<i>EPM2A</i>	Epilepsy, progressive myoclonus type 2A; laforin
6q24	146,1	<i>FLJ44955</i>	FLJ44955 protein
6q24	146,2	<i>FBXO30</i>	F-box protein 30
6q24.3	146,2	<i>LOC729411</i>	Hypothetical protein LOC729411
6q24.3	146,3	SHPRH	SNF2 histone linker PHD RING helicase
6q24	146,4	<i>GRM1</i>	Glutamate receptor, metabotropic 1
6q24.3	146,5	<i>FLJ37060</i>	FLJ37060 protein
6q24.3	146,9	RAB32	RAB32, member RAS oncogene family
6q24.3	147,0	<i>C6orf103</i>	Chromosome 6 open reading frame 103
6q24.3	147,2	LOC729176	pseudogene
6q24.3	147,2	<i>LOC729178</i>	hypothetical protein LOC729178
6q24.3	147,6	STXBP5	Syntaxin binding protein 5 (tomosyn)
6q24.3	147,7	<i>LOC645830</i>	hypothetical protein LOC645830
6q24.3	147,8	<i>LOC442266</i>	similar to 65 kDa Yes-associated protein (YAP65)
6q24.3	147,9	<i>LOC389432</i>	hypothetical protein LOC389432
6q24.3	148,7	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1
6q24.3-q25.1	149,0	<i>LOC645934</i>	similar to laminin receptor 1 (ribosomal protein SA)
6q25.1	149,1	UST	uronyl-2-sulfotransferase
6q25.1	149,5	<i>LOC729200</i>	similar to U2 small nuclear ribonucleoprotein B
6q25.1-q25.3	149,7	TAB2	TGF-beta activated kinase 1 SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 4 (S. Cerevisiae)
6q25	149,8	<i>SUMO4</i>	
6q25.1	149,8	<i>ZC3H12D</i>	Zinc finger CCCH-type containing 12D
6q25.1	149,9	<i>LOC729496</i>	Coiled-coil domain containing 59 pseudogene
6q24-q25	149,9	PPIL4	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4
6q25.1	149,9	C6orf72	Chromosome 6 open reading frame 72
6q25.1	150,0	<i>LOC645958</i>	hypothetical LOC645958
6q25.1	150,0	KATNA1	Katanin p60 (ATPase-containing) subunit A 1

* Lokalisation auf Chromosom 6q (in Mbp)

**fett markiert sind jene Gene, die nachweislich in gesundem Mammagewebe exprimiert sind [95]

Die 37 Gene sind alle potenzielle Tumorsuppressorgene, welche eine Rolle in der frühen Tumorprogression des Mammakarzinoms spielen könnten. Für eine spätere funktionelle Charakterisierung sollte eine Eingrenzung auf die vielversprechendsten Kandidatengene erfolgen (Abb. 5). Ein durch das jeweilige Kandidatengen kodierte Protein kann nur vor der Progression zum Mammakarzinom schützen, wenn der kodierte potenzielle Tumorsuppressor im gesunden Mammagewebe exprimiert wird. Lediglich 16 Kandidatengene werden nachweislich in gesundem Mammagewebe exprimiert (Tabelle 8, fett gedruckt).

Zur weiteren Eingrenzung der potenziellen Tumorsuppressorgene wurde eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Datenbanken PUBMED und CGEMs („Cancer Genetic Markers of Susceptibility“) verwendet, sowie publizierte Genexpressionsdaten aus der Literatur [45, 52, 55, 56, 96-104] durch ein selbstgeschriebenes perl-basiertes Programm auf die differentielle Expression der Kandidatengene im malignen Mammagewebe untersucht. Diese Analyse führte zu einer weiteren Reduktion der potenziellen Tumorsuppressorgene auf acht Kandidatengene, welche eine Rolle in der frühen Progression des Mammakarzinoms spielen könnten (*SF3B5*, *UTRN*, *STXBP5*, *C6ORF72*, *KATNA1*, *TAB2*, *SASH1*, *PLAGL1*, Abb. 5).

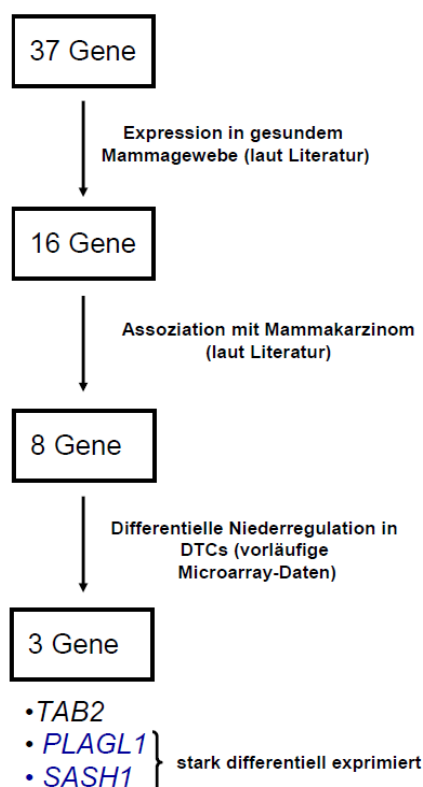


Abb. 5: Darstellung der verwendeten Vorgehensweise zur Eingrenzung der 37 Kandidatengene auf die vielversprechendsten Kandidatengene *SASH1* und *PLAGL1*

Die Beteiligung dieser potenziellen Tumorsuppressorgene an der frühen Tumorprogression des Mammakarzinoms ist allerdings nur gegeben, wenn das jeweilige Kandidatengen in DTCs im Vergleich zu Normalgewebe niederreguliert ist. Zu Beginn dieser Dissertation gab es Hinweise aus Genexpressionsdaten, dass drei der acht Gene (*TAB2*, *SASH1*, *PLAGL1*) eine Niederregulierung in DTCs im Vergleich zu hämatopoietischen Einzelzellen oder mikrodisektiertem Normalgewebe aufwiesen. Diese Genexpressionsdaten werden gegenwärtig noch kritisch überprüft. Da diese Niederregulierung am deutlichsten bei *SASH1* und *PLAGL1* war und auch publizierte Daten am stärksten auf eine Rolle dieser Gene in der frühen Tumorprogression hinwiesen, wurden diese beiden Gene zur weiteren funktionellen Charakterisierung ausgewählt.

SASH1/PLAGL1 sind heterogen in Primärtumorzellen deletiert

Wenn die Hypothese stimmt, dass die Deletion von *SASH1/PLAGL1* ein sowohl frühes als auch wichtiges Ereignis in der Progression des Mammakarzinoms darstellt, sollte der Defekt zumindest bei einigen Mammakarzinompatientinnen in der Mehrzahl der Tumorzellen des Primärtumors vorhanden sein. Eine Möglichkeit dies zu überprüfen, ist die Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) auf Formalin-fixierten Paraffin eingebetteten (FFPE) - Primärtumorproben von Mammakarzinompatientinnen. Folglich wurde die FISH mit sogenannten tissue microarrays (TMA) von FFPE - Gewebe durchgeführt. Die kumulative Analyse der Häufigkeit der Allelverluste von benachbarten Markern ließ einen Bruchpunkt 5' von *PLAGL1* und 3' von *SASH1*, nicht aber zwischen den beiden Genen vermuten (Abb. 4C). Dieser Befund weist darauf hin, dass *PLAGL1* und *SASH1* häufig kodeletiert sind. Diese Hypothese wird zudem dadurch gestützt, dass die physikalische Distanz dieser beiden Gene lediglich 4,3 Mbp beträgt. Folglich wurden die TMA-Schnitte lediglich mit Sonden hybridisiert, die für das Gen *SASH1* bzw. das Zentromer des Chromosoms 6 spezifisch sind. Da für *SASH1* keine genspezifische Sonde kommerziell erhältlich ist, musste diese zunächst aus einem BAC-Klon (BAC, bakterielles artifizielles Chromosom) hergestellt werden. Dazu wurde der BAC-Klon

RP11-472O21 (enthält das *SASH1*-Gen) mit Hilfe der alkalischen Lyse von der bakteriellen DNA getrennt. Um die Qualität der für die FISH verwendeten Sonde sicherzustellen, wurde die isolierte BAC-DNA durch die Firma Sequiserve sequenziert. Diese Sequenzierung zeigte nicht nur, dass die aufgereinigten BAC-DNA-Klone die gewünschten Sequenzen enthielten, sondern auch, dass die aufgereinigte DNA nicht durch andere DNA-Sequenzen kontaminiert war. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die im Folgenden generierte FISH-Sonde lediglich mit DNA-Sequenzen des Gens *SASH1* hybridisieren. Die Spezifität der *SASH1*-Sonden wurde des Weiteren anhand von Metaphasepräparaten von Normalblut und Chromosom 6-spezifischen (CEP6) Sonden bestätigt (Abb. 6).

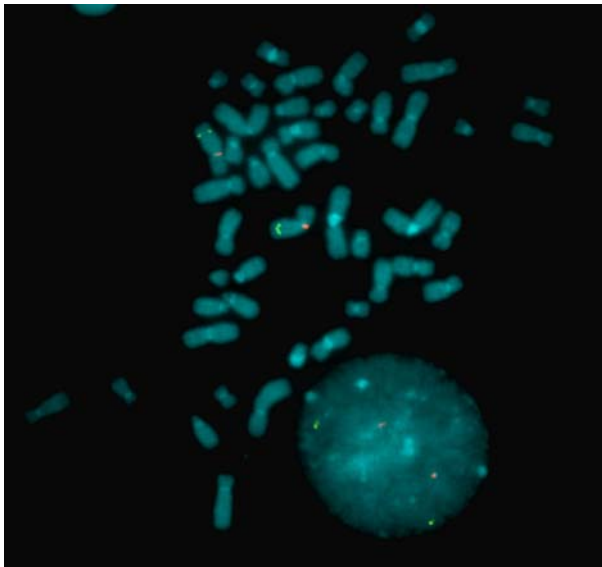


Abb. 6: FISH einer Metaphasepräparation aus Vollblut eines gesunden Probanden am Beispiel von *SASH1*- und Chromosom 6-spezifischen Sonden

Abgebildet ist eine repräsentative Metaphase und eine Interphase eines gesunden Probanden nach Durchführung einer FISH mit Chromosom 6- (rot) und *SASH1*-spezifischen Sonden (grün).

Das Gelingen der FISH an FFPE-Gewebe wurde zunächst an gesundem FFPE-Mammagewebe überprüft. Dabei zeigte sich, dass das *SASH1* zu Zentromer 6 Verhältnis bei der Auszählung von 32 Zellen 1,015 betrug. Der Anteil der Zellen mit *SASH1*-Deletion betrug 6 %. Somit kann durch die durchgeführte FISH-Analyse die Anzahl an deletierten Zellen mit der Fehlerwahrscheinlichkeit von ca. 6 % richtig bestimmt werden.

Als nächstes wurde die FISH-Analyse eines Primärtumor-TMA durchgeführt, welcher von PD Dr. Gero Brockhoff (Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg) zur Verfügung gestellt wurde. Der verwendete TMA besteht aus FFPE-Tumorgewebe von 97 Patientinnen mit invasiv lobulärem oder duktal unilateralem primärem Mammakarzinom (25-82 Jahre, mittleres Alter 55), welche zwischen 1992 und 2002

resiziert wurden und sowohl als R0 (negativer Resektionsrand) und M0 (keine Metastasen zum Zeitpunkt der Operation) charakterisiert wurden. Es zeigte sich, dass es drei Patientengruppen gibt: Gruppe A (7 %) weist überwiegend (in mindestens 80 % der analysierten Zellen) *SASH1*-Deletionen auf, Gruppe B (5 %) weist überwiegend *SASH1*-Amplifikationen auf und Gruppe C (88 %) weist entweder ein ausgeglichenes Verhältnis an *SASH1*-Amplifikationen und -Deletionen auf oder lediglich Chromosom 6 Aneuploidien (Abb. 7). Die mittlere Anzahl an Zellen mit *SASH1*-Deletion in den untersuchten Primärtumorproben betrug 36,8 % (Spannweite 0-97,5 %).

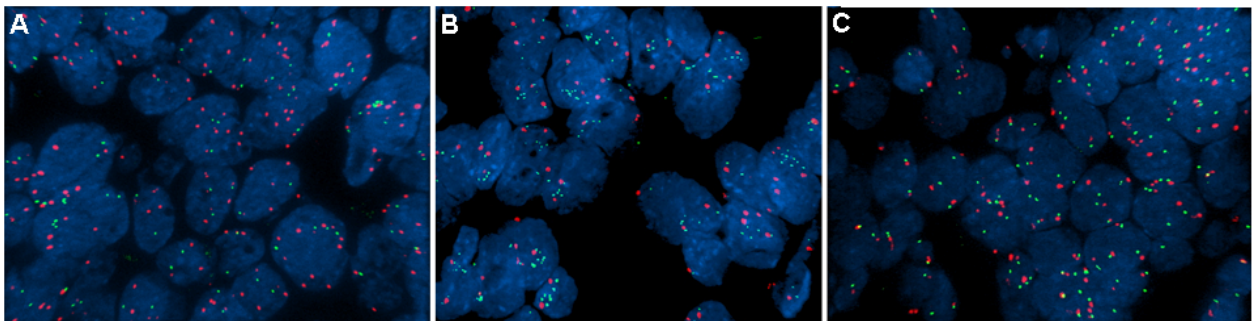


Abb. 7: TMA-FISH von FFPE-Primärtumoren von Mammakarzinompatientinnen

Dargestellt sind repräsentative Primärtumorareale nach Durchführung einer FISH mit Chromosom 6-spezifischen (rot) und *SASH1*-spezifischen Sonden (grün) auf FFPE-Mammakarzinomprimärtumoren. 7 % der untersuchten Primärtumore wiesen hauptsächlich (in mindestens 80 % der analysierten Zellen) eine *SASH1*-Deletionen auf (A), während 5 % der untersuchten Proben überwiegend *SASH1*-Amplifikationen aufwiesen (B). Die meisten Tumorgewebe (88 %) zeigten entweder ein ausgeglichenes Verhältnis an *SASH1*-Amplifikationen und -Deletionen oder lediglich Chromosom 6 Aneuploidien (C).

SASH1 und PLAGL1 sind in Mammakarzinomzelllinien meist kodeletiert

Das Vorhandensein der nahezu klonalen Deletion in 7 % der Primärtumorproben sowie die Detektion der Deletion in DTCs wies auf eine wichtige Rolle von *SASH1/PLAGL1* in der Progression des Mammakarzinoms hin. Bei sieben Mammakarzinomzelllinien (CAMA, T-47D, Hs 578T, MCF7, SK-BR-3, CAL-51, BT-20) sollte nun die Häufigkeit einer *SASH1/PLAGL1*-Deletion mit Hilfe der Metaphasen-FISH untersucht werden. Die *PLAGL1*-spezifische Sonde wurde dabei analog zur *SASH1*-spezifischen Sonde hergestellt und verwendet.

Lediglich zwei Zelllinien (CAL-51 und BT-20) weisen keine *SASH1*- oder *PLAGL1*-Deletion auf. In den restlichen Zelllinien sind *SASH1* bzw. *PLAGL1* beide an der jeweiligen Aberration (Aneuploidie, Deletion bzw. Translokation) beteiligt: In 67 % der SK-BR-3-Zellen sind sowohl das vollständige Chromosom 6 als auch die Gene *SASH1/PLAGL1* drei Mal pro Zelle vorhanden. Somit weist SK-BR-3 in den meisten Zellen lediglich eine Aneuploidie, nicht aber eine Amplifikation von *SASH1/PLAGL1* auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Mammakarzinomzelllinien CAMA, Hs 578T und T-47D häufig eine *SASH1/PLAGL1*-Deletion, da das Gen-zu-Zentromer-Ratio (G/Z) jeweils deutlich unter eins lag (Tabelle 9, Tabelle 10).

Tabelle 9: FISH-Ergebnisse verschiedener Mammakarzinomzelllinien mit *SASH1*- und Chromosom 6-spezifischen Sonden

	G/Z aller Zellen	Zellen mit G/Z ≠ 0		Zellen mit G/Z = 1		
		Anteil der Zellen mit einer <i>SASH1</i> -Deletion [%]	Anteil der Zellen mit einer <i>SASH1</i> -Amplifikation [%]	Anteil der Zellen mit normalem Karyotyp* [%]	Anteil der Zellen mit einer <i>SASH1</i> -Translokation [%]	Anteil der Zellen mit einer Chromosom 6-Aneuploidie [%]
Proband	1,00	5	5	90	0	0
CAMA	0,34	100	0	0	0	0
Hs 578T	0,78	64	1	4	0	31
T-47D	0,81	54	1	3	0	42
SK-BR-3	0,94	19	1	9	1	72
BT-20	1,02	0	0	94	0	6
CAL51	1,01	0	1	92	0	7
MCF7	1,02	6	8	11	100	75

*bezogen auf *SASH1*

Tabelle 10: FISH-Ergebnisse verschiedener Mammakarzinomzelllinien mit *PLAGL1*- und Chromosom 6-spezifischen Sonden

	G/Z aller Zellen	Zellen mit G/Z ≠ 0		Zellen mit G/Z = 1		
		Anteil der Zellen mit einer <i>PLAGL1</i> -Deletion [%]	Anteil der Zellen mit einer <i>PLAGL1</i> -Amplifikation [%]	Anteil der Zellen mit normalem Karyotyp* [%]	Anteil der Zellen mit einer <i>PLAGL1</i> -Translokation [%]	Anteil der Zellen mit einer Chromosom 6-Aneuploidie [%]
Proband	0,99	1	0	95	0	4
CAMA	0,41	97	0	1	0	2
Hs 578T	0,89	48	7	7	0	38
T-47D	0,85	46	2	9	0	44
SK-BR-3	1,01	0	2	7	5	90
BT-20	1,05	0	11	89	0	0
CAL51	1,07	0	12	86	0	2
MCF7	1,00	3	3	8	100	86

*bezogen auf *PLAGL1*

Während in CAMA-Zellen *SASH1/PLAGL1* meist auf vier der sechs vorhandenen Chromosomen 6 deletiert ist, fehlt *SASH1/PLAGL1* in T-47D-Zellen meist auf einem der drei vorhandenen Chromosomen 6 (Abb. 8). In Hs 578T-Zellen weisen Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Deletion sehr verschiedene Karyotypen auf.

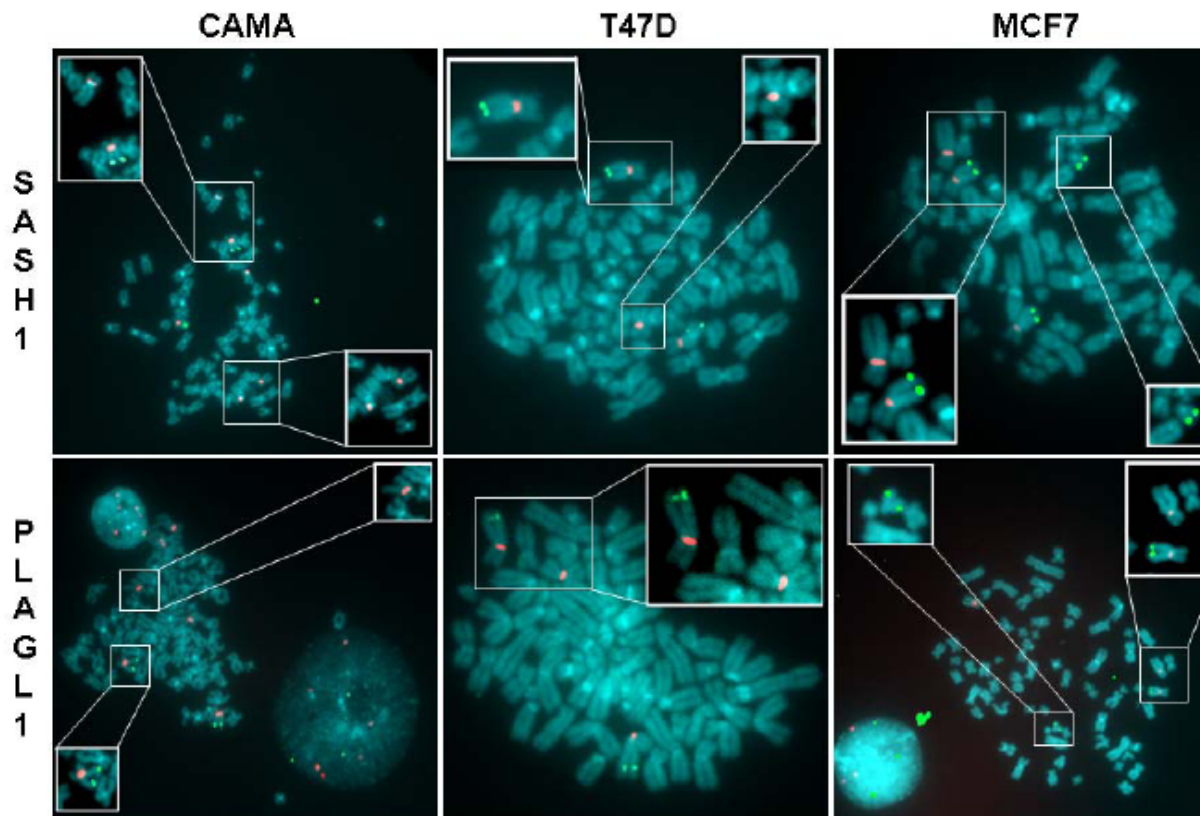


Abb. 8: Metaphasen-FISH der Zelllinien CAMA, T-47D und MCF7

Abgebildet sind repräsentative Metaphasen nach Durchführung einer FISH mit Sonden, welche spezifisch für Chromosom 6 (rot) oder genspezifisch für *SASH1* (oben; grün) bzw. *PLAGL1* (unten; grün) sind.

In MCF7-Zellen wurde in 100 % der untersuchten Metaphasen eine Translokation von *SASH1* bzw. *PLAGL1* detektiert (Abb. 8). Diese wurde in Kooperation mit Prof. Evelyn Schröck (TU Dresden) durch Spektrale Karyotypisierung (SKY) und Paint-FISH Analysen als Translokation zwischen Chromosom 6 und 14 definiert (Abb. 9).

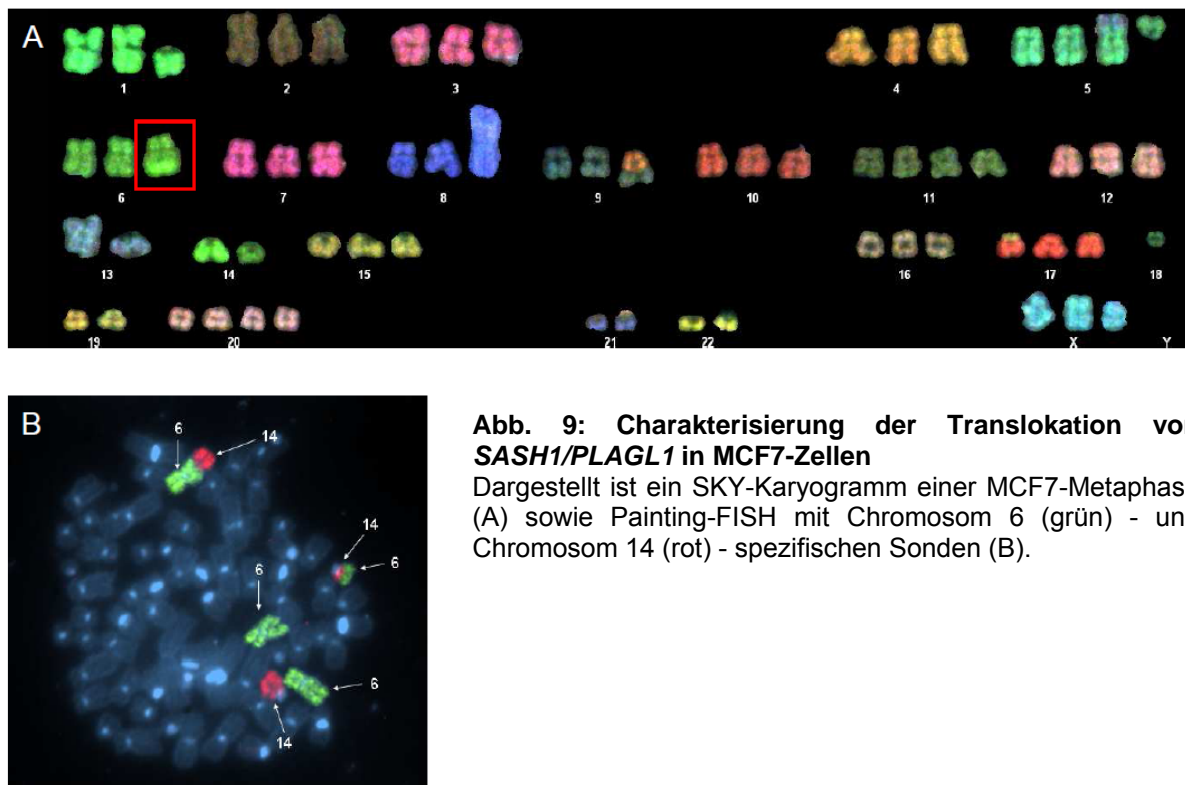


Abb. 9: Charakterisierung der Translokation von *SASH1/PLAGL1* in MCF7-Zellen

Dargestellt ist ein SKY-Karyogramm einer MCF7-Metaphase (A) sowie Painting-FISH mit Chromosom 6 (grün) - und Chromosom 14 (rot) - spezifischen Sonden (B).

Identifizierung und Charakterisierung einer *SASH1/PLAGL1*-Translokation in Mammaepithelzelllinien

Um die Rolle der Gene *SASH1/PLAGL1* bei der Proliferation zu untersuchen, sollte eine funktionelle Charakterisierung von *SASH1/PLAGL1* durch lentivirale Niederregulierung durchgeführt werden. Aufgrund der Hypothese, dass *SASH1* und *PLAGL1* eine Rolle in der frühen Tumorprogression spielen, war es sinnvoll, die funktionelle Charakterisierung in Mammaepithelzelllinien statt in stark transformierten Mammakarzinomzelllinien durchzuführen.

Vor einer experimentellen Niederregulierung von *SASH1/PLAGL1* in der Mammaepithelzelllinie hME-tert musste zunächst sichergestellt werden, dass *SASH1/PLAGL1* in dieser Zelllinie zytogenetisch normal vorliegt, also keine numerischen Aberrationen oder Translokationen von *SASH1* bzw. *PLAGL1* vorhanden sind. Somit wurde auch diese Zelllinie auf *SASH1/PLAGL1*-Aberrationen

mittels FISH analysiert¹. Dabei zeigte sich, dass ca. 40 % der hHME-tert-Zellen eine Translokation von *SASH1/PLAGL1* aufwiesen (Abb. 13A). Um für weitere Charakterisierungen homogene Zellpopulationen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation zu erhalten, mussten die bezogen auf *SASH1/PLAGL1* zytogenetisch normalen Zellen von den translozierten Zellen getrennt werden. Dazu wurden aus Einzelzellen Zellklone generiert und mittels FISH das Vorhandensein bzw. Fehlen der Translokation von *SASH1/PLAGL1* bestimmt. Es stellte sich bei diesem Klonierungsexperiment heraus, dass 30 der 37 (81 %) neu generierten hHME-tert-Zellklone eine *SASH1/PLAGL1*-Translokation statt der erwarteten 40 % der Parentalzelllinie aufwiesen ($p = 0,003$; Abb. 10).

¹ Ursprünglich war geplant, dass für die lentivirale Niederregulierung von *SASH1* und *PLAGL1* biologische Replikate in Form von zwei Mammaepithelzelllinien (hHME-tert und MCF 10A) durchgeführt werden. Da die detektierte *SASH1/PLAGL1*-Translokation in hHME-tert und MCF 10A sehr ähnlich, wenn nicht sogar die Gleiche zu sein schien, stellten sich zwei Hypothesen: 1) Die Translokation hat sich parallel in beiden Zelllinien gebildet oder 2) bei hHME-tert und MCF 10A handelt es sich um dieselbe Zelllinie.

In Kooperation mit Prof. Evelyn Schröck (TU Dresden) wurden zur Überprüfung dieser Hypothesen SKY-Analysen der beiden Zelllinien durchgeführt. Dabei stellte sich zunächst heraus, dass die Karyotypen der beiden Zelllinien identisch waren. Durch einen Vergleich mit publizierten Daten [92, 103, 104] lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den beiden Zelllinien um eine einzige Zelllinie handelt, nämlich hHME-tert. Eine Polymorphismenanalyse durch die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) konnte dies bestätigen.

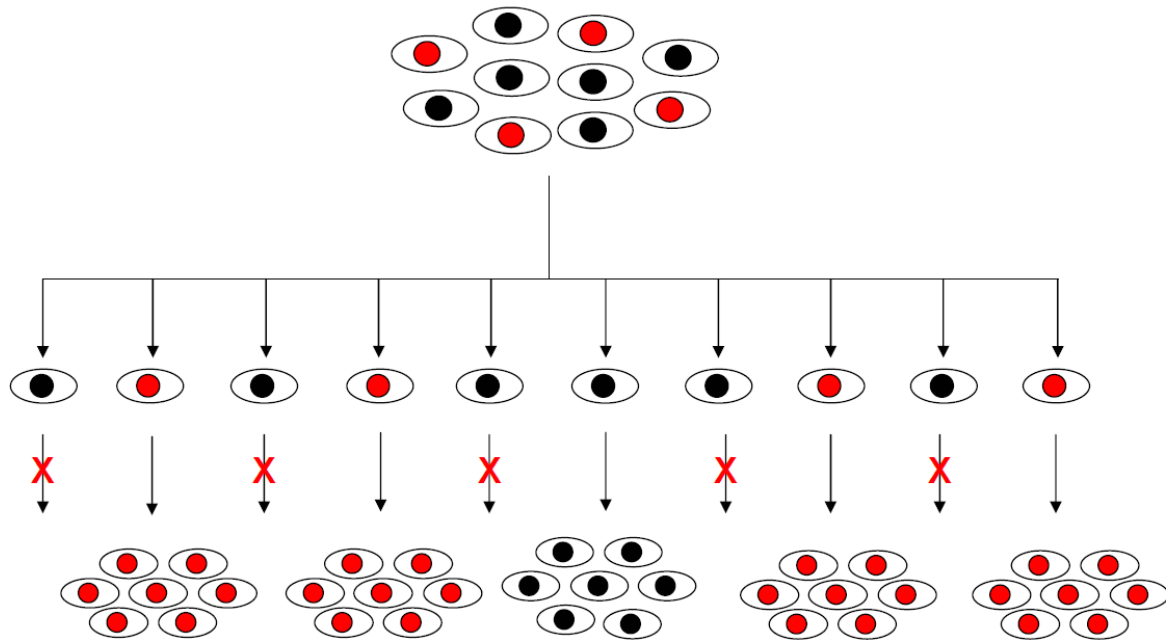


Abb. 10: Schematische Darstellung des Klonierungsexperiments

Um eine homogene Zellpopulation ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation zu generieren, wurden einzelne Zellen isoliert und Zellklone aus den Einzelzellen generiert. Durch FISH-Analysen wurde bestimmt, ob der jeweilige Zellklon aus Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (roter Zellkern) oder ohne diese Translokation (schwarzer Zellkern) bestand. Durchgestrichene Pfeile (X) repräsentieren das fehlende Wachstum von Zellklonen.

Zur genaueren Analyse der *SASH1/PLAGL1*-Translokation wurde in Kooperation mit Prof. Schröck (TU Dresden) Spektrale Karyotypisierungen (SKY) von je vier Zellklonen ohne (Abb. 11) bzw. mit dieser Translokation (Abb. 12) durchgeführt. Aufgrund der durchgeführten SKY wurde vermutet, dass es sich bei der *SASH1/PLAGL1*-Translokation um eine komplexe Translokation handelt. Durch eine Kombination von Painting- und Spot-FISH sowie der durchgeführten SKY-Analysen konnte die komplexe Translokation eindeutig als $t(15;6;15)$ charakterisiert werden (Abb. 13).

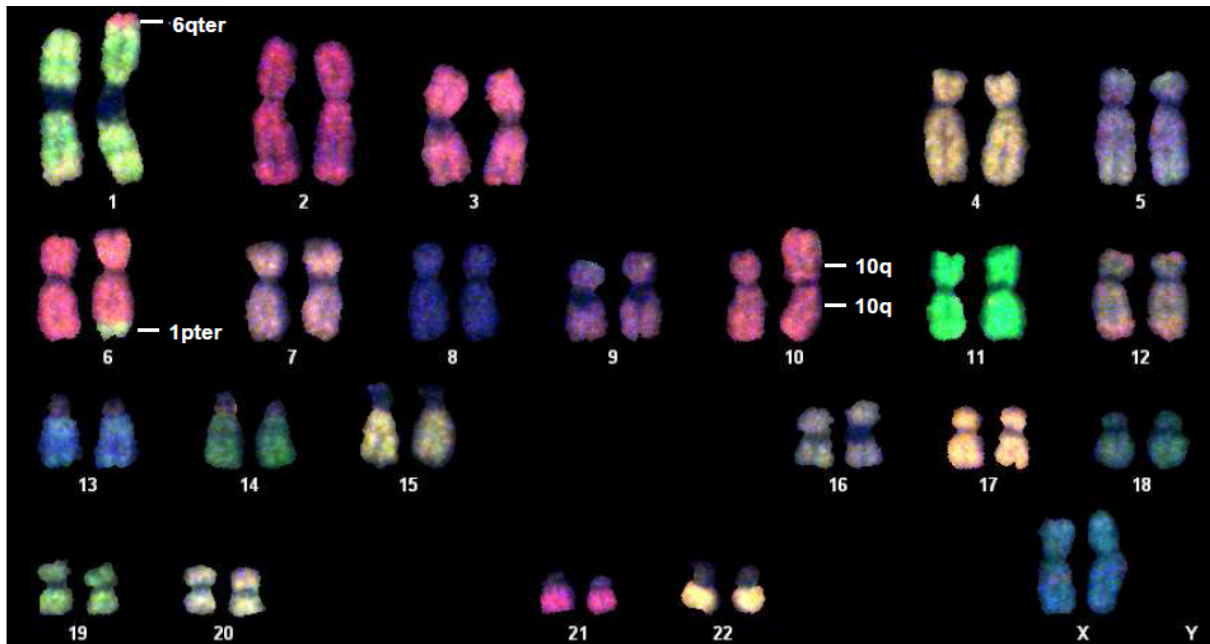


Abb. 11: Spektrale Karyotypisierung (SKY) eines Zellklons ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation
 Dargestellt ist das SKY-Karyogramm eines Zellklons ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation. Die reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 6 wurde mit Sonden verifiziert, welche spezifisch für die Telomere von Chromosom 1 (1pter bzw. 1qter) bzw. Chromosom 6 (6pter bzw. 6qter) sind (Daten nicht gezeigt). Die SKY- Analyse wurde in Kooperation mit Prof. Schröck (TU Dresden) durchgeführt.

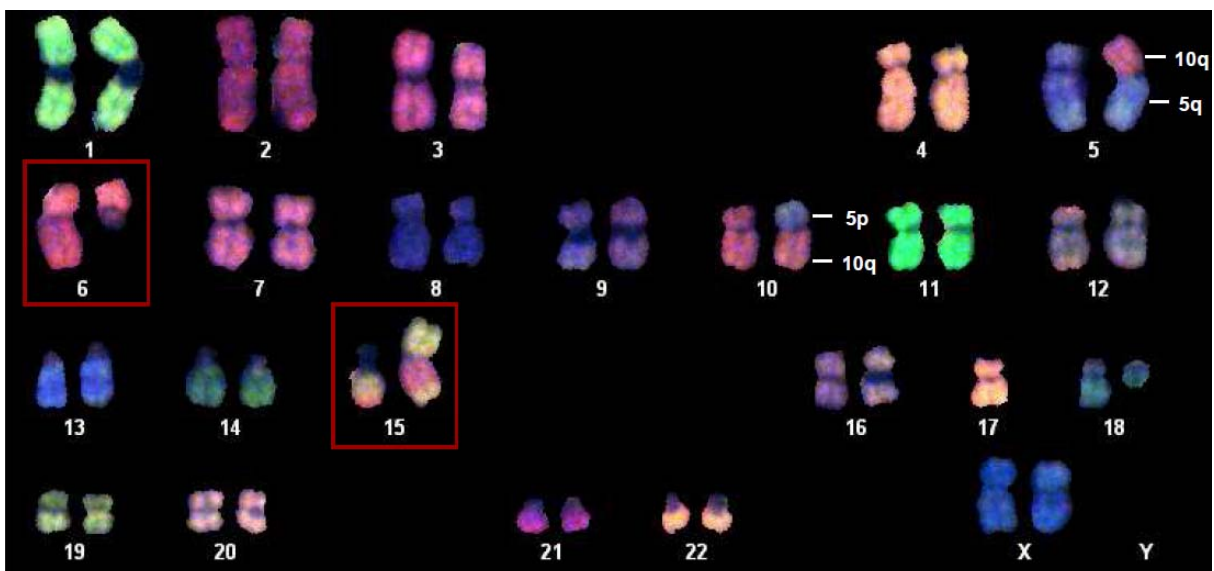


Abb. 12: Spektrale Karyotypisierung (SKY) eines Zellklons mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation
 Dargestellt ist das SKY-Karyogramm eines Zellklons mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation. Die komplexe Translokation t(15;6;15) ist in Abb. 13 näher charakterisiert. Die SKY- Analyse wurde in Kooperation mit Prof. Schröck (TU Dresden) durchgeführt.

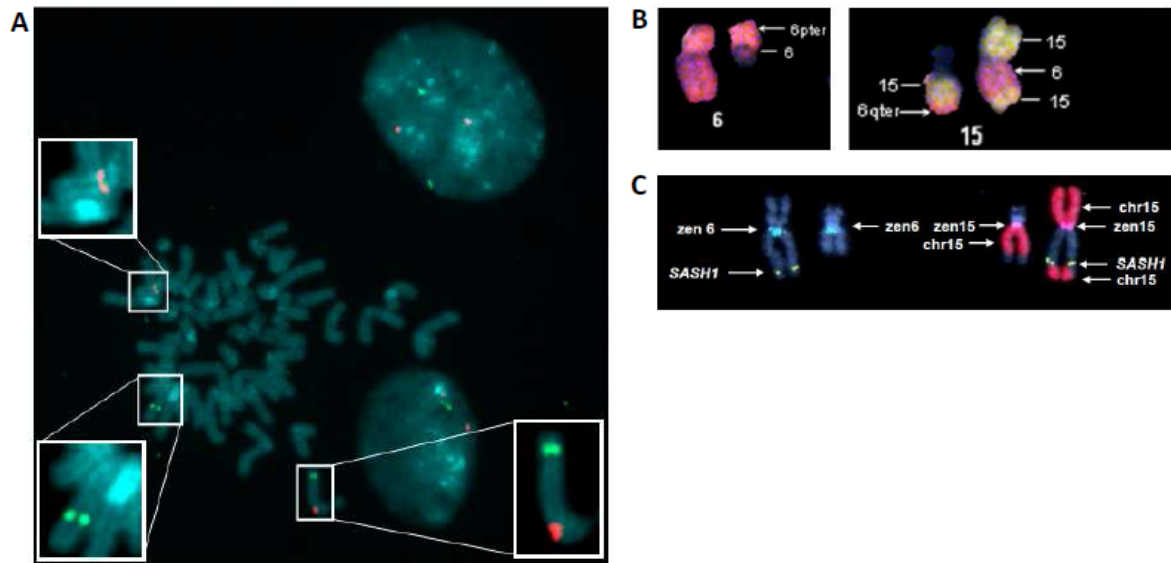


Abb. 13: Charakterisierung der Translokation in hHME-tert, welche *SASH1* und *PLAGL1* beinhaltet

A) Metaphasen-FISH mit Sonden, welche spezifisch für Chromosom 6 (rot) oder genspezifisch für *SASH1* (grün) sind

B) Darstellung der Chromosomen 6 (pink) und 15 (gelb) aus einer SKY-Analyse. Die Bezeichnung 6pter und 6qter beziehen sich auf das Telomer von Chromosom 6p bzw. Chromosom 6q. Die Position dieser Regionen wurde mit einer Spot FISH visualisiert (Daten nicht gezeigt)

C) Kombination von Painting- und Spot-FISH zur eindeutigen Darstellung der Translokation. Zur Visualisierung von Chromosom 15 (chr 15) wurden dunkelrote Paint- und hellrote Zentromersonden (zen 15) verwendet. Das Chromosom 6 kann durch das Zentromer 6 (zen 6, aqua) identifiziert werden. Zur Detektion von *SASH1* wurden Sonden verwendet, welche genspezifisch für *SASH1* sind (grün)

Die SKY- und Painting-FISH Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Schröck (TU Dresden) durchgeführt.

***SASH1* bzw. *PLAGL1* sind in hHME-tert-Zellklonen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation niederreguliert**

Um zu überprüfen, ob die detektierte *SASH1/PLAGL1*-Translokation einen Einfluss auf die *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Genexpression hat, wurde zunächst die relative Quantifizierung mittels quantitativer PCR (qPCR) etabliert. Die Quantifizierung des Gentranskripts erfolgte durch eine effizienzkorrigierte relative Quantifizierung mit Hilfe der qPCR [87]. Dabei wird die Genexpression des Zielgens auf ein nicht reguliertes sogenanntes Haushaltsgen unter Einbeziehung der unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen bezogen.

Es wurden folgende Kriterien zur Auswahl eines geeigneten Referenzgens aufgestellt (Abb. 14):

- 1) Das Referenzgen durfte im Mammakarzinom nicht differentiell reguliert sein
- 2) Bei Verwendung von genomischer DNA als Matrize durfte kein PCR-Produkt gebildet werden, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass durch die verwendeten Oligonukleotide Pseudogene amplifiziert werden
- 3) Da im weiteren Verlauf der Dissertation die experimentelle Niederregulierung von *SASH1/ PLAGL1* mit Hilfe von lentiviralen Vektoren geplant war, durfte die Genexpression des Referenzgens nicht durch Lentiviren beeinflusst werden

Nach Auswahl des jeweiligen Kandidatengens wurde die Sequenz der Oligonukleotide zur cDNA-spezifischen Amplifikation des jeweiligen Gens ermittelt. Die Spezifität der verwendeten Oligonukleotide wurde *in silico* sowie molekularbiologisch (z. B. Restriktionsverdau und Schmelzkurvenanalyse) überprüft (Abb. 14).

Literaturrecherche

- bei Mammakarzinomproben ist Kandidatengen verlässliches Referenzgen [106, 108]
- bei lentiviralem Knockdown ist Kandidatengen verlässlich [109]
- es ist kein Pseudogen für das Referenzgen bekannt



Oligonukleotiddesign

- a) 5' und 3' Oligonukleotide binden in verschiedenen Exons
- b) Oligonukleotide weisen nur schwache Sekundärstruktur auf
- c) Oligonukleotide bilden keine Oligonukleotiddimere



„in silico“ Überprüfung der Spezifität der Oligonukleotide

- das Amplikon ist lediglich zum Referenzgen komplementär
- es sind keine Pseudogene bekannt



Molekularbiologische Überprüfung der Spezifität der Oligonukleotide

- Restriktionsverdau liefert erwartete Fragmente
- DNA als Matrize lässt sich nicht amplifizieren (→ kein Pseudogen vorhanden)
- Derivativspektrum der Schmelzkurve zeigt nur ein Produkt (Abb. 16D)

Abb. 14: Kriterien für die Auswahl eines Kandidatengens als Referenzgen am Beispiel des Haushaltgens *TBP*

Allgemein gilt, dass für eine zuverlässige relative Genexpressionsbestimmung mehrere Referenzgene ausgewählt werden sollten, da eine Variabilität der Genexpression von Haushaltsgenen zwischen verschiedenen Probanden und verschiedenen Zellen eines Organismus möglich ist [105]. Auch ist es wichtig, dass ausgewählte Referenzgene unterschiedlichen Signaltransduktionswegen bzw. Stoffwechselwegen angehören. Auf diese Weise kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass die gewählten Kandidatengene ähnlich reguliert werden. Letzteres könnte zu einer Verfälschung der ermittelten Ergebnisse führen.

Durch den Vergleich mit publizierten Daten [106-109] sowie durch die Anwendung der zuvor genannten Kriterien (Abb. 14) erfolgte die Auswahl der Gene „Peptidylprolyl Isomerase A“ (*PPIA*), „TATA Box bindendes Protein“ (*TBP*), „Pumilio homolog 1“ (*PUM1*) und „Hydroxymethylbilan Synthase“ (*HMBS*).

Als letztes sollte auch experimentell die Zuverlässigkeit dieser vier Referenzgene überprüft werden. Dazu wurde aus acht Zelllinien RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und qPCR mit den Genen *PPIA*, *PUM1*, *TBP* und *HMBS* durchgeführt. Das Verhältnis der erhaltenen Ct-Werte war stets sehr ähnlich, so dass mit Ausnahme der Standardabweichung des Ct-Verhältnisses von *HMBS/PUM1* die Standardabweichungen der berechneten Ratio unter 5 % lagen (Abb. 15). Wie zuvor erwähnt, werden diese vier Gene wahrscheinlich aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen Stoffwechselwegen unterschiedlich reguliert. Somit ist ein gleich bleibendes Verhältnis der Ct-Werte zweier Gene darauf zurückzuführen, dass die Höhe des Ct-Wertes von der eingesetzten Matrizenmenge abhängt. Deshalb stellen die gewählten Gene *PPIA*, *PUM1*, *TBP* und *HMBS* geeignete Referenzgene für die Versuche dieser Arbeit dar.

Des Weiteren wurden geeignete Oligonukleotide zur Analyse der Genexpression der Gene *SASH1*, *PLAGL1* sowie für die folgende Überprüfung der effizienzkorrigierten relativen Quantifizierung des Gens *HER2* ermittelt. Die Spezifität der jeweiligen PCR wurde *in silico* und molekularbiologisch analog des Oligonukleotiddesigns der Referenzgene überprüft (Abb. 14). Der qPCR-Reaktionsansatz zur Bestimmung der *SASH1*-Expression enthielt dabei 1 % Formamid um die Bildung unspezifischer Amplikons zu vermindern (Abb. 16A-C [110]).

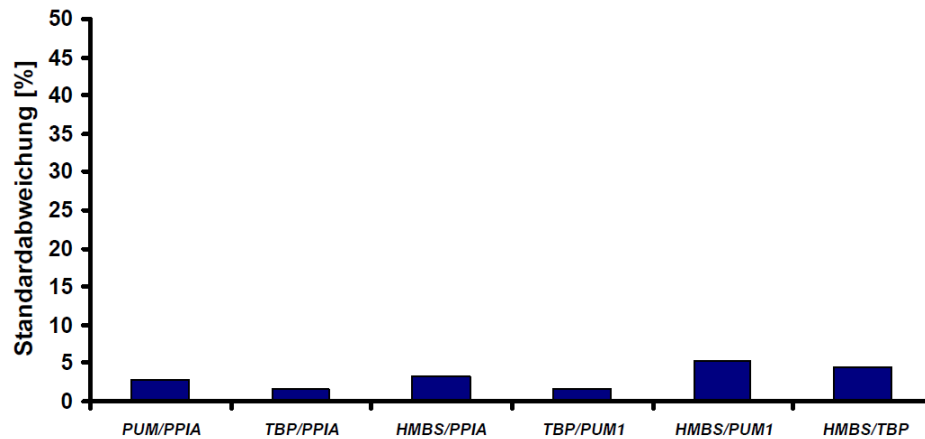


Abb. 15: Standardabweichungen der Ratiobildung von jeweils zwei Referenzgenen

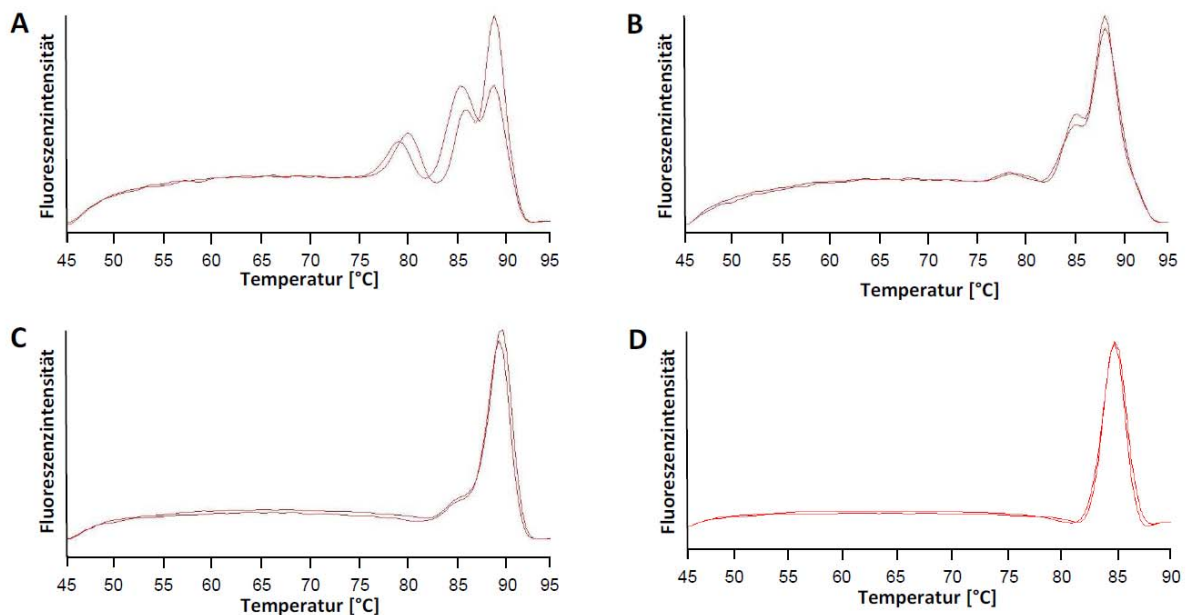


Abb. 16: Darstellung des Derivativspektrums der Schmelzkurve

Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur von jeweils zwei *SASH1* (A-C) bzw. *TBP*-Amplikons (D). Für die Etablierung der *SASH1*-qPCR (A, B) wurde als Matrice das aufgereinigte *SASH1*-PCR-Produkt in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt, während für die restlichen Versuche cDNA der zu untersuchenden Probe verwendet wurde.

A) Derivativspektrum der Schmelzkurve des *SASH1*-Amplifikats nach Einsatz einer geringer Matrizenmenge

B) Derivativspektrum der Schmelzkurve des *SASH1*-Amplifikats nach Einsatz einer geringer Matrizenmenge und Zusatz von 1 % Formamid zum Reaktionsansatz

C) Derivativspektrum einer repräsentativen Schmelzkurve des *SASH1*-Amplifikats einer untersuchten Zelllinie unter Verwendung von 1 % Formamid zum Reaktionsansatz

D) Derivativspektrum einer repräsentativen Schmelzkurve einer spezifischen Amplifikationsreaktion am Beispiel von *TBP*

Für diese Dissertation wurde eine effizienzkorrigierte relative Quantifizierung durchgeführt. Dies ist sinnvoll, da eine Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus nicht immer stattfindet und unterschiedliche Amplifikationseffizienzen der zu analysierenden Genen das Ergebnis verfälschen. Für die Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurde zunächst eine Verdünnungsreihe aus einem PCR-Amplifikat des jeweiligen Gens mit den entsprechenden Oligonukleotiden durch qPCR amplifiziert. Aus der Steigung des Graphen, welche man durch logarithmische Auftragung der Verdünnung gegen den jeweiligen Ct-Wert erhält, wurde die Effizienz berechnet. Die ermittelten Effizienzen für die verschiedenen Transkripte betrugen zwischen 1,87 und 1,98.

Um die Verlässlichkeit der in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die *HER2*-Genexpression der Karzinomzelllinien T-47D, MCF7, SK-OV-3 und SK-BR-3 in Bezug auf die Mammaepithelzelllinie hHME-tert gesetzt und mit publizierten Daten verglichen. Da eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von *HER2*-mRNA und *HER2*-Protein bekannt ist [111], wurde die errechnete mRNA-Expression mit publizierten Proteinexpressionsdaten [112] verglichen (Tabelle 11). Die Rangfolge der errechneten *HER2*-mRNA-Expression mit der publizierten *HER2*-Protein-Expression war dabei dieselbe (SK-OV-3, SK-BR-3, T-47D, MCF7).

Tabelle 11: Vergleich der gemessenen *HER2*-Expression mit publizierten *HER2*-Expressionsdaten

	Erhöhte <i>HER2</i> -Expression im Vergleich zu hHME-tert	Erhöhte <i>HER2</i> -Expression im Vergleich zu HMEC* [112]
SK-OV-3	77	90,3
SK-BR-3	18,5	52,8
T-47D	9,3	0,6
MCF7	1,7	0,5

*HMEC = human mammary epithelial cells

Zudem wurde analog zur Literatur sowohl bei SK-OV-3 (77-fach erhöhte *HER2*-Expression im Vergleich zu hHME-tert) als auch bei SK-BR-3 (18,5-fache Erhöhung der *HER2*-Expression im Vergleich zu hHME-tert) eine deutlich erhöhte Genexpression im Vergleich zu Mammaepithelzellen gemessen. Somit ist die in dieser Dissertation etablierte qPCR-Methode geeignet für die relative Quantifizierung der Genexpression.

Nach der Etablierung der qPCR wurde die Expression der Gene *SASH1* und *PLAGL1* in sechs HME-Klonen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (im folgenden HME-MT genannt) mit der Expression von zwei HME-Klonen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation (im folgenden HME-OT) in drei unabhängigen Versuchen verglichen. Dazu wurde die Expression von *SASH1* und *PLAGL1* jeweils durch eine effizienzkorrigierte relative Quantifizierung auf jeweils eins der vier Haushaltsgene (*PPIA*, *PUM1*, *TBP*, *HMBS*) bezogen und schließlich der Mittelwert aus den vier erhaltenen Ratios errechnet. Diese qPCR-Analyse ergab, dass die Translokation mit einer starken Niederregulierung von *SASH1* (Spannweite der Niederregulierung 35-94 %, $p < 0,0001$) bzw. *PLAGL1* (Spannweite der Niederregulierung 23-62 %, $p < 0,0001$) korreliert.

Um einen Hinweis auf den Grund der Niederregulierung von *SASH1* und *PLAGL1* zu erhalten, wurde in Kooperation mit Dr. Hackmann (TU Dresden) eine aCGH-Analyse mit zwei HME-Klonen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-MT1 und HME-MT2) durchgeführt. Weder im Bereich um *SASH1* noch um *PLAGL1* ließ sich eine Aberration detektieren (Abb. 17).

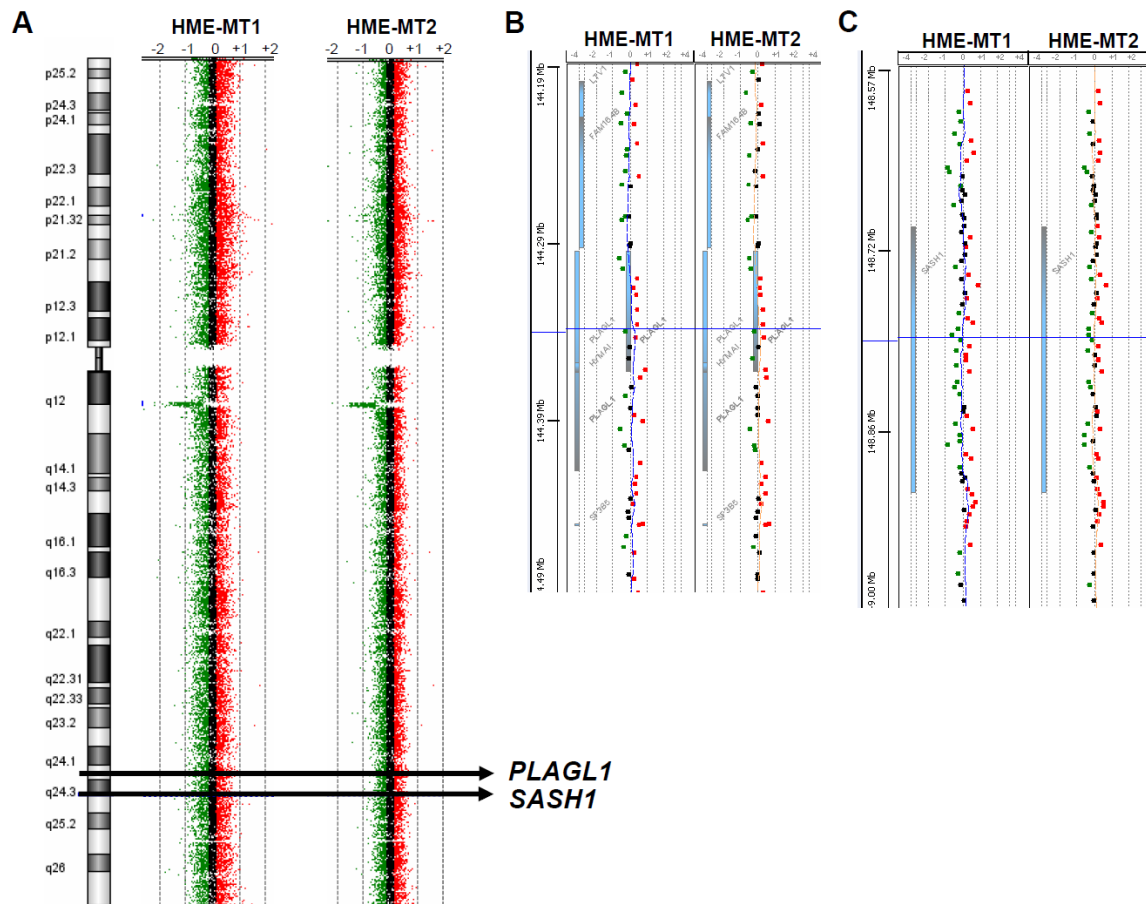


Abb. 17: aCGH zur Bestimmung der *SASH1/PLAGL1*-Translokation

Dargestellt ist die aCGH-Analyse der Zellklone HME-MT1 und HME-MT2 von Chromosom 6 (A) sowie etwas höher aufgelöst in einer Region um *PLAGL1* (B) bzw. *SASH1* (C). Rot markierte Punkte weisen auf DNA-Zugewinne hin, während grüne Punkte auf genomische Verluste hinweisen. Die aCGH-Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Hackmann (TU Dresden) durchgeführt.

Da HME-MT-Zellklone neben der *SASH1/PLAGL1*-Translokation relativ wenige genomische Aberrationen (Abb. 12) im Gegensatz zu vollständig transformierten Zellen wie MCF7 (Abb. 9) aufweisen, kann die Untersuchung der Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (und somit *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung) als Modell zur Analyse der Rolle von *SASH1/PLAGL1* in der frühen Tumorentstehung verwendet werden.

Die lentivirale Transduktion bewirkt eine effiziente Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1*

Der Vergleich von Zellklonen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation kann Hinweise über den kombinatorischen Effekt einer Niederregulierung von *SASH1* und *PLAGL1* liefern. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass unbekannte Effekte durch weitere Gene zustande kommen, welche in HME-OT-Klonen im Vergleich zu HME-MT-Klonen differenziell exprimiert sind. Deswegen sollten zusätzlich *SASH1* und *PLAGL1* in Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation mit Hilfe von shRNAmir exprimierenden Lentiviren niederreguliert werden.

Nach Optimierung des Protokolls zur Generierung von Lentiviren wurden Titer von ca. 10^7 /mL erhalten. Vor der Transduktion der HME-Zielzellen musste allerdings zunächst die Puromycinkonzentration bestimmt werden, mit der nicht transduzierte Zellen eliminiert werden. Dazu wurden je 50 000 nicht-transduzierte HME-OT-Zellen ausgesät und mit puromycinhaltigen Medium für vier Tage kultiviert. 15 µg/mL Puromycin sind notwendig um 100 % der ausgesäten HME-OT-Zellen innerhalb von vier Tagen zu eliminieren (Abb. 18). Transduzierte Zellen überleben dagegen diesen Selektionsprozess, da der verwendete Vektor unter anderem für ein Puromycinresistenzgen kodiert.

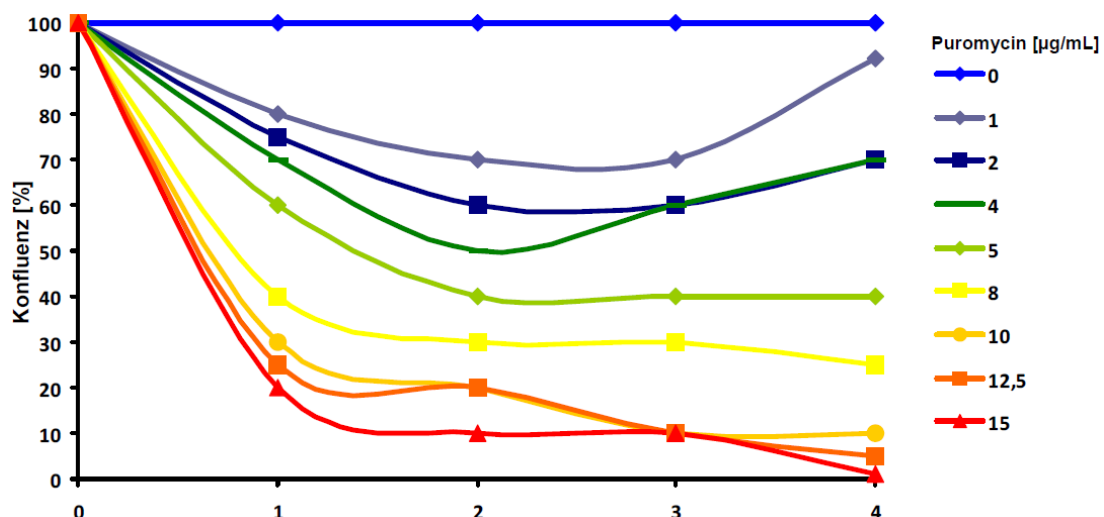


Abb. 18. Bestimmung der notwendigen Puromycinkonzentration zur Eliminierung nicht transduzierter Zellen

Dargestellt ist die visuell ermittelte Konfluenz an Zellen über den Verlauf von vier Tagen bei Kultivierung von HME-OT-Zellen mit verschiedenen Puromycinkonzentrationen im Medium.

Als nächstes musste das bestmögliche Verhältnis von Virus zu Zielzelle ermittelt werden. Um diese sogenannte MOI (engl. multiplicity of infection) zu ermitteln, gab es zwei Kriterien:

- 1) Die MOI sollte möglichst niedrig sein, um unspezifische Effekte so gering wie möglich zu halten. Durch Überprüfung der Genexpression der Gene *OAS1*, *OAS2*, *IFI6* mittels qPCR wurde die Aktivierung des Interferon-Signalweges kontrolliert. Die Spezifität der Amplifikation dieser Gene wurde analog den Referenzgenen *in silico* und molekularbiologisch bestimmt (Abb. 14).
- 2) Als weiteres Kriterium galt, dass die Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* so stark wie möglich sein sollte.

Um herauszufinden, welche MOI das beste Ergebnis liefert, wurden HME-OT-Zellen mit einer MOI von 5; 2; 1; 0,5; 0,3 und 0,1 als repräsentatives Beispiel mit *PLAGL1*-Vektoren transduziert und die Expression der Gene *OAS1*, *OAS2* und *IFI6* durch relative effizienzkorrigierte Quantifizierung mit nicht transduzierten Zellen verglichen. Des Weiteren wurde ein sogenannter „Aktivierungsfaktor“ durch Multiplikation dieser berechneten Werte ermittelt (Tabelle 12). Dieser Aktivierungsfaktor zeigte wie erwartet, dass die kumulative Aktivierung des Interferon-Signalweges generell umso höher war, je höher die MOI war. Bei Verwendung von MOIs größer 1 war so eine Verdopplung bis fast Verdreifachung der Genexpression von *OAS1* und *OAS2* im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen zu detektieren. Die Niederregulierung der *PLAGL1*-Expression (im Vergleich zur non-silencing Kontrolle) wurde durch den Einsatz unterschiedlicher MOI nicht wesentlich beeinflusst (Spannweite der Niederregulierung: 51-70 %).

Tabelle 12: Bestimmung der Genexpression von *PLAGL1*, *OAS1*, *OAS2* und *IFI6* bei Verwendung verschiedener MOIs

	<i>PLAGL1</i> * [%]	<i>OAS1</i> **	<i>OAS2</i> **	<i>IFI6</i> **	Aktivierungsfaktor***
MOI: 0,1	38	2,70	0,78	0,66	1,4
MOI: 0,3	36	1,27	1,45	2,14	3,9
MOI: 0,5	38	1,39	1,85	1,04	2,7
MOI: 1	49	0,82	2,67	1,15	2,5
MOI: 2	42	2,60	2,32	1,69	10,2
MOI: 5	30	2,80	0,88	1,51	3,7

*Verbleibende *PLAGL1*-Expression im Vergleich zur non-silencing Kontrolle in Prozent

** Veränderung der *OAS1/OAS2/IFI6*-Expression im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen als Vielfaches

*** Multiplikation der einzelnen *OAS1/OAS2/IFI6*-Faktoren

Erst eine Erhöhung der Genexpression von Genen des Interferon-Signalweges um mehr als das Zweifache weist auf unspezifische Effekte hin [113]. Folglich wurden für die funktionelle Charakterisierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* zwei translokationsfreie hHME-tert Zellklone (HME-OT1 und HME-OT4) mit einer MOI von 0,1 stabil transduziert und nicht transduzierte Zellen durch Puromycinselektion eliminiert. Zur Niederregulierung von *SASH1* wurden drei Lentiviren mit drei unterschiedlichen shRNAmir Sequenzen gegen *SASH1* verwendet, die im Folgenden shSASH-A, shSASH-B und shSASH-C genannt werden. Für die Niederregulierung von *PLAGL1* konnten nur zwei der drei von Open Biosystems verfügbaren *PLAGL1*-shRNAmir-Vektoren eingesetzt werden (shPLAGL-A, shPLAGL-B), weil eine blastn-Analyse der angebotenen dritten shRNA-Sequenz ergab, dass neben der Ziel-mRNA (*PLAGL1*) eine 100-prozentige Bindung der mRNA der Deoxycytidin Kinase erfolgt. Somit wird diese Kinase neben *PLAGL1* ebenfalls niederreguliert, so dass eine alleinige Niederregulierung von *PLAGL1* nicht gegeben ist. Zur Einschätzung unspezifischer Effekte, welche experimentell bedingt sind, wurden HME-OT1- bzw. HME-OT4-Zellen des Weiteren mit Lentiviren transduziert, welche eine shRNAmir-Sequenz ohne Zielgen enthält (non-silencing (NS)-Kontrolle).

Die Überprüfung der Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* erfolgte mittels effizienzkorrigierter relativer Quantifizierung und Vergleich mit der jeweiligen non-silencing Kontrolle in biologischen Replikaten (n = 3). Diese zeigte, dass alle verwendeten Vektoren das jeweilige Zielgen niederregulieren. Dabei unterschieden sich je nach verwendetem Vektor und Zelllinie die Effizienzen der Niederregulierung (Tabelle 13, Tabelle 14). In HME-OT1-Zellen beispielsweise wurde bei Verwendung des Lentivirus shSASH-B nur eine Niederregulierung von *SASH1* um 37 % im Vergleich zur non-silencing Kontrolle erreicht. Im Gegensatz dazu wurde in HME-OT4-Zellen *SASH1* durch die im Vektor shSASH-B kodierte shRNAmir um 62 % niederreguliert.

Tabelle 13: Verbleibende Expression von *SASH1* im Vergleich zur non-silencing Kontrolle (n = 3)

	Verbleibende Expression [%]	
	in HME-OT1	in HME-OT4
shSASH-A	41	36
shSASH-B	63	38
shSASH-C	28	23

Tabelle 14: Verbleibende Expression von *PLAGL1* im Vergleich zur non-silencing Kontrolle (n = 3)

	Verbleibende Expression [%]	
	in HME-OT1	in HME-OT4
shPLAGL-A	16	24
shPLAGL-B	16	53

Durch die Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* proliferieren mehr Zellen

Um zu überprüfen, ob durch eine Niederregulierung der putativen Tumorsuppressorgene *SASH1* bzw. *PLAGL1* eine vermehrte Anzahl an Zellen proliferieren, sollten zunächst XTT-Assays mit stabil transduzierten HME-OT1- und HME-OT4-Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen unter Verwendung von verschiedenen Zellpassagen (n = 3) durchgeführt werden. Der XTT-Assay basiert auf der Spaltung eines gelben Thiazoliumsalzes zu orangenem Formazan durch lebende Zellen. Die Menge des gebildeten Formazans wird über die Absorptionsdifferenz bei 492 nm (Absorptionsmaximum von Formazan) und 690 nm (Hintergrundfluoreszenz) ermittelt. Da angenommen wird, dass eine vermehrte Formazanbildung auf eine erhöhte Zellanzahl zurückzuführen ist, wird die Zellanzahl indirekt bestimmt. Bei Durchführung des XTT-Assays über mehrere Tage hinweg lässt sich somit das Wachstum von Zellen bestimmen.

Zunächst musste die optimale auszusäende Zellzahl ermittelt werden. Dazu wurden 500, 1000 und 2000 Zellen der zu testenden Zellen ausgesät und die Absorptionsdifferenz über vier Tage ermittelt. Am vierten Tag wurde die Konfluenz der Zellen mikroskopisch beurteilt. Über 50 % der getesteten Zelllinien, von denen zu Beginn 2000 Zellen ausgesät wurden, waren nach vier Tagen zu 100 % konfluent. Die Aussaat von 2000 Zellen zu Beginn des Versuches ist somit zu viel, da u. U. die Zellteilungsrate am vierten Tag in diesen Zelllinien durch Kontaktinhibition vermindert wird. Letzteres zeigte sich auch in den erhaltenen Wachstumskurven einiger Zelllinien, da bei Aussaat von 2000 Zellen die Wachstumskurven ab Tag 3 wieder abflachten (Abb. 19). Die Aussaat von 500 Zellen zu Beginn des Versuches ist bei den verwendeten Zelllinien ebenfalls ungeeignet, da ein Anstieg in den Wachstumskurven erst ab Tag 3 zu beobachten ist (Abb. 19). Lediglich bei Aussaat

von 1000 Zellen ist ein eindeutiges und kontinuierliches exponentielles Wachstum in dem beobachteten Zeitraum nachzuweisen. Folglich wurden für alle folgenden Versuche 1000 Zellen zu Beginn des jeweiligen Versuches ausgesät.

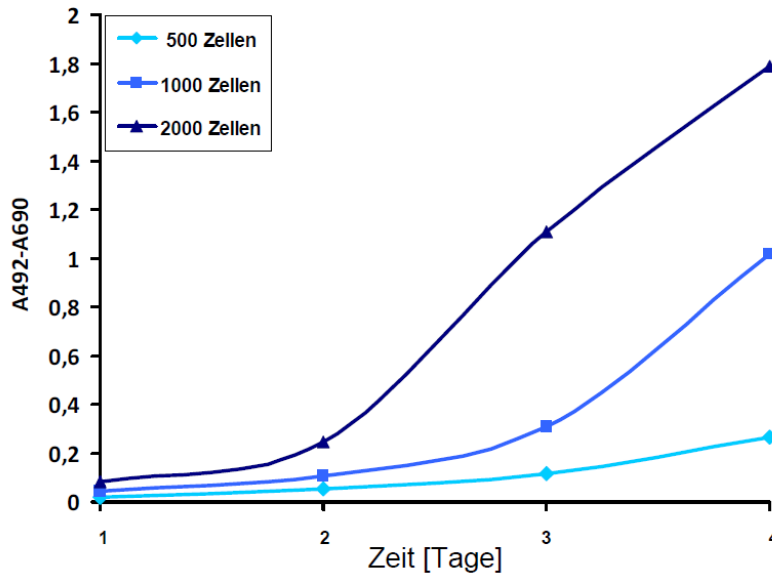


Abb. 19: Bestimmung der auszusäenden Zellzahl zu Beginn des XTT-Assays

Aufgetragen ist die Absorptionsdifferenz zwischen 492 nm und 690 nm (mittels eines ELISA-Messgeräts vier Stunden nach Zugabe des XTT-Reagenz gemessen) gegen die Zeit. Zum Vergleich der optimalen auszusäenden Zellzahl sind die erhaltenen Wachstumskurven nach Aussaat von 500, 1000 bzw. 2000 einer exemplarischen Zelllinie dargestellt.

Die Umsetzungsgeschwindigkeit des eingesetzten Thiazoliumsalzes in Formazan ist abhängig von dem verwendeten Zelltyp, so dass zudem der optimale Messzeitpunkt nach Zugabe des XTT-Reagenz auf die Zellen bestimmt werden musste. Es wurde die Absorptionsdifferenz je eine, zwei, drei oder vier Stunden nach Zugabe des XTT-Reagenz mittels eines ELISA-Messgerätes ermittelt.

Ausschlaggebend für die Bestimmung des optimalen Messzeitpunktes ist dabei der Erhalt einer exponentiellen Wachstumskurve sowie die Höhe der Absorptionswerte. Letzteres ist wichtig, damit etwaige Unterschiede zwischen unterschiedlichen Zelllinien deutlicher herausgearbeitet werden können. Durch Anwendung dieser beiden Kriterien wurde der 4-Stunden-Messpunkt als optimaler Zeitpunkt ermittelt und für alle weiteren Versuche verwendet (Abb. 20).

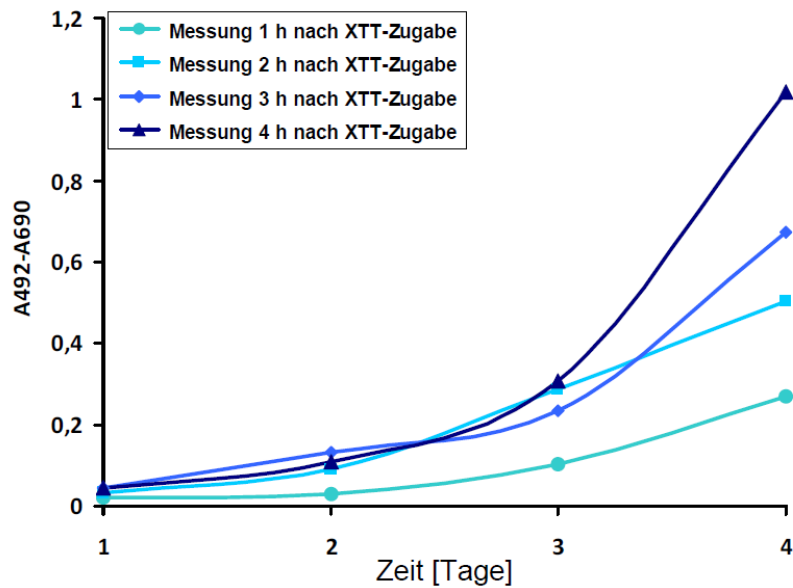


Abb. 20: Bestimmung des optimalen Messpunktes beim XTT-Assay

Zur Darstellung der Wachstumskurve des verwendeten Zellklons (Aussaat 1000 Zellen) ist die Absorptionsdifferenz zwischen 492 nm und 690 nm gegen die Zeit aufgetragen. Die Absorptionswerte wurden jeweils 1 h, 2 h, 3 h oder 4 h nach Zugabe des XTT-Reagenz mit Hilfe eines ELISA-Messgerätes ermittelt.

Nach der Etablierung des XTT-Assays wurde das Wachstumsverhalten der stabil transduzierten Zellklone mit den entsprechenden Kontrollen (nicht transduziert bzw. transduziert mit non-silencing Vektor) verglichen. Zellklone, welche mit den shRNAmirs shSASH-A, shSASH-C oder shPLAGL-B transduziert wurden, wiesen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen eine verstärkte Formazanbildung auf. Je nach verwendetem Zellklon waren die Wachstumseigenschaften nach Transduktion mit shRNAmir shSASH-B bzw. shPLAGL-A unterschiedlich (Abb. 21).

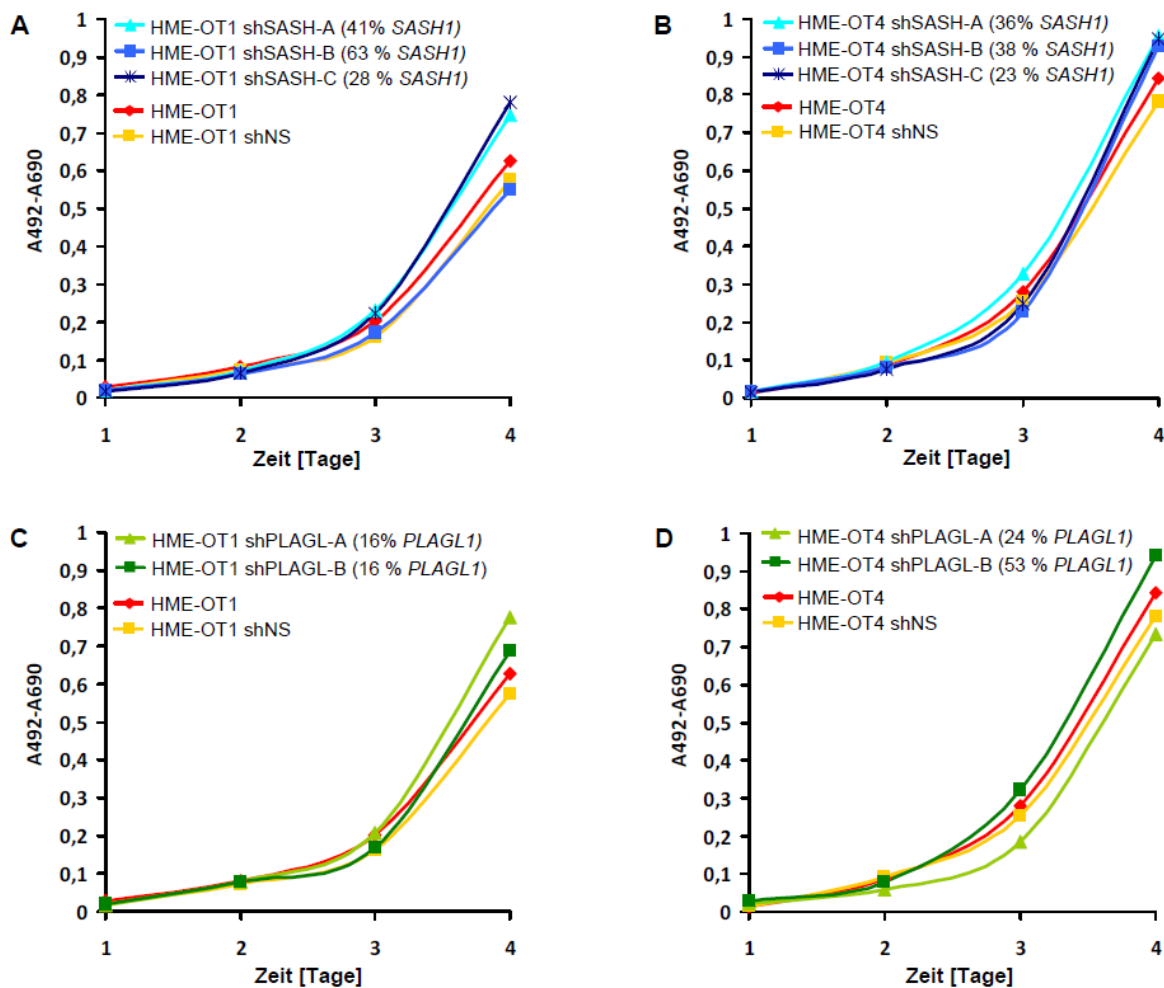


Abb. 21: Wachstumskurven der stabil transduzierten Zellklone HME-OT1 und HME-OT4

Aufgetragen ist jeweils die gemessene Absorptionsdifferenz A492-A690 gegen die Zeit ($n = 3$). Die Auswirkung der *SASH1*-Niederregulierung durch den lentiviralen Knockdown auf das Wachstum wurde in HME-OT1- (A) bzw. HME-OT4-Zellen (B) überprüft. Der Effekt einer *PLAGL1*-Niederregulierung durch den lentiviralen Knockdown wurde ebenfalls in HME-OT1 (C) bzw. HME-OT4-Zellen (D) untersucht. Um die Auswirkung der jeweiligen Niederregulierung einschätzen zu können, wurden auch nicht transduzierte Zellen (rote Kurven) sowie HME-OT1 bzw. HME-OT4-Zellen untersucht, welche mit non-silencing shRNAmir transduziert worden waren (orange Kurven). Werte in Klammern geben die verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zur jeweiligen non-silencing Kontrolle an.

Nimmt man ein exponentielles Wachstum der Zelllinien an, kann man mit Hilfe der Software „GraphPad Prism“ die Verdopplungszeiten t_v für die einzelnen Zellklone berechnen (Abb. 22). Auf diese Weise kann man auf das Wachstum der jeweiligen untersuchten Zellen schließen. Bei Normalisierung der jeweiligen t_v der Knockdown-Klone auf die t_v der non-silencing Kontrolle von HME-OT1 zeigte sich eine Verkürzung der Verdopplungszeiten um 7-8 % nach Transduktion mit SASH-A-shRNAmir ($p = 0,29$) und SASH-C-shRNAmir ($p = 0,05$) (Abb. 22A). Dies bedeutet, dass diese Zellen ein verstärktes Wachstum im Vergleich zu der verwendeten

Kontrolle zeigen. Im Gegensatz dazu bewirkte die Transduktion von HME-OT1-Zellen mit SASH-B-shRNAmir eine Erhöhung der Verdopplungszeit um 16 %. Im Vergleich zu der non-silencing Kontrolle war die Verdopplungszeit nach Transduktion von HME-OT4 mit shSASH-A um 9 % ($p = 0,077$), mit shSASH-B um 12 % ($p = 0,0002$) und mit shSASH-C um 18 % ($p = 0,001$) vermindert (Abb. 22B).

Die Transduktion mit shRNAmir, welche gegen *PLAGL1* gerichtet war, bewirkte in HME-OT1 eine Verminderung der Verdopplungszeit um 17 % nach Transduktion mit shPLAGL-A ($p = 0,006$) und 15 % nach Transduktion mit shPLAGL-B ($p = 0,03$) im Vergleich zu Zellen, welche mit NS-shRNAmir transduziert wurden. In HME-OT4 dagegen wurde nur eine Erhöhung um 8 % (shPLAGL-A) bzw. leichte Verminderung um 1 % (shPLAGL-B) gemessen.

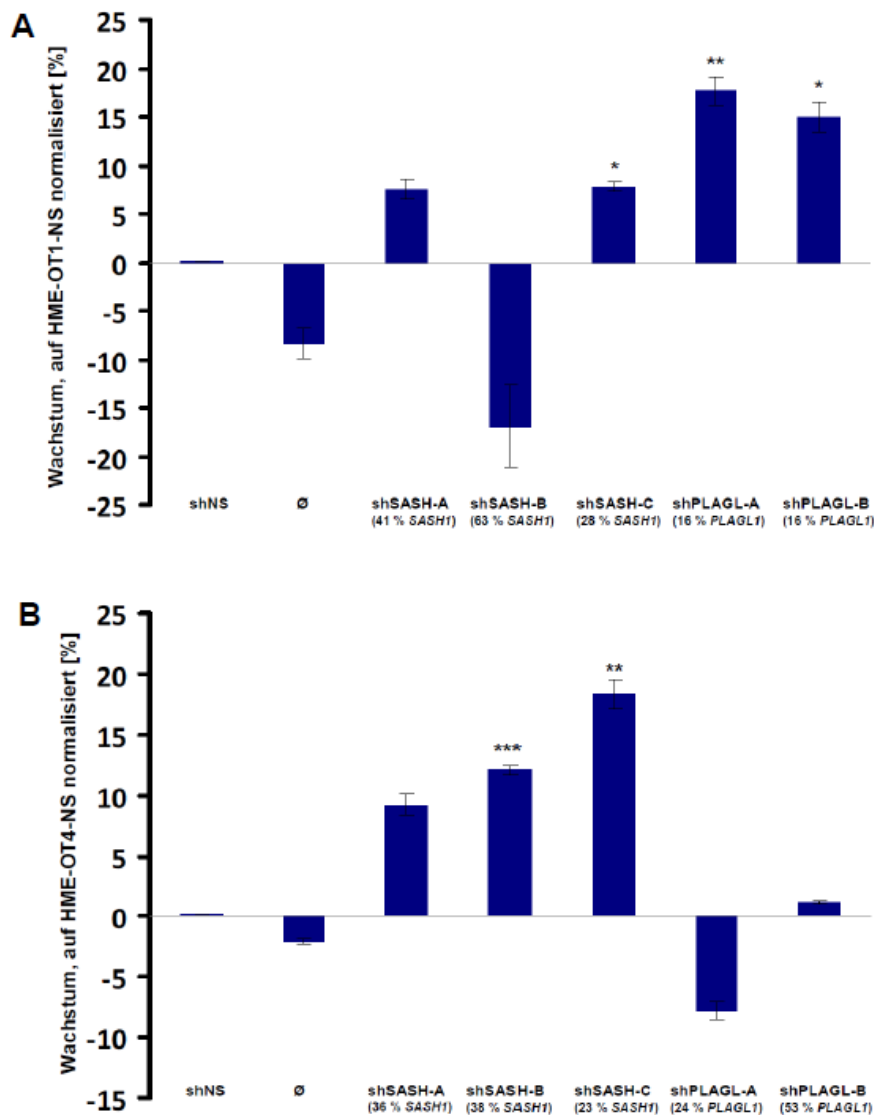


Abb. 22: Vergleich des Wachstums von HME-OT1- und HME-OT4-Zellen nach Transduktion mit shRNAmir gegen *SASH1* bzw. *PLAGL1*

Dargestellt ist der Mittelwert der Veränderung des Wachstums in Prozent von vier biologischen Replikaten nach lentiviraler Transduktion von HME-OT1 (A) bzw. HME-OT4 (B) sowie die jeweiligen Standardabweichungen. Die verwendeten shRNAmir binden spezifisch *SASH1* (shSASH-A, shSASH-B bzw. shSASH-C) bzw. *PLAGL1* (shPLAGL-A bzw. shPLAGL-B). Als Kontrollen dienen Zellen, welche nicht (Ø) oder mit non-silencing-(NS)-shRNAmir transduziert wurden. Werte in Klammern zeigen die jeweilige verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zur non-silencing Kontrolle. Zur Berechnung des Wachstums wurde mit Hilfe von „Graphpad Prism“ die Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie aus den im XTT-Versuch gemessenen Absorptionsdifferenzen (Abb. 21) berechnet und auf Zellen normalisiert, welche mit NS-shRNAmir transduziert wurden. Sternchen markieren die gemessenen Unterschiede (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; zweiseitiger unabhängiger, Student-t-Test).

Beim XTT-Assay wird angenommen, dass dieser Versuch die Zellzahl indirekt bestimmt. Allerdings könnte eine vermehrte Formazanbildung auch aufgrund einer verstärkten metabolischen Aktivität der jeweiligen Klone begründet sein. Daher musste der vermutete Proliferationsunterschied noch bestätigt werden. Eine

Möglichkeit dafür ist die Zellzyklusanalyse durch eine Propidiumiodidfärbung fixierter Zellen und einer anschließenden Messung am Durchflusszytometer. Propidiumiodid (PI) interkaliert zufällig und dosisabhängig in DNA, so dass durch eine Messung der Propidiumiodidfluoreszenzintensität im Durchflusszytometer der Anteil an Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase bestimmt werden kann. Durch die Bestimmung des Anteils der Zellen in der S-Phase kann der Anteil an proliferierenden Zellen bestimmt werden.

Bei der Zellzyklusanalyse ist es von entscheidender Bedeutung, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Zellfixierung in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Üblicherweise werden die zu analysierenden Zellen am Vortag der Zellfixierung ausgesät. Allerdings haben die im Zuge dieser Arbeit generierten Zellklone eine längere Adaptationsphase als andere Zelllinien. Dies bedeutet, dass die Zellen einen Tag nach Aussaat der Zellen nicht proliferieren, so dass sich das erhaltene Propidiumiodid-Profil aus den Profilen von Zellen in G1- bzw. G2/M-Phase zusammensetzt (Abb. 23A). Somit wurden die Zellen zwei Tage vor der Zellfixierung ausgesät. Dabei war zu beachten, dass die Zellen am Tag der Fixierung eine Konfluenz von etwa 50-80 % aufwiesen (Abb. 23C), da bei einer zu niedrigen oder zu hohen Konfluenz der Anteil an proliferierenden Zellen zu gering war (Abb. 23B).

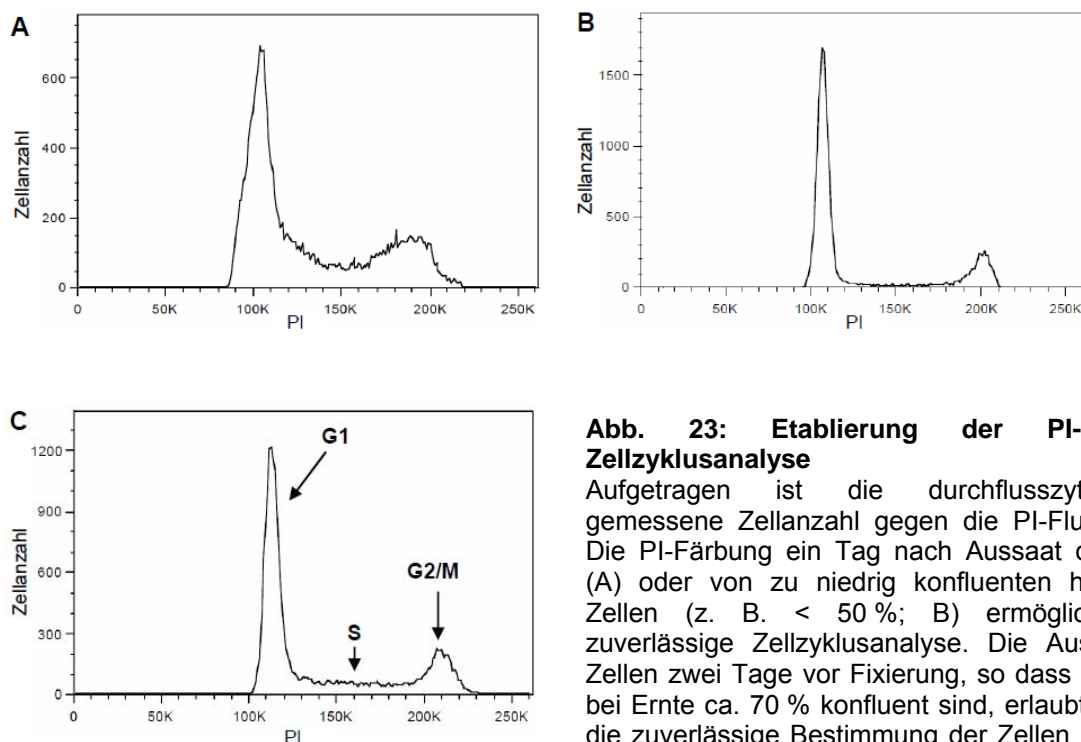


Abb. 23: Etablierung der PI-basierten Zellzyklusanalyse

Aufgetragen ist die durchflusszytometrisch gemessene Zellanzahl gegen die PI-Fluoreszenz. Die PI-Färbung ein Tag nach Aussaat der Zellen (A) oder von zu niedrig konfluenten hHME-tert-Zellen (z. B. < 50 %; B) ermöglicht keine zuverlässige Zellzyklusanalyse. Die Aussaat der Zellen zwei Tage vor Fixierung, so dass die Zellen bei Ernte ca. 70 % konfluent sind, erlaubt dagegen die zuverlässige Bestimmung der Zellen in G1-, S- bzw. G2/M-Phase (C).

Tatsächlich zeigte sich, dass das verstärkte Wachstum der mit *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-shRNAmir transduzierten Zellklone auf eine vermehrte Proliferation zurückzuführen war. Eine Niederregulierung von *SASH1* als auch *PLAGL1* durch die einzelnen shRNAmir-Sequenzen führte bei allen HME-OT1-Zellklonen zu einer Erhöhung der Proliferation im Vergleich zur non-silencing Kontrolle um mindestens 20 % (shSASH-A: $p = 0,04$; shSASH-B: $p = 0,001$; shSASH-C: $p = 0,001$; shPLAGL-A: $p = 0,0002$; shPLAGL-B: $p = 0,006$; Abb. 24).

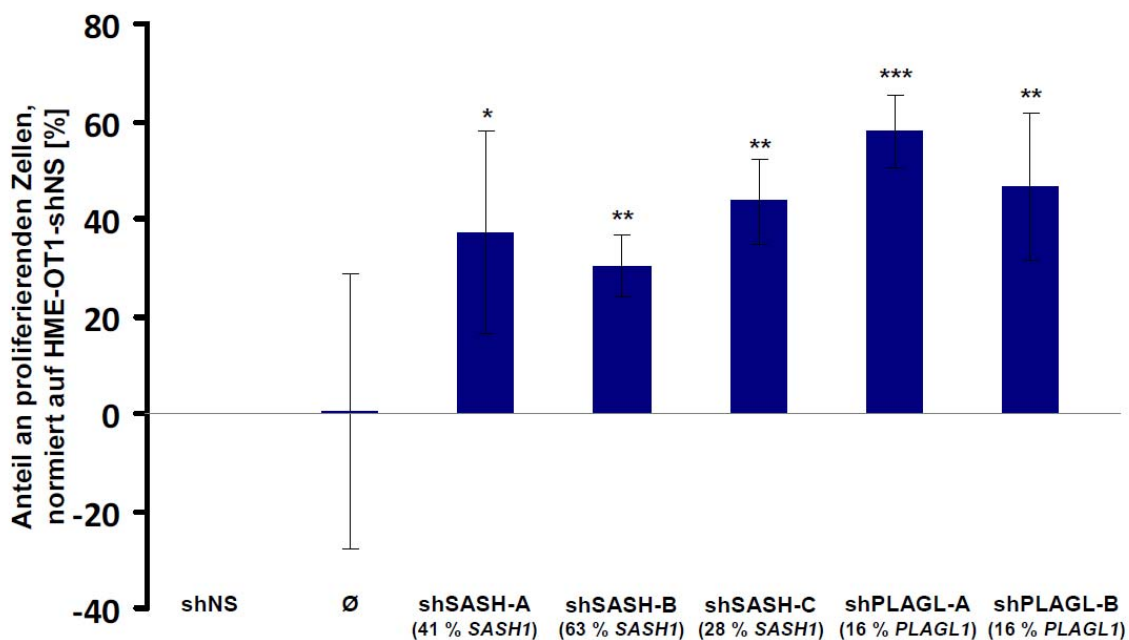


Abb. 24: Veränderung des Anteil an proliferierenden HME-OT1-Zellen nach lentiviraler Transduktion

Abgebildet ist der Mittelwert ($n = 3$) des Anteil an proliferierenden HME-OT1-Zellen, welche nicht (Ø), mit shRNAmir shSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A, shPLAGL-B oder mit non-silencing (NS) shRNAmir transduziert wurden nach Normalisierung auf HME-OT1-shNS-Zellen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Replikate. Werte in Klammern zeigen die jeweilige verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zur non-silencing Kontrolle. Die Ermittlung des Anteils an proliferierenden Zellen erfolgte durch durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen in S-Phase nach Propidiumiodidfärbung. Die Unterschiede sind durch Sternchen markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ermittelt durch unabhängigen, zweiseitigen Student-t-Test).

Zellen, in denen *SASH1* bzw. *PLAGL1* niederreguliert ist, proliferieren offensichtlich vermehrt. Auch in HME-OT4 befanden sich je nach Verwendung von shRNAmir shSASH-A bzw. shSASH-C mehr Zellen in der S-Phase als in der non-silencing-Kontrolle (Abb. 25). Die Zellzyklusanalyse der *PLAGL1*-shRNAmir Klone bestätigte ebenfalls die XTT-Versuche der transduzierten HME-OT4-Zellen. Während bei Verwendung von shRNAmir shPLAGL-A übereinstimmend mit den XTT-Ergebnissen 4 % weniger Zellen als die Kontrollzellen in der S-Phase befanden, befanden sich bei

Niederregulierung von *PLAGL1* mit shRNAmir shPLAGL-B 9 % mehr Zellen in der S-Phase. Der Unterschied im Anteil an proliferierenden HME-OT4-Zellen nach Transduktion mit shSASH-C ($p = 0,0004$) bzw. shPLAGL-B ($p = 0,04$) war besonders deutlich.

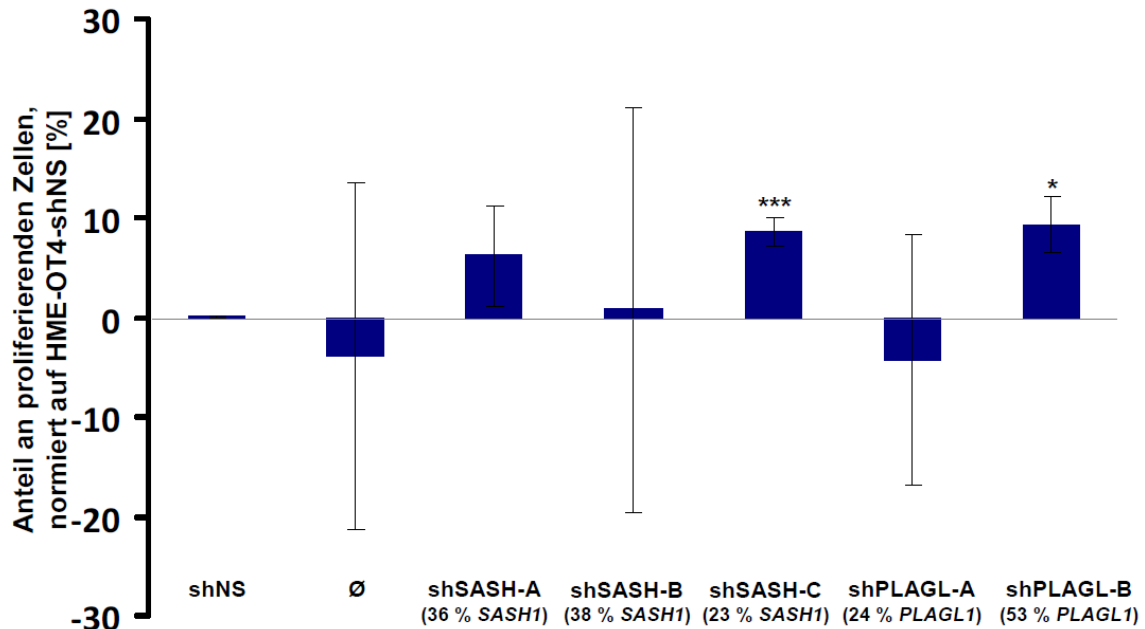


Abb. 25: Veränderung des Anteils an proliferierenden HME-OT4-Zellen nach lentiviraler Transduktion

Abgebildet ist der Mittelwert ($n = 3$) des Anteil an proliferierenden HME-OT4-Zellen, welche nicht (Ø), mit shRNAmir shSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A, shPLAGL-B oder mit non-silencing (NS)-shRNAmir transduziert wurden nach Normalisierung auf den Anteil an proliferierenden HME-OT4-shNS-Zellen. Werte in Klammern zeigen die jeweilige verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zur non-silencing Kontrolle. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Replikate. Die Bestimmung des Anteils an proliferierenden Zellen erfolgte durch durchflusszytometrische Ermittlung der Zellen in S-Phase nach Propidiumiodidfärbung. Die Unterschiede wurden durch einen unabhängigen, zweiseitigen Student t-Test überprüft und markiert (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Um den Effekt der Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* auf die Proliferation zu validieren, wurde des Weiteren das Wachstum von Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation im XTT-Assay verglichen. Vergleicht man die Absorptionsdifferenzen der Zelllinien ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation mit denen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation, welche mindestens eine 70-prozentige Niederregulierung von *SASH1* aufweisen (Abb. 26), ist ab dem Tag 4 der Unterschied im Wachstumsverhalten besonders deutlich (unabhängiger, ungepaarter Student t-Test: $p = 0,03$). Der Zellklon HME-MT5 (lediglich 60 % *SASH1*-Niederregulierung im Vergleich zu HME-OT-Klonen) weist dagegen keinen verstärkten XTT-Umsatz im Vergleich zu den HME-OT-Zellklonen auf.

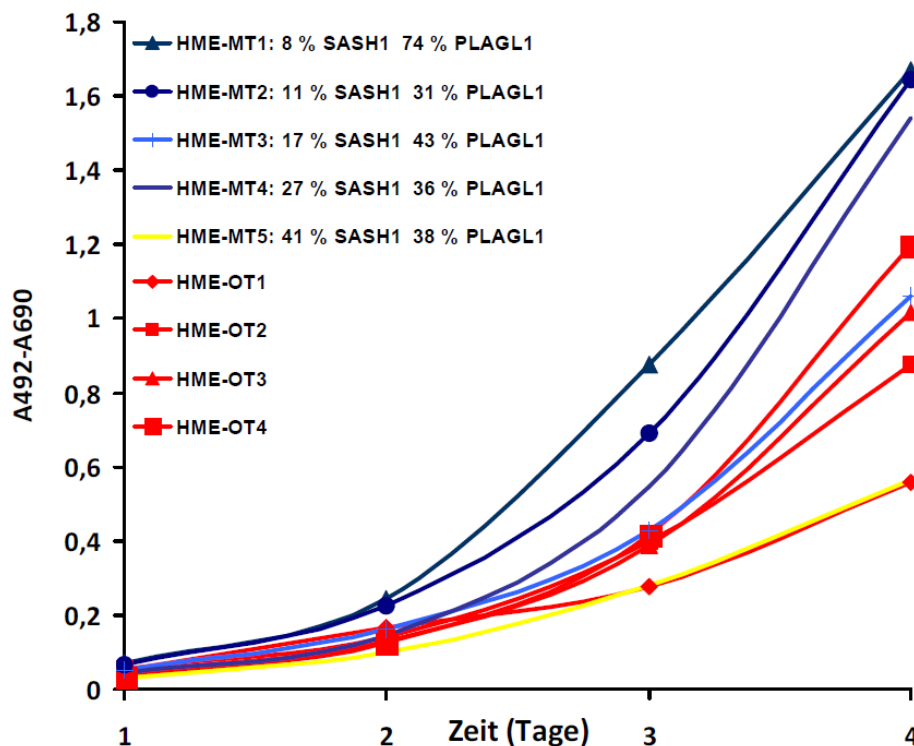


Abb. 26: Wachstumskurven von Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation (rot) bzw. mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (blau bzw. gelb)

Aufgetragen ist der Mittelwert ($n = 2$) der Absorptionsdifferenz zwischen 492 nm und 690 nm (mittels eines ELISA-Messgeräts vier Stunden nach Zugabe des XTT-Reagenz gemessen) gegen die Zeit nach Aussaat von 1000 Zellen zu Beginn des Versuches. Zellklone mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation wiesen höchstens eine 27-prozentige Expression des Gens *SASH1* (HME-MT 1-4, blaue Kurven) bzw. eine 41-prozentige *SASH1*-Expression (HME-MT5; gelbe Kurve) und eine 74-prozentige *PLAGL1*-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Zellklonen ohne einer *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-OT1-4; rote Kurven) auf.

Zur Validierung dieser XTT-Ergebnisse wurde ebenfalls die PI-basierte Zellzyklusanalyse durchgeführt. Es wurden Zellklone mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation untersucht, welche die stärkste XTT-Umsetzung im XTT-Assay zeigten (HME-MT1 und HME-MT2; Abb. 26), sowie die Parentalzelllinie hHME-tert. Diese Proben wurden mit dem Zellklon ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation mit der niedrigsten Formazanbildung (HME-OT1; Abb. 26) verglichen und die prozentuale Veränderung des Anteils an proliferierenden Zellen berechnet. Es wurden also jene Zellklone zur Validierung ausgewählt, welche im XTT-Versuch den größten Unterschied zeigten. Dabei zeigte sich, dass der mittlere Anteil an proliferierenden Zellen in HME-MT1 um 21 % ($p < 0,0001$), in HME-MT2 um 24 % ($p = 0,02$) und in der Parentalzelllinie hHME-tert um 24 % ($p = 0,04$) im Vergleich zu den HME-OT1-Zellen erhöht war (Abb. 27).

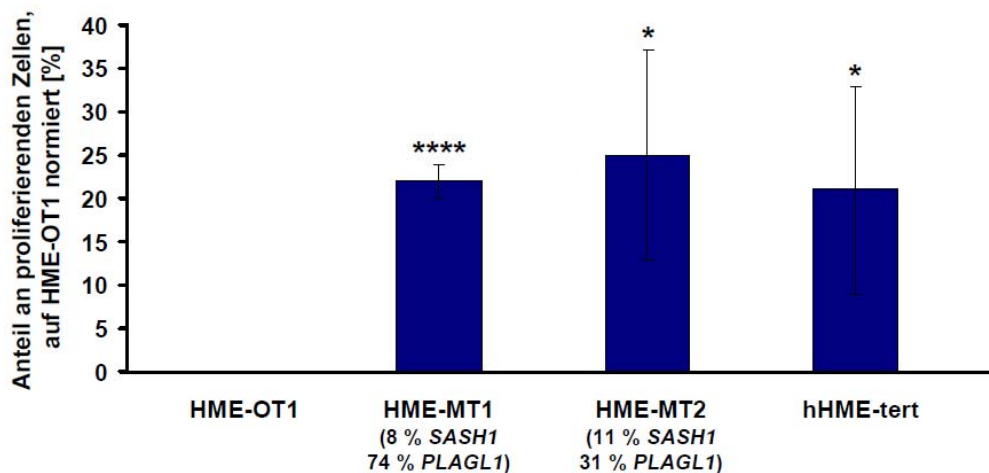


Abb. 27: Erhöhter Anteil an proliferierenden Zellen in Zellklonen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation im Vergleich zu Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-OT1)

Dargestellt ist die prozentuale Erhöhung an proliferierenden Zellen der Zellklone mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-MT1 bzw. HME-MT2) und der Parentalzelllinie hHME-tert nach Normalisierung auf den Anteil an proliferierenden HME-OT1-Zellen ($n = 3$) sowie die jeweilige Standardabweichung. Werte in Klammern geben die verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zu Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation an. Der Anteil an proliferierenden Zellen wurde durchflusszytometrisch anhand der S-Phase mittels PI-basierter Zellzyklusanalyse bestimmt. Die Unterschiede wurden markiert (zweiseitiger, unabhängiger Student-t-Test; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$)

Somit repräsentieren die durch den XTT-Assay generierten Kurven tatsächlich ein verstärktes Wachstum von HME-MT-Zellen aufgrund einer erhöhten Anzahl an proliferierenden Zellen. Ein zusätzlicher wachstumsfördernder Effekt durch verminderte Apoptose konnte nicht gemessen werden, da einerseits keine Zellen mit niedrigerem DNA-Gehalt als G1-Zellen (sogenannter „Sub-G1 Gipfel“) in der Zellzyklusanalyse detektiert werden konnte und andererseits sich auch durch eine DAPI-Färbung unfixierter Zellen keine apoptotischen Zellen nachweisen ließen.

Die zelluläre Lokalisation von *SASH1* in Mammakarzinomzelllinien ist abhängig vom Zellzyklus

Die XTT- und Zellzyklusanalysen der Zellklone mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation sowie der stabil transduzierten Zellklone zeigten eindeutig einen Zusammenhang zwischen einer Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* und einer Induktion der Proliferation. Da kein spezifischer Antikörper zur Detektion der

PLAGL1-Expression zur Verfügung stand, konnte lediglich am Beispiel von SASH1 überprüft werden, ob die Lokalisation des SASH1-Proteins abhängig vom Proliferationsstatus einer Zelle ist. Zu diesem Zweck wurde die Detektion des SASH1-Proteins durch Immunfluoreszenzfärbung von Zytospins von Mammakarzinomzelllinien etabliert. Die Spezifität des eingesetzten Primärantikörpers für die Immunfluoreszenzfärbung wurde durch Isotypkontroll-Antikörper bestimmt (Abb. 28A). Die Visualisierung erfolgte durch einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper, dessen Spezifität ebenfalls bestätigt werden konnte (Abb. 28B).

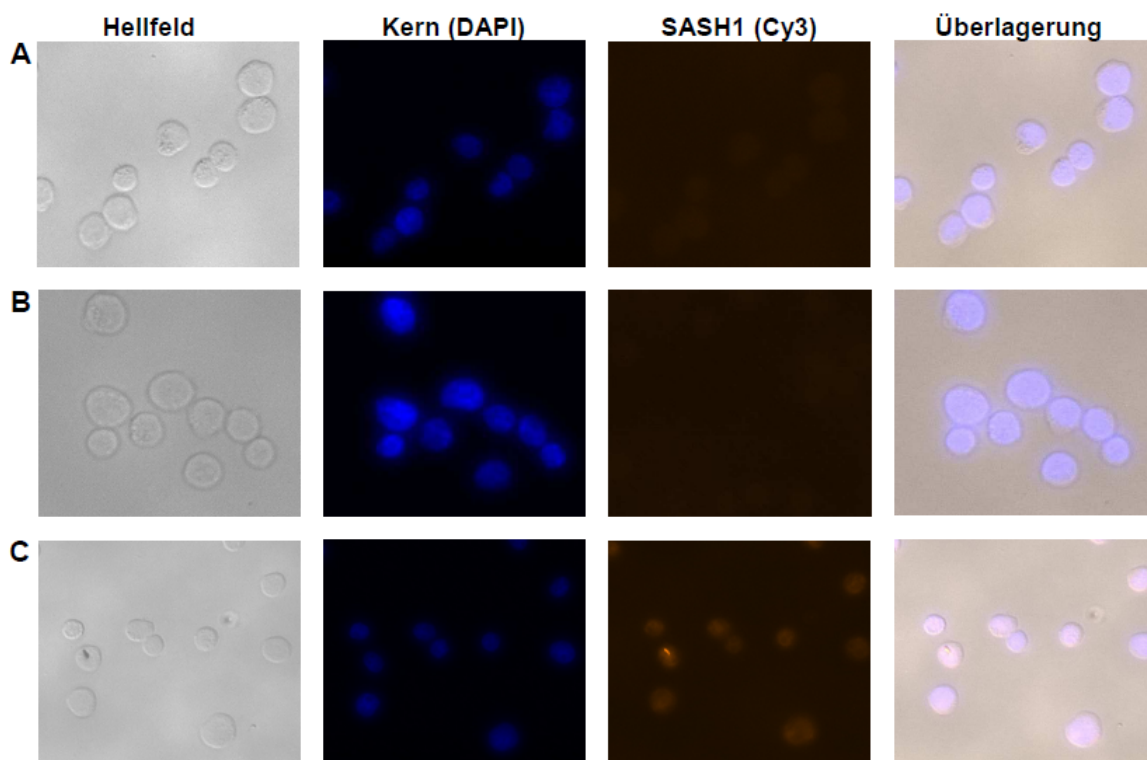


Abb. 28: Etablierung der SASH1-Immunfluoreszenzfärbung

Zur Überprüfung der Spezifität der SASH1-Färbung wurde entweder anstatt eines Primärantikörpers gegen SASH1 eine IgG-Isotypkontrolle eingesetzt (A) oder lediglich der Cy3-markierte Sekundärantikörper (B) verwendet. Aufgrund der fehlenden Cy3-Signale in diesen Kontrollfärbungen kann ausgeschlossen werden, dass die SASH1-Färbung (C) durch unspezifische Primär- oder Sekundärantikörperreaktionen zustande kommt.

Nach Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung wurde die SASH1-Expression in den Mammakarzinomzelllinien CAMA, T-47D, MCF7 und SK-BR-3 untersucht. Es fiel auf, dass das SASH1-Protein oft ausschließlich im Kern detektiert wurde (Abb. 29). Zudem wurde eine sich teilende T-47D-Zelle detektiert, in der SASH1 lediglich im Zytoplasma lokalisiert war (Abb. 29). Um zu überprüfen, ob die SASH1-Lokalisation

abhängig vom Zellzyklus ist, wurden SK-BR-3 Zellen verglichen, welche sich im Anteil der proliferierenden Zellen unterschieden. Zu diesem Zweck wurde ein Zellzyklusarrest induziert, indem SK-BR-3-Zellen für zwei Tage in Medium ohne fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert wurden. Von der Hälfte der Zellen wurden Zytospins angefertigt und die restlichen Zellen durch einen Transfer in Vollmedium (mit 10 % FKS) zur Proliferation angeregt. Nach 24 h wurden von diesen Zellen ebenfalls Zytospins angefertigt. Um zu überprüfen, ob sich der Anteil der proliferierenden Zellen je nach Vorhandensein oder Abwesenheit des Serums tatsächlich unterschied, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Nur 38 % der Zellen, denen für zwei Tage das Serum im Medium entzogen wurden, waren Ki67-positiv. Dagegen waren 63 % der Zellen, welche nach zwei Tagen in serumhaltiges Medium überführt wurden, Ki67-positiv. Somit unterschieden sich die beiden Kulturen in der Anzahl der proliferierenden Zellen stark ($p < 0,0001$). Für die beiden Zellpopulationen, welche sich in der Anzahl der proliferierenden Zellen unterschieden, wurde als nächstes die Anzahl der Zellen mit strikt nukleärer SASH1-Lokalisation ermittelt. Während nur 47 % der SK-BR-3-Zellen, welche ohne Serum kultiviert worden waren, eine ausschließlich nukleäre SASH1-Lokalisation aufwiesen, wiesen 69 % der vermehrt proliferierenden Zellkultur eine strikt nukleäre Lokalisation auf ($p = 0,0008$).

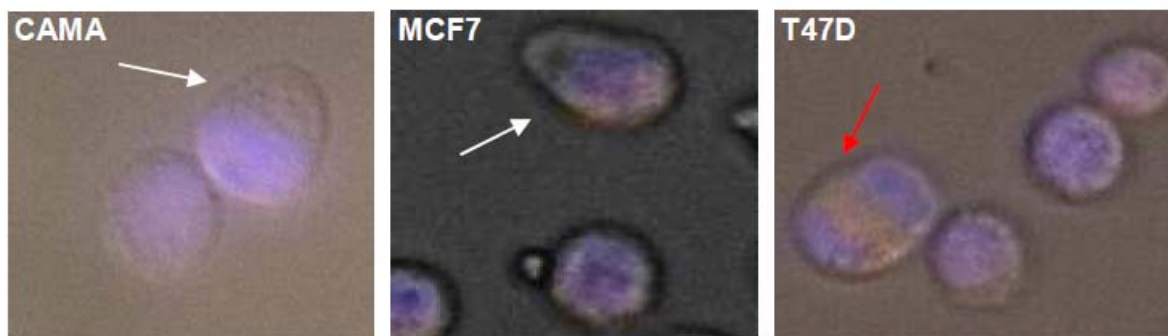


Abb. 29: Lokalisation von SASH1 in Mammakarzinomzelllinien

Dargestellt ist jeweils die Überlagerung von Hellfeld, Kern- (DAPI; blau) und SASH1-Färbung (Cy3; orange) der Mammakarzinomzellen CAMA, MCF7 und T-47D. Weiße Pfeile markieren Zellen, in denen SASH1 ausschließlich im Kern lokalisiert ist. Der rote Pfeil markiert eine T-47D-Zelle, welche sich gerade teilt.

Zellen mit einer verminderten Expression von SASH1 bzw. PLAGL1 stimulieren parakrin die Proliferation in Zellen ohne Niederregulierung von SASH1/PLAGL1

Ein erster Hinweis auf eine parakrine Wechselwirkung zwischen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation wurde durch die Klonierungsexperimente erhalten. Wie zuvor erwähnt, weisen in der Parentalzelllinie hHME-tert nur ca. 40 % der Zellen eine *SASH1/PLAGL1*-Translokation auf. Folglich wäre zu erwarten gewesen, dass nach dem Klonierungsexperiment 40 % der generierten Zellklone eine *SASH1/PLAGL1*-Translokation aufweisen würden. Stattdessen enthielten aber 30 der 37 neu generierten Zellklone (81 %) eine *SASH1/PLAGL1*-Translokation. Dieser Unterschied ($p = 0,003$) ließ vermuten, dass Zellklone mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation die Proliferation von Zellen ohne diese Translokation fördern. Aufgrund der großen Divergenz zwischen der Anzahl der Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation in der Parentalzelllinie und der Anzahl an generierten HME-MT-Klonen, stellte sich die Frage, ob Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation unter Umständen einen Wachstumsfaktor sezernieren, welche Zellen ohne diese Translokation für ihr Wachstum benötigen. Um dies zu überprüfen, wurde das Proliferationsverhalten von HME-OT1 Zellen nach Kultivierung in konditioniertem Medium bestimmt. HME-OT1 wurde für dieses Experiment verwendet, da dieser Zellklon das langsamste Wachstum im XTT-Assay zeigte (Abb. 26) und somit etwaige Unterschiede besser ersichtlich sind. Für die Konditionierung des Mediums wurden Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation, welche laut XTT-Assay das stärkste Wachstum zeigen (HME-MT1, HME-MT2) sowie die Parentalzelllinie jeweils für drei Tage kultiviert. Der Anteil der proliferierenden Zellen wurde durch eine PI-basierte Zellzyklusanalyse bestimmt. Zur Berechnung des differentiellen Anteils an proliferierenden Zellen wurde auf den Anteil der proliferierenden Zellen, welche mit konditioniertem Medium der zu testenden Zellen (HME-OT1) kultiviert wurden, normalisiert. Diese Zellzyklusanalysen ergaben, dass durch die Kultivierung von HME-OT1-Zellen in konditioniertem Medium (KM) von HME-MT2 Zellen ca. 19 % mehr Zellen proliferierten (Spannweite der erhöhten Anzahl an proliferierenden Zellen: 17-36 %, $p = 0,057$) (Abb. 30). Nach Kultivierung von HME-OT1-Zellen in KM von HME-MT1 Zellen teilten sich ca. 54 % mehr Zellen (Spannweite der erhöhten Anzahl an proliferierenden Zellen: 23-86 %; $p = 0,096$) (Abb. 30).

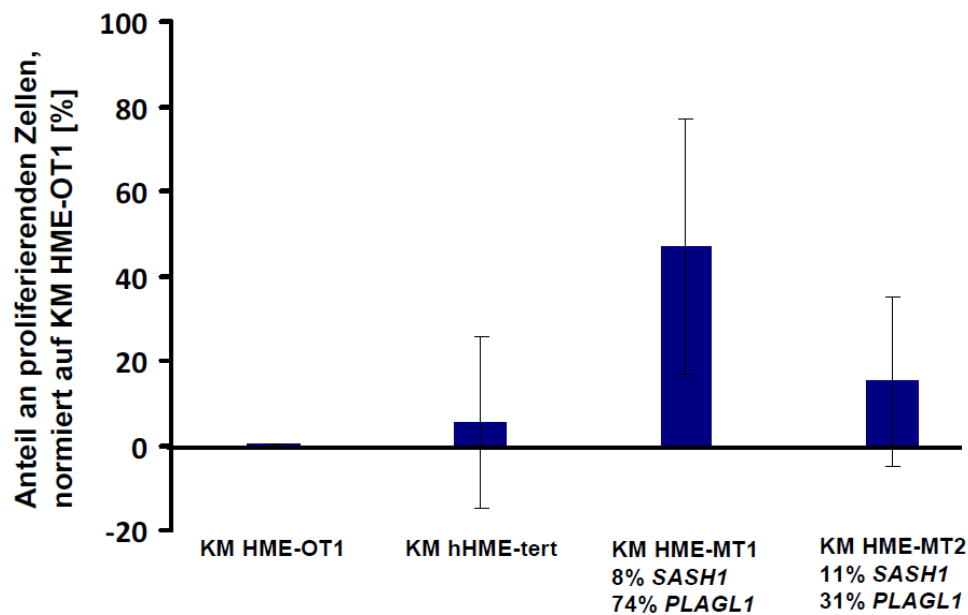


Abb. 30: Erhöhte Proliferation von HME-OT1-Zellen nach Kultivierung in konditioniertem Medium (KM) von Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation

Aufgetragen ist die mittlere Veränderung des Zellanteils von HME-OT1-Zellen, welche sich in S-Phase befinden, welche mit konditioniertem Medium (KM) von der Parentalzelllinie hHME-tert oder von zwei Zellklonen mit der *SASH1/PLAGL1*-Translokation kultiviert wurden ($n = 3$) sowie die jeweilige Standardabweichung. Die HME-MT-Klone besitzen jeweils verminderte *SASH1*- (8 % bzw. 11 %) bzw. *PLAGL1* - Expression (74 % und 31 %) bezogen auf Zellklone ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation. Zur Berechnung der Veränderung des Anteils an Zellen in S-Phase wurde auf HME-OT1-Zellen normalisiert, welche mit konditioniertem Medium von HME-OT1-Zellen kultiviert wurden.

Auch wenn Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation im Vergleich zu Zellen ohne diese Translokation eine Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* aufweisen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten parakrinen Effekte durch andere Gene als *SASH1* bzw. *PLAGL1* verursacht werden. Daher wurde ebenfalls der Einfluss des konditionierten Mediums der einzelnen stabil transduzierten Zellen auf HME-OT1-Zellen mittels PI-basierter Zellzyklusanalyse bestimmt. Es wurde eine geringfügige Erhöhung des Anteils an proliferierenden Zellen nach Kultivierung der HME-OT1-Zellen mit konditioniertem Medium von HME-OT1-sh*SASH1*-C-, HME-OT1-sh*PLAGL1*-A- und HME-OT1-sh*PLAGL1*-B-Zellen gemessen (Abb. 31).

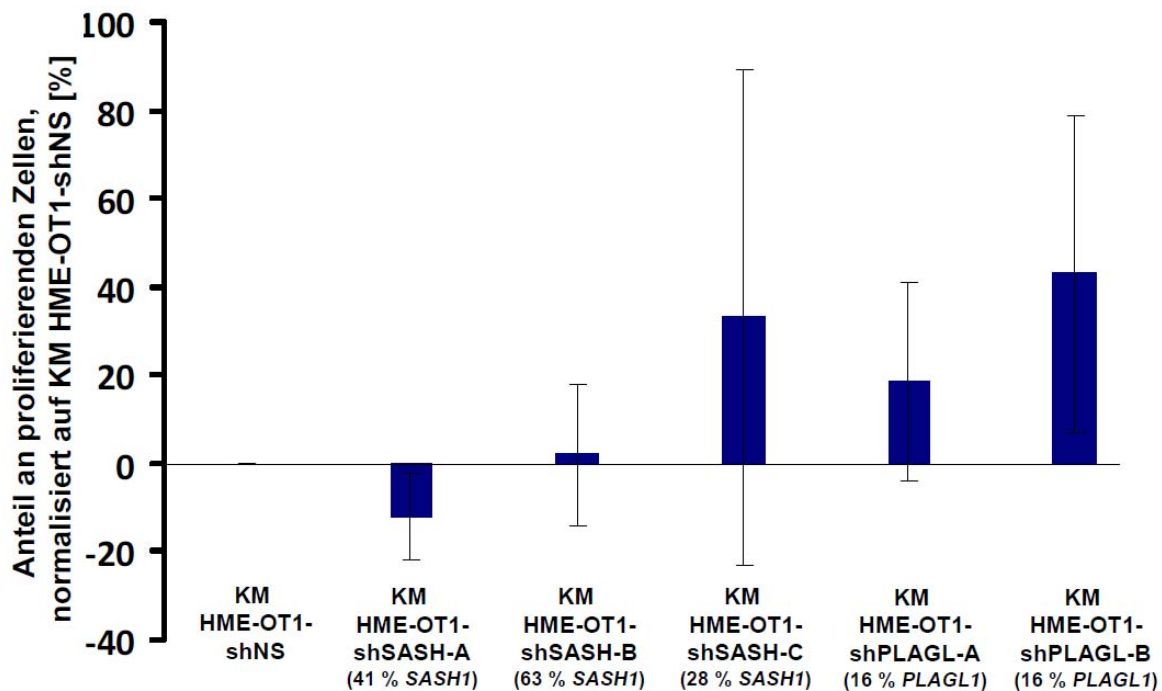


Abb. 31: Einfluss des konditionierten Mediums der einzelnen Knockdown-Zellen auf die Proliferation von HME-OT1-Zellen

Abgebildet ist der Mittelwert ($n = 3$) des Anteil an proliferierenden HME-OT1-Zellen, welche mit dem konditionierten Medium (KM) von HME-OT1-Zellen kultiviert wurden, die mit shNS, shSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A oder shPLAGL-B transduziert wurden nach Normalisierung auf HME-OT1, die mit KM von HME-OT1-shNS-Zellen kultiviert wurden. Werte in Klammern geben die verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*- Expression im Vergleich zur non-silencing Kontrolle an. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Replikate. Die Ermittlung des Anteils an proliferierenden Zellen erfolgte durch durchflusszytometrische Bestimmung der Zellen in S-Phase durch eine Zellzyklusanalyse nach Propidiumiodidfärbung.

SASH1 bzw. PLAGL1 beeinflussen nur geringfügig das Migrations- bzw. Invasionsverhalten von Mammazellen

Die Deletion von *SASH1/PLAGL1* wurde ursprünglich in DTCs detektiert. Für eine erfolgreiche Disseminierung müssen DTCs die Fähigkeit zur Migration und Invasion besitzen. Somit sollte zunächst der Einfluss der lentiviralen Niederregulierung von *SASH1/PLAGL1* auf das Transmigrationsverhalten der transduzierten Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Analyse der Transmigration im Real Time Cell Analyzer (RTCA) mit Hilfe des xCELLigence-Systems von Roche etabliert. Zentraler Bestandteil dieses Systems sind Goldelektroden, die als Sensoren im Boden von Mikroplatten-Kavitäten eingelassen sind und an die eine Wechselspannung angelegt ist. Erst nach erfolgter Transmigration berühren die zu

untersuchenden Zellen die Goldoberfläche, was zu einem Impedanzanstieg führt. Diese Änderung der Impedanz als Maß für die Zelldichte wird als sogenannter Zellindex angezeigt. In den durchgeführten Versuchen wurde der sogenannte Delta Zellindex berechnet, d. h. nach dem Einsetzen der RTCA-Platten in das Gerät wurden die Zellindex-Kurven auf den Wert 1 normalisiert.

Um einen möglichen Effekt im Transmigrationsverhalten der stabil transduzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen mit dem RTCA-System messen zu können, musste zunächst die Transmigration der Kontrollzellen induziert werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Effekt verschiedener Chemoattraktanden miteinander verglichen (Abb. 32). Als Chemoattraktanden sollten folgende Medien ausprobiert werden: Vollmedium (DMEM/F12 + 10 % FKS, 10 µg/mL Insulin, 0,5 µg/mL Hydrocortison und 2 ng/mL EGF), Vollmedium + 5 ng/mL bFGF, Vollmedium + 10 ng/mL bFGF und fibroblastenkonditioniertes Medium (FKM). Um im Falle einer Transmigrationsinduktion durch Vollmedium als Chemoattraktans den Einfluss der im Vollmedium enthaltenen Komponenten beurteilen zu können, wurde zusätzlich DMEM/F12, welches lediglich mit EGF, Hydrocortison bzw. 10 % fötalem Kälberserum supplementiert war, als Chemoattraktans eingesetzt.

Nur bei Verwendung von FKM war eine deutliche Transmigration der Zellen zu detektieren, was sich in dem schnellen Anstieg des Delta Zellindex zu Beginn des Versuchs und des deutlich erhöhten Delta Zellindex im Vergleich zur Hintergrundimpedanz (Einsatz nur von DMEM/F12) widerspiegelt (Abb. 32). Somit wurde für alle weiteren Versuche FKM als Chemoattraktans eingesetzt.

Als nächstes wurde die optimale Zellzahl pro Kavität bestimmt. Dazu wurden je 15 000, 20 000 und 30 000 Zellen von zwei Zellklonen pro Kavität in Duplikaten ausgesät. Der Einsatz von 30 000 Zellen lieferte dabei das beste Ergebnis, so dass für alle folgenden Migrationsversuche 30 000 Zellen pro Kavität ausgesät wurde (Abb. 33).

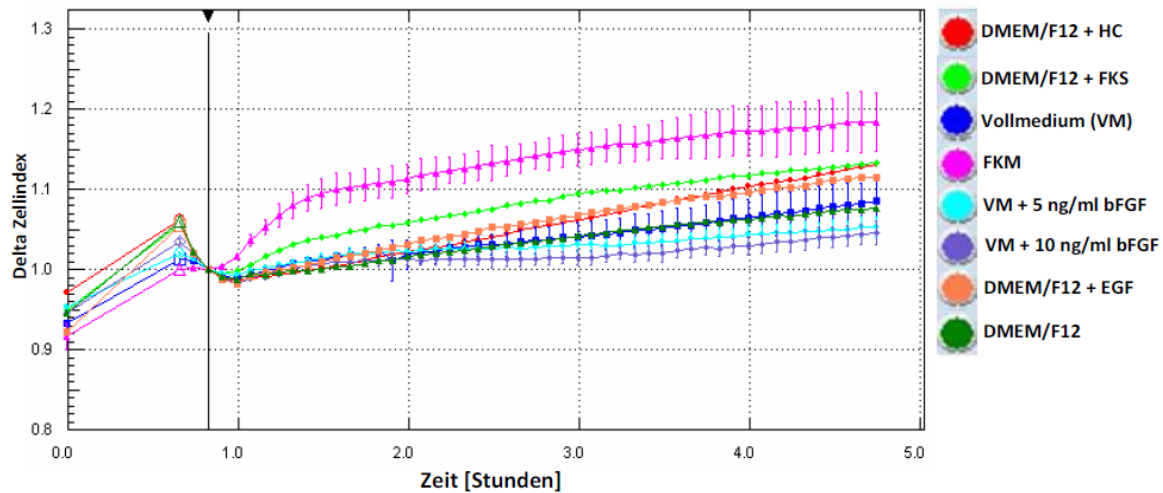


Abb. 32: Bestimmung des optimalen Chemoattraktans zur Untersuchung des Transmigrationsverhaltens von hHME-tert-Zellen

Aufgetragen ist der Delta Zellindex gegenüber der Zeit nach Durchführung eines Transmigrationsexperiments innerhalb des xCELLigence-Systems (Roche, Mannheim). Getestet wurde der Einfluss von Fibroblasten konditioniertem Medium (FKM), Vollmedium (VM) und Vollmedium mit bFGF nach Ausaat von 15 000 Zellen. Um den Einfluss der einzelnen im Vollmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Migration beurteilen zu können, wurde des Weiteren DMEM/F12 mit 0,5 µg/mL Hydrocortison (HC), 10 % fötalem Kälberserum (FKS) oder 2 ng/mL EGF als potenzielle Chemoattraktanden eingesetzt.

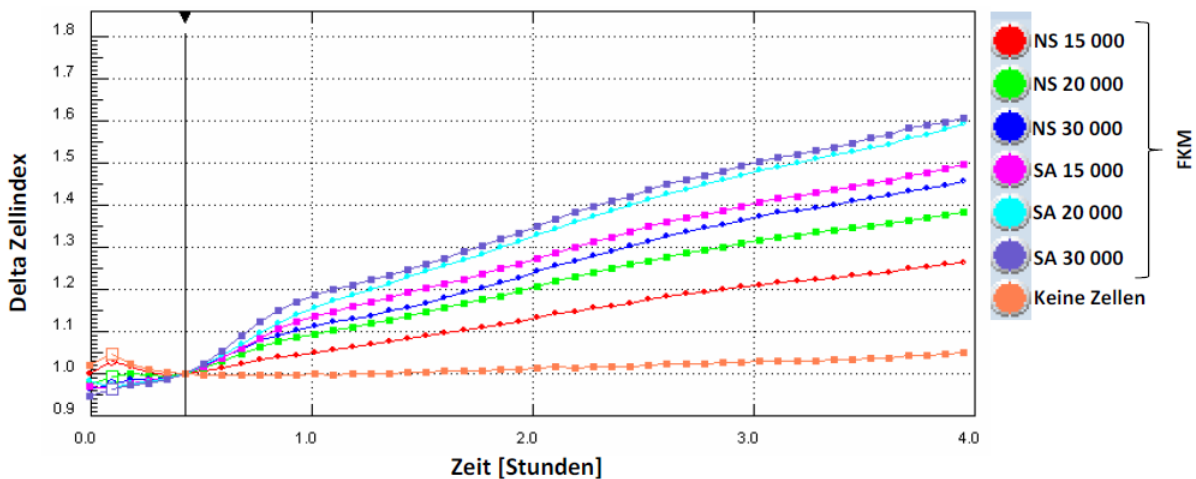


Abb. 33: Bestimmung der optimalen auszusäenden Zellzahl zur Untersuchung des Transmigrationsverhaltens von hHME-tert-Zellen

Aufgetragen ist der Delta Zellindex gegenüber der Zeit nach Durchführung eines Transmigrationsexperiments innerhalb des RTCA-Systems. Getestet wurden unterschiedliche Zellzahlen (15 000, 20 000 bzw. 30 000) von Kontrollzellen (NS) und Zellen, in denen mit Hilfe der SASH-A-shRNAir SASH1 niederreguliert worden war (SA), jeweils in Duplikaten. Zur Beurteilung der Hintergrundimpedanz diente das Fehlen von ausgesäten Zellen.

Da nicht unterschieden werden kann, ob ein gemessener Impedanzanstieg innerhalb eines Migrationsexperiments durch Zellteilung bereits migrierter Zellen zustande kommt oder durch die zunehmende Anzahl an Zellen, welche bereits transmigriert sind, wurde zum besseren Verständnis der Zellindexkurven ein Proliferationsversuch innerhalb des RTCA-Systems durchgeführt (Abb. 34). Da der durch Proliferation bedingte Impedanzanstieg frühestens nach fünf Stunden meist aber erst später einsetzt, muss der in den ersten vier Stunden gemessene Zellindexanstieg in den Migrationsversuchen lediglich durch Migration hervorgerufen werden.

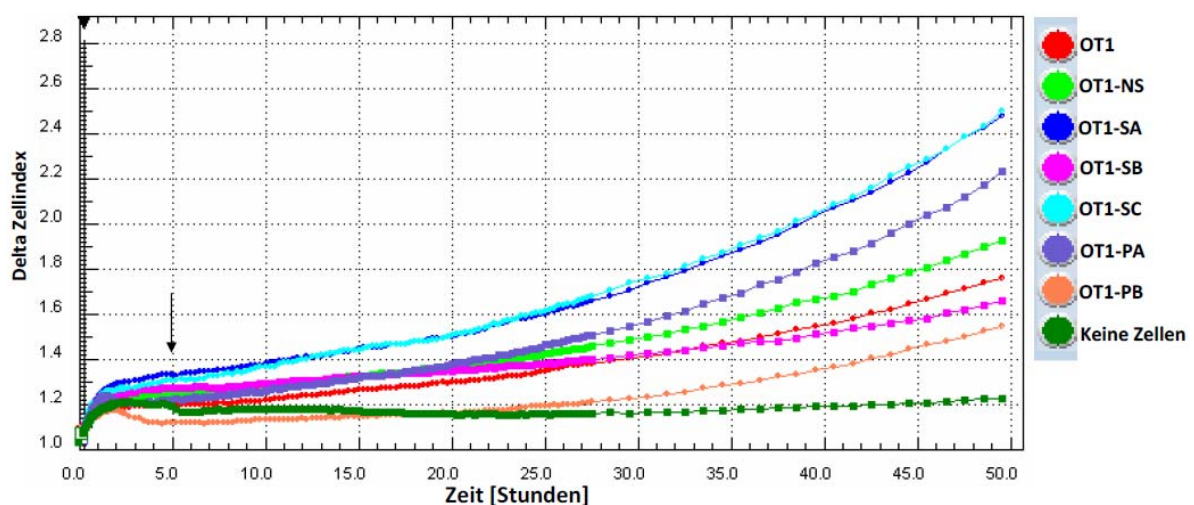


Abb. 34: Bestimmung des proliferationsbedingten Anstiegs des Delta Zellindexes

Aufgetragen ist der Delta Zellindex gegenüber der Zeit nach Durchführung eines Proliferationsexperiments innerhalb des RTCA-Systems. Getestet wurden die in dieser Arbeit zu charakterisierenden Zellen hHME-OT1 (OT1), welche mit den shRNAmirs shSASH-A (SA), shSASH-B (SB), shSASH-C (SC), shPLAGL-A (PA), shPLAGL-B (PB) oder non-silencing (NS)-shRNA stabil transduziert wurden. Der schwarze Pfeil markiert die frühesten Anstiege des Delta Zellindexes (OT1-SA und OT1-SC).

Nach der Etablierung der Transmigrationsversuche wurde das Transmigrationsverhalten der stabil transduzierten HME-OT1-Klone, in denen *SASH1* bzw. *PLAGL1* niederreguliert waren, im Vergleich zur non-silencing-Kontrolle in sieben biologischen Replikaten untersucht. Es konnte eine im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöhte Transmigration um ca. 10-20 % jener Zellen gemessen werden, welche mit den Lentiviren shSASH-A, shSASH-C und shPLAGL-A transduziert worden waren (Abb. 35). Am deutlichsten war dabei der Unterschied im Migrationsverhalten zu Kontrollzellen nach Transduktion der Zellen mit shPLAGL-A ($p = 0,04$).

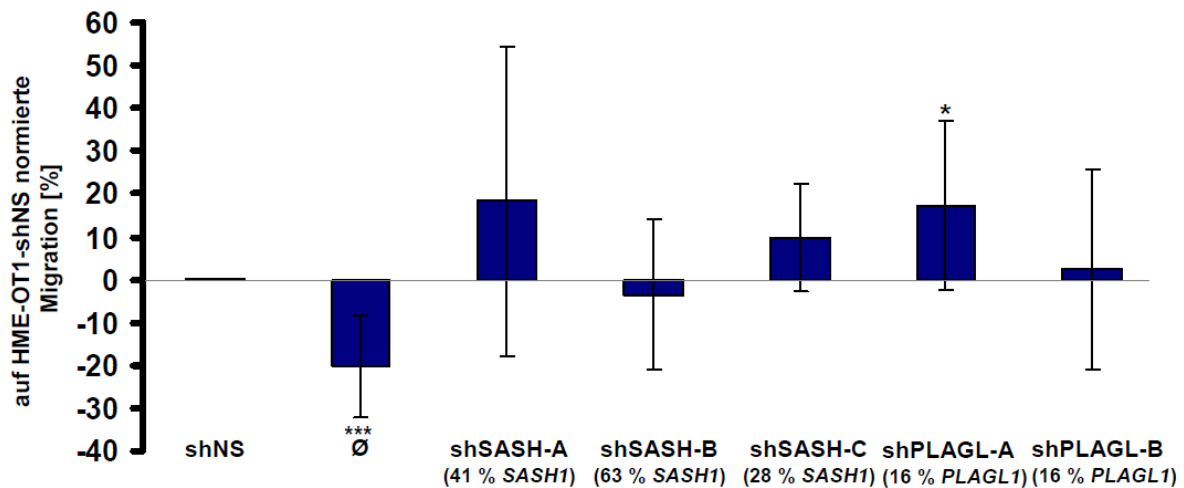


Abb. 35: Veränderung des Migrationsverhalten nach lentiviraler Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1*

Dargestellt ist der Mittelwert des veränderten Transmigrationsverhalten von sieben biologischen Replikaten verschiedener HME-OT1-Zellklone bezogen auf HME-OT1-Zellen, welche mit einem non-silencing (NS) Vektor stabil transduziert wurden. Werte in Klammern beziehen sich auf die verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zur non-silencing Kontrolle. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Replikate dar. Die Analyse der Transmigration erfolgte indirekt über eine Impedanzmessung durch das xCELLigence System. shSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A und shPLAGL-B beziehen sich auf die jeweilig verwendeten Lentiviren zur stabilen Transduktion von HME-OT1-Zellen, Ø bezeichnet nicht transduzierte Zellen. Unterschiede zwischen den Proben und der NS-Kontrolle wurden markiert (unabhängiger, zweiseitiger Student-t-Test; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

Aufgrund der geringfügig erhöhten Migration nach Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* sollte überprüft werden, ob durch die Niederregulierung dieser Gene auch das Invasionspotenzial der stabil transduzierten Zellen verändert wird. Um dies zu untersuchen, wurde der xCELLigence Versuch dahingehend verändert, dass vor Aussaat der jeweiligen Zellen die Kavitäten mit Matrigel beschichtet wurden. Matrigel ist eine gelöste Basalmembranvorbereitung, welche aus Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom-Zellen extrahiert wird. Matrigel repräsentiert daher die extrazelluläre Matrix, welche die Tumorzellen in einem Organismus umgibt. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen war die Erhöhung des Invasionsverhaltens im Vergleich zu den Kontrollzellen nur nach Niederregulierung von *PLAGL1* vorhanden (Abb. 36).

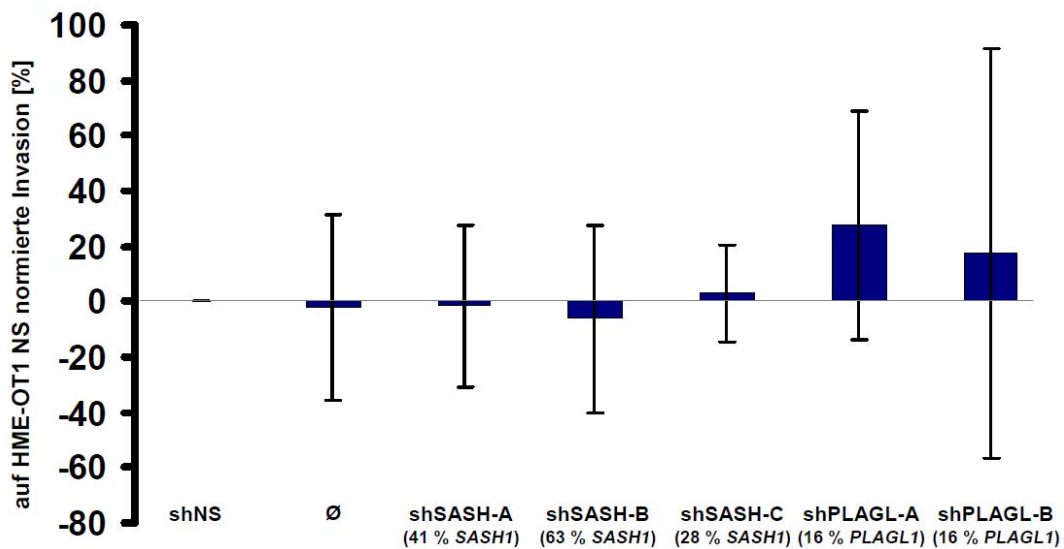


Abb. 36: Untersuchung des Invasionsverhaltens nach lentiviraler Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1*

Dargestellt ist der Mittelwert des veränderten Invasionsverhaltens von sechs biologischen Replikaten verschiedener HME-OT1-Zellklone bezogen auf HME-OT1-Zellen, welche mit einem non-silencing (NS) Vektor stabil transduziert wurden. Werte in Klammern zeigen die verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zu der non-silencing Kontrolle. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Replikate. Die Analyse der Invasion erfolgte indirekt über eine Impedanzmessung durch das xCELLigence System. ShSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A und shPLAGL-B beziehen sich auf die jeweilig verwendeten Lentiviren zur stabilen Transduktion von HME-OT1-Zellen. Die nicht-transduzierte Probe wurde mit Ø bezeichnet.

Da Zellen mit einer verminderten *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression nur ein geringfügig verstärktes Migrations- bzw. Invasionsverhalten im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen, wäre durch die Durchführung der Transmigrations- und Invasionsversuche mit den Zellklonen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation kein zusätzlicher Informationsgehalt erlangt worden. Folglich wurden die Transmigrations- und Invasionsversuche lediglich mit den stabil transduzierten Zellklonen durchgeführt.

Da es Hinweise gab, dass die Migration und Proliferation von Zellen nach *SASH1*-Niederregulierung aufgrund von erhöhter EGFR-begünstigt wird (persönliche Mitteilung der AG Janssen, TU München), sollte des Weiteren überprüft werden, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen einer *SASH1*-Niederregulierung und einer EGFR-Expression vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurde die EGFR-Expression in stabil transduzierten HME-OT1-Zellen und Kontrollzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer *SASH1*-Niederregulierung und einer EGFR-Expression gemessen werden. Allerdings war die

EGFR-Expression nach Transduktion mit shSASH-B in allen drei Replikaten höher als in der non-silencing Kontrolle (Abb. 37).

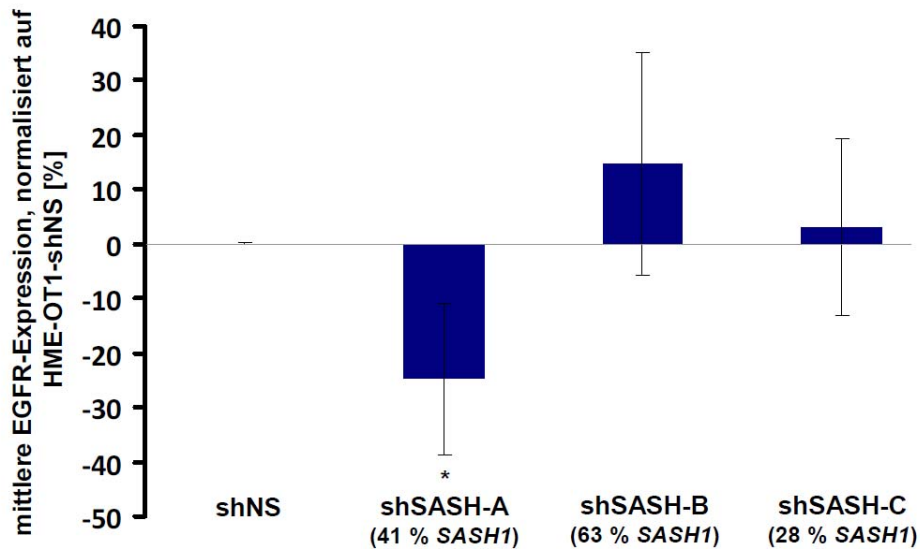


Abb. 37: Durchflusszytometrische Bestimmung der EGFR-Expression in transduzierten HME-OT1-Zellen

Dargestellt ist die mittlere Erhöhung bzw. Erniedrigung der EGFR-Expression nach lentiviraler Niederregulierung von *SASH1* mit shSASH-A, shSASH-B oder shSASH-C im Vergleich zu Kontrollzellen (transduziert mit shNS) in Prozent. Die EGFR-Expression wurde jeweils durchflusszytometrisch in drei biologischen Replikaten bestimmt. Der Unterschied in der EGFR-Expression zwischen HME-OT1-Zellen, welche mit shRNAmir gegen *SASH1* oder shNS transduziert wurden, ist markiert (unabhängiger, zweiseitiger Student-t-test nach Normalisierung der EGFR-Expression auf die non-silencing Kontrolle bestimmt (* $p < 0,05$)).

Interessanterweise wurde die höchste EGFR-Expression in der Parentalzelllinie hHME-tert gemessen (Abb. 38).

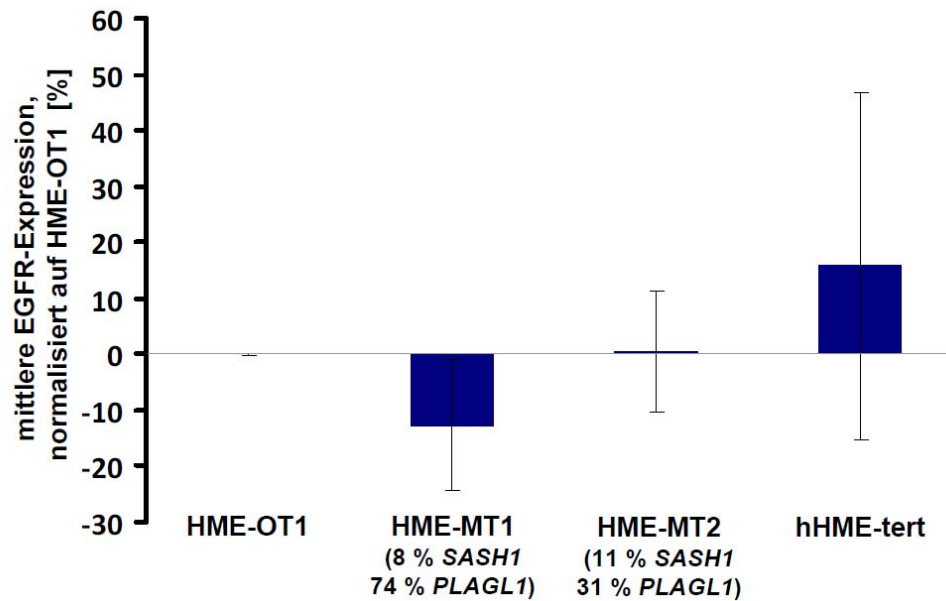


Abb. 38: Vergleich der EGFR-Expression in HME-OT1-Zellen

Dargestellt ist die mittlere Erhöhung bzw. Erniedrigung der EGFR-Expression in Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-MT1, HME-MT2) und hHME-tert-Zellen im Vergleich zu HME-OT1-Kontrollzellen (keine *SASH1/PLAGL1*-Translokation) in Prozent. Werte in Klammern beziehen sich auf die jeweilige verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zu Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Replikate. Die EGFR-Expression wurde jeweils durchflusszytometrisch in drei biologischen Replikaten bestimmt.

Die Niederregulierung von SASH1 und PLAGL1 erhöht die Anoikisresistenz und das Stammzell- bzw. Progenitorpotenzial von Mammazellen

Die Metastasenbildung aus disseminierten Tumorzellen hängt von der Fähigkeit ab, an neuer Stelle ein Organ zu kolonisieren sowie eine unbegrenzte Anzahl an Tochterzellen zu bilden. Diese Eigenschaften teilen Metastasenvorläuferzellen mit Krebsstammzellen (Selbsterneuerung und Fähigkeit zur Tumorigenese). Da sich die Metastasenvorläuferzellen unter den DTCs befinden und die Deletion von *SASH1/PLAGL1* ursprünglich in DTCs identifiziert wurde, sollte überprüft werden, ob durch die Niederregulierung von *SASH1/PLAGL1* das Stammzell- bzw. Progenitorpotenzial von Zellen erhöht wird.

Eine häufig verwendete Methode zur Anreicherung von Mammastammzellen bzw. Progenitorzellen ist die Bildung von sogenannten Mammosphären. Aus diesem

Grund wurden 30 000 Zellen des jeweils zu untersuchenden Zellklons pro mL Medium unter Sphärenkonditionen ausgesät und die Anzahl der gebildeten Sphären nach acht Tagen bestimmt.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die lentivirale Niederregulierung von *SASH1/PLAGL1* einen Einfluss auf die Sphärenbildung hat. Dazu wurden die stabil transduzierten HME-OT1-Klone mit *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung in vier biologischen Replikaten mit der non-silencing Kontrolle verglichen (Abb. 39). Bei Verwendung des Vektors shSASH-A ($p = 0,009$), shSASH-B ($p = 0,32$) sowie shPLAGL-B ($p = 0,047$) war die mittlere Sphärenanzahl im Vergleich zur non-silencing Kontrolle erhöht.

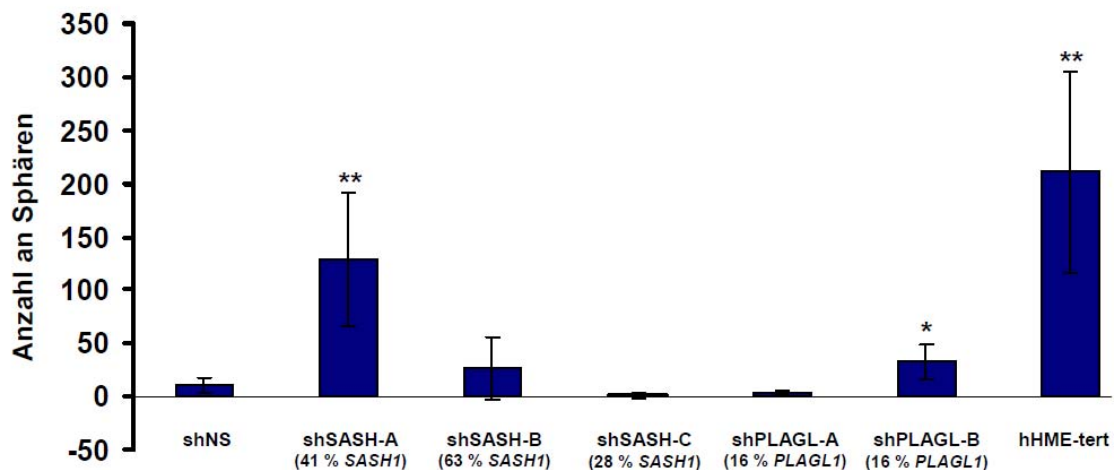


Abb. 39: Vergleich der Sphärenbildung nach stabiler Transduktion von HME-OT1

Dargestellt ist die mittlere Anzahl der gebildeten Sphären von vier biologischen Replikaten acht Tage nach Aussaat von 30 000 Zellen pro mL Medium. ShNS (non-silencing), shSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A und shPLAGL-B bezeichnen die jeweiligen verwendeten Vektoren bei der stabilen lentiviralen Transduktion von HME-OT1-Zellen. Werte in Klammern zeigen die verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zu der non-silencing Kontrolle. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Der Unterschied zwischen der jeweiligen Zelllinie und der shNS-Kontrolle wurde mit einem unabhängigen, zweiseitigen Student t-Test ermittelt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Trotz der vermehrten Sphärenbildung von Zellen, in denen *SASH1* bzw. *PLAGL1* niederreguliert worden war, im Vergleich zu non-silencing-Kontrollzellen, fiel auf, dass deutlich weniger Sphären als in der Parentalzelllinie (hHME-tert) gebildet wurden. Des Weiteren waren die detektierten Sphären auch deutlich kleiner. Während der Durchmesser von hHME-tert meist größer als 100 μm war, betrug der Durchmesser der Sphären aus transduzierten Zellklonen mit Ausnahme von HME-

OT1-shSASH-A meist nur zwischen 30-50 μm (Abb. 40). Innerhalb der transduzierten Zellklone, waren jene Zellklone, welche mit shSASH-A, shSASH-B, shPLAGL-A und shPLAGL-B transduziert worden waren, deutlich größer als die non-silencing Kontrolle.

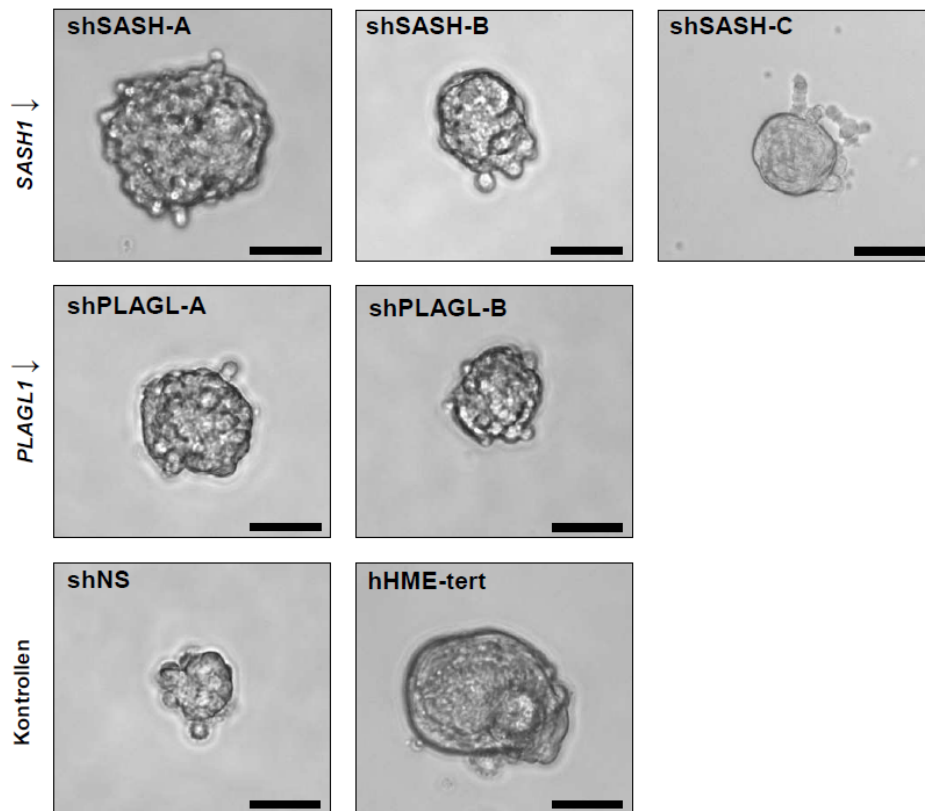


Abb. 40: Sphärenbildung nach stabiler Transduktion

Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Sphäre der jeweils untersuchten Zelllinie acht Tage nach Aussaat der jeweiligen Zellen. Zur Untersuchung der Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* auf die Sphärenbildung wurden jeweils HME-OT1-Zellen mit dem Vektor shSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A bzw. shPLAGL-B lentiviral transduziert. Als Kontrollen dienten HME-OT1-Zellen, welche mit einem non-silencing Vektor transduziert wurden (shNS) sowie hHME-tert-Zellen. Der schwarze Balken entspricht jeweils einer Größe von 50 μm .

Beim Vergleich der Zellklone mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation mit der Parentalzelllinie hHME-tert war der Unterschied in der Größe und Anzahl der gebildeten Sphären sogar noch deutlicher. Während mit einer einzigen Ausnahme (sechs Sphären bei HME-OT1 in einem der drei Replikate) keine Sphären in den untersuchten Zellklonen gebildet wurden, betrug die mittlere Anzahl von drei biologischen Replikaten der Parentalzelllinie 281 (Abb. 41). Dieser Unterschied ist in allen drei Zellklonen deutlich (zweiseitiger, unabhängiger Student t-Test $p < 0,01$). Somit sollte überprüft werden, ob durch die Kokultivierung von Zellen ohne

SASH1/PLAGL1-Translokation und Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation bzw. *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung der hHME-tert-Phänotyp wieder hergestellt werden kann. Da in der Parentalzelllinie ca. 60 % der Zellen keine *SASH1/PLAGL1*-Translokation aufwiesen, wurden 18 000 HME-OT1-Zellen pro mL Medium (entspricht 60 % von 30 000) mit 12 000 Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-MT1 bzw. HME-MT2) bzw. lentiviraler *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung pro mL Medium kokultiviert. In der Kokultur von HME-MT2 und HME-OT1 wurde wie in der HME-MT2 Einzelkultur keine Sphärenbildung detektiert. Im Gegensatz dazu konnten in allen drei biologischen Replikaten der Kokulturen von HME-MT1 und HME-OT1 Sphären (Spannweite der Sphärenanzahl: 1-6) detektiert werden, während in der HME-MT1-Einzelkultur keine einzige Sphäre gebildet wurde (Abb. 41).

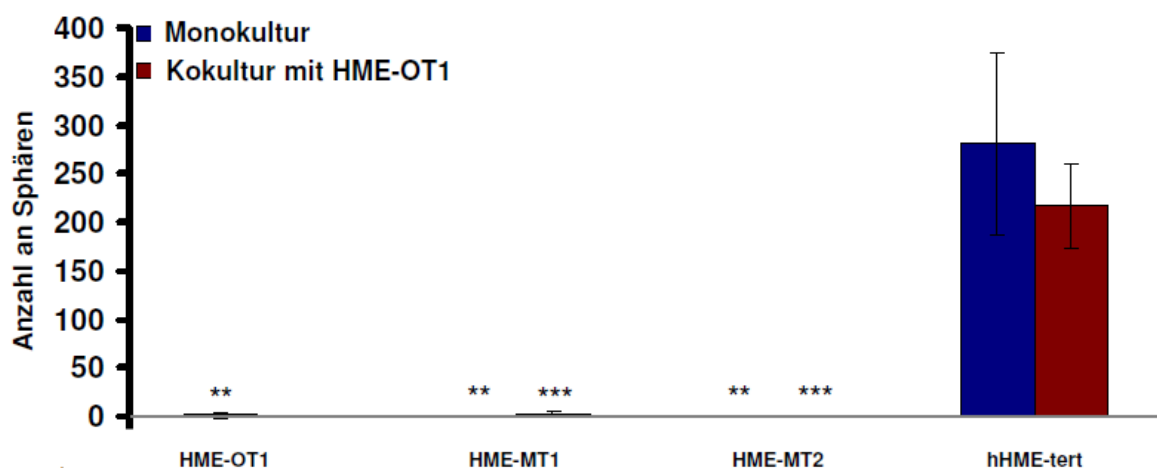


Abb. 41: Vergleich der Sphärenbildung zwischen der Parentalzelllinie hHME-tert und Zellklonen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation nach Mono- bzw. Kokultur

Abgebildet ist jeweils die mittlere Anzahl an gebildeten Sphären acht Tage nach Aussaat von 30 000 Zellen pro mL Medium von drei Replikaten sowie die entsprechende Standardabweichung. Die linken Balken stellen die mittlere Anzahl der Sphären von Monokulturen der Zellklone HME-OT1, HME-MT1, HME-MT2 bzw. der Parentalzelllinie hHME-tert dar, während die rechten Balken die Kokulturen von je 18 000 HME-OT1-Zellen mit 12 000 der zu untersuchenden Zellen pro mL Medium darstellen. Die Unterschiede in der Anzahl der gebildeten Sphären zu der jeweiligen Sphärenanzahl in der Mono- bzw. Kokultur von hHME-tert wurden markiert (zweiseitiger, unabhängiger Student t-Test; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Vergleicht man die Anzahl der gebildeten Sphären nach Kokultur von HME-OT1 und einem Zellklon, in dem *SASH1* oder *PLAGL1* lentiviral niederreguliert wurde, mit der Kokultur der non-silencing Kontrolle, so ist ein deutlicher Unterschied nach

Transduktion mit shSASH-A ($p = 0,004$), shSASH-B ($p = 0,03$), shSASH-C ($p = 0,04$) und shPLAGL-B ($p = 0,01$) nachzuweisen (Abb. 42).

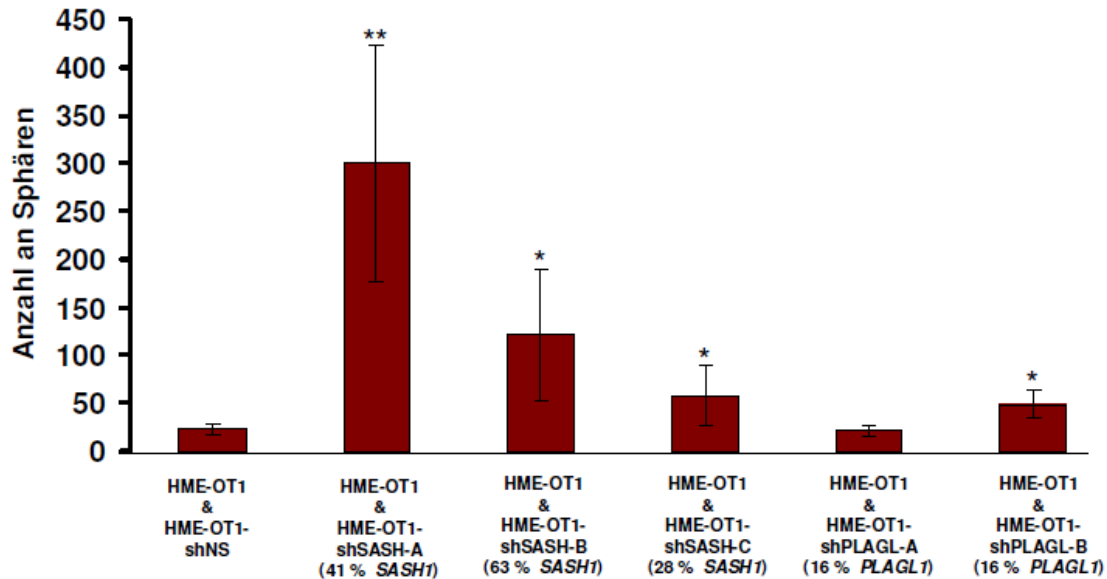


Abb. 42: Vergleich der gebildeten Anzahl an Sphären nach Kokultur

Abgebildet ist jeweils die mittlere Anzahl an gebildeten Sphären acht Tage nach Aussaat von 18 000 PKH26-gefärbter HME-OT1-Zellen mit 12 000 der zu untersuchenden Zellen pro mL Medium sowie die Standardabweichung. ShNS (non-silencing), shSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A und shPLAGL-B bezeichnen die jeweiligen lentiviralen Vektoren zur stabilen Transduktion von HME-OT1-Zellen. Werte in Klammern beziehen sich auf die verbleibende *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression im Vergleich zur non-silencing Kontrolle. Der Unterschied in der Sphärenanzahl zwischen der Kokultur mit der non-silencing Kontrolle und des jeweiligen *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Knockdowns ist markiert (unabhängiger, zweiseitiger Student-t-test nach Normalisierung der Kokulturwerte auf die non-silencing Kontrolle, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Die Anzahl der gebildeten Sphären nach Kokultur von HME-OT1-Zellen mit stabil transduzierten HME-OT1-Zellen war dabei in jedem Ansatz höher als bei der Monokultur des jeweiligen Zellklons. Die Unterschiede in der Sphärenanzahl zwischen Mono- und Kokultur waren dabei mit Ausnahme von HME-PLAGL-A deutlich [shSASH-A ($p = 0,046$), shSASH-B ($p = 0,05$), shSASH-C ($p = 0,004$); shPLAGL-A ($p = 0,001$), shPLAGL-B ($p = 0,17$), shNS ($p = 0,03$); Abb. 43].

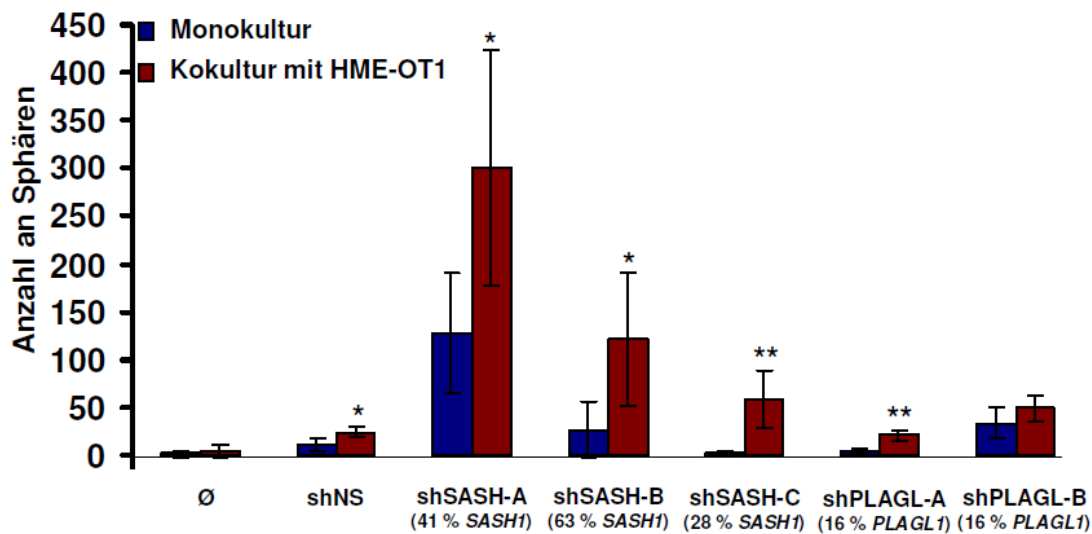


Abb. 43: Vergleich der gebildeten Anzahl an Sphären nach Mono- bzw. Kokultur

Abgebildet ist jeweils die mittlere Anzahl an gebildeten Sphären acht Tage nach Aussaat von 30 000 Zellen pro mL Medium von vier Replikaten sowie die entsprechende Standardabweichung. In der Kokultur wurden je 18 000 PKH26-gefärbte HME-OT1-Zellen mit 12 000 der zu untersuchenden Zellen pro mL Medium kokultiviert. ShNS (non-silencing), shSASH-A, shSASH-B, shSASH-C, shPLAGL-A und shPLAGL-B bezeichnen die jeweiligen lentiviralen Vektoren zur stabilen Transduktion von HME-OT1-Zellen. Nicht transduzierte HME-OT-Zellen wurden mit Ø bezeichnet. Der Unterschied in der Sphärenanzahl zwischen Mono- und Kokultur der jeweiligen Zelllinie wurde markiert (unabhängiger, zweiseitiger Student-t-test nach Normalisierung der Kokulturwerte auf die jeweiligen Einzelkulturwerte; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Um beurteilen zu können, ob generierte Sphären aus einem oder zwei Zellklonen bestehen, wurden HME-OT1 vor der Zellkultur mit dem Membranfarbstoff PKH26 (rot) markiert. Somit waren nicht transduzierte Zellen rot und transduzierte Zellen aufgrund des lentiviral kodierten GFP grün markiert. Interessanterweise waren alle detektierten Sphären ein Gemisch aus transduzierten und nicht-transduzierten Zellen (Abb. 44).

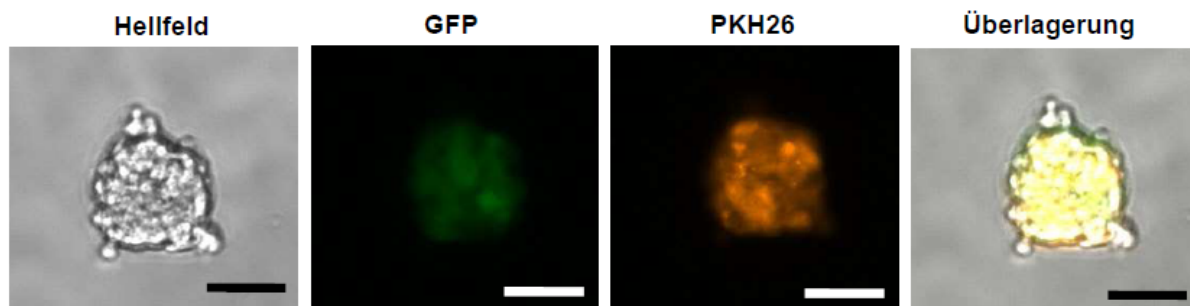


Abb. 44: Darstellung einer Sphäre aus dem Kokulturrexperiment

Dargestellt ist eine repräsentative Sphäre des Kokulturrexperiments, welche aus den stabil transduzierten und somit GFP-positiven HME-OT-Zellen (hier Transduktion mit shSASH-A) und PKH26-gefärbten HME-OT1-Zellen besteht. Der schwarze bzw. weiße Balken entspricht jeweils einer Größe von 50 µm.

Zusammengefasst zeigen die *in vitro* Versuche mit den stabil transduzierten Zellen sowie dem Vergleich der Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation eine deutliche Rolle von *SASH1* und *PLAGL1* in der Regulierung der Proliferation sowie des Stammzell- bzw. Progenitorpotenzials von Mammeepithelzellen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht über alle *in vitro* beobachteten Effekte

	HME-OT1**					
	shNS	shSASH-B	shSASH-A	shSASH-C	shPLAGL-A	shPLAGL-B
<i>SASH1</i> *	81	51	34	23	380	109
<i>PLAGL1</i> *	103	140	117	176	17	17
Proliferation	++	+	++++	++++	+++++	+++++
Migration	+	+	+++	++	+++	+
Invasion	+	+	+	+	+++	++
Sphärenbildung-Einzelkultur	+	++	++++	+	+	++
EGFR-Expression	++++	+++++	+	++++	(+)	(+)

	HME-OT1	HME-MT1	HME-MT2	hHME-tert
<i>SASH1</i> *	100	8	11	88
<i>PLAGL1</i> *	100	74	31	200
Proliferation	+	++++	++++	++++
Migration	NB	NB	NB	NB
Invasion	NB	NB	NB	NB
Sphärenbildung-Einzelkultur	(+)	(+)	(+)	+++++
EGFR-Expression	++	+	++	++++

* Die durch qPCR bestimmten relativen Expressionswerte von *SASH1* bzw. *PLAGL1* beziehen sich zum besseren Vergleich alle auf nicht transduzierte HME-OT1

**Zur besseren Übersicht wurden nur Ergebnisse mit stabil transduzierten HME-OT1 tabellarisch dargestellt

NB = nicht bestimmt

Die SASH1-Deletion ist ein prognostischer Faktor und ist mit besonders aggressiven Mammakarzinomen assoziiert

Obwohl *in vitro* eindeutig die Rolle von *SASH1* bzw. *PLAGL1* als Tumorsuppressorgene gezeigt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die durch eine *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung hervorgerufenen Effekte (z. B. auf die Proliferation) Zellkulturartefakte darstellen. Daher sollte als nächstes überprüft werden, ob die Deletion in Primärtumoren mit relevanten klinischen Parametern assoziiert werden kann. Dazu wurde eine FISH-Analyse auf einem sogenannten tissue microarray (TMA) durchgeführt, der aus FFPE-Tumorgewebe von 97 Patientinnen mit invasiv lobulärem oder duktal unilateralem primärem Mammakarzinom (25-82 Jahre, mittleres Alter 55), welche zwischen 1992 und 2002 operiert wurden, besteht. Die Tumore der Patientinnen wurden routinemäßig auf eine Expression des Östrogenrezeptors (ER), des Progesteronrezeptors (PR) und den HER2-Rezeptor untersucht (Tabelle 16). Solche Tumore die ER- und/oder PR exprimieren, werden als luminal bezeichnet (n = 67), während Tumore die negativ für ER und PR sowie keine HER2-Überexpression aufweisen als trippelnegativ (n = 14) bezeichnet werden. Alle Patientinnen wurden sowohl als R0 (negativer Resektionsrand) und M0 (keine Metastasen zum Zeitpunkt der Operation) charakterisiert. Die mediane Follow-up Zeit des verwendeten Kollektivs beträgt 136 Monate. Es verstarben 45 Patientinnen (46,4 %) tumorbedingt und 47 Patientinnen (48,5 %) entwickelten eine Metastase. Da sowohl die Allelverlustanalysen der DTCs als auch die FISH-Analyse von Mammakarzinomzelllinien und die geringe physikalische Distanz von *SASH1* und *PLAGL1* auf eine Kodeletion der beiden Gene hinwies, wurden die TMA-Schnitte lediglich mit Sonden hybridisiert, die für das Gen *SASH1* bzw. das Zentromer des Chromosoms 6 spezifisch sind.

Zunächst sollte die Hypothese überprüft werden, dass die *SASH1*-Deletion ein frühes Ereignis in der Tumorprogression des Mammakarzinoms darstellt. Dazu wurden die Patientinnen in zwei Gruppen eingeteilt: In den Primärtumoren der Patientinnen der ersten Gruppe (7 %) war die *SASH1*-Deletion in der überwiegenden Anzahl (in mindestens 80 %) der analysierten Primärtumorzellen vorhanden. Im Folgenden wird die *SASH1*-Deletion als klonal bezeichnet, wenn sie in mindestens 80 % der untersuchten Primärtumorzellen detektiert wurde. In den restlichen Patientinnen konnte die *SASH1*-Deletion in einer geringeren Anzahl der Primärtumorzellen

detektiert werden. Vergleicht man diese beiden Patientengruppen bezogen auf die klinischen Parameter, zeigt sich, dass eine klonale *SASH1*-Deletion mit einer niedrigen Differenzierung (G3-4; $p = 0,041$) und tendenziell mit einer erhöhten Proliferation ($p = 0,080$) einhergeht (Tabelle 16).

Tabelle 16: Klinische Basisdaten des Mammakarzinomkollektivs der FISH-Analyse

	Patienten [%]		<i>SASH1</i> - Deletion in < 80 % der Tumorzellen		<i>SASH1</i> - Deletion in ≥ 80 % der Tumorzellen		p-Wert
	97	[100]	Patienten	90 [%]	Patienten	7 [%]	
Rezidiv (systemisch)							
ja	47	[48]	42	[47]	5	[71]	0,259
nein	50	[52]	48	[53]	2	[29]	
Überleben							
ja	52	[54]	49	[54]	3	[43]	0,701
nein	45	[46]	41	[46]	4	[57]	
Primärtumorgröße							
pT1-T2	79	[81]	73	[81]	6	[86]	1,000
pT3-T4	18	[19]	17	[19]	1	[14]	
lokale Lymphknotenmetastasen							
pN0	44	[45]	40	[44]	4	[57]	0,699
pN1-3	52	[54]	49	[54]	3	[43]	
unbekannt	1	[1]	1	[1]	0	[0]	
Differenzierungsgrad							
G1-2	51	[53]	50	[56]	1	[14]	0,041
G3	46	[47]	40	[44]	6	[86]	
ER-Status des Primärtumors							
positiv	64	[66]	61	[68]	3	[43]	0,19
negativ	27	[28]	23	[26]	4	[57]	
nicht bestimmbar*	6	[6]	6	[7]	0	[0]	
PR-Status des Primärtumors							
positiv	44	[45]	43	[48]	1	[14]	0,115
negativ	49	[51]	43	[48]	6	[86]	
nicht bestimmbar*	4	[4]	4	[4]	0	[0]	
HER2-Status des Primärtumors							
positiv	36	[37]	33	[37]	3	[43]	1,000
negativ	37	[38]	33	[37]	4	[57]	
nicht bestimmbar*	24	[25]	24	[27]	0	[0]	
Ki67-Färbung							
≤10 % positive Zellen	38	[39]	37	[41]	1	[14]	0,08
>10 % positive Zellen	30	[31]	25	[28]	5	[71]	
nicht bestimmbar*	29	[30]	28	[31]	1	[14]	

*keine Analyse möglich da z.B. kein Tumormaterial mehr vorhanden

Es zeigte sich auch ein Zusammenhang zwischen einer *SASH1*-Deletion und einem verringerten metastasefreien Überleben ($p = 0,047$; Abb. 45).

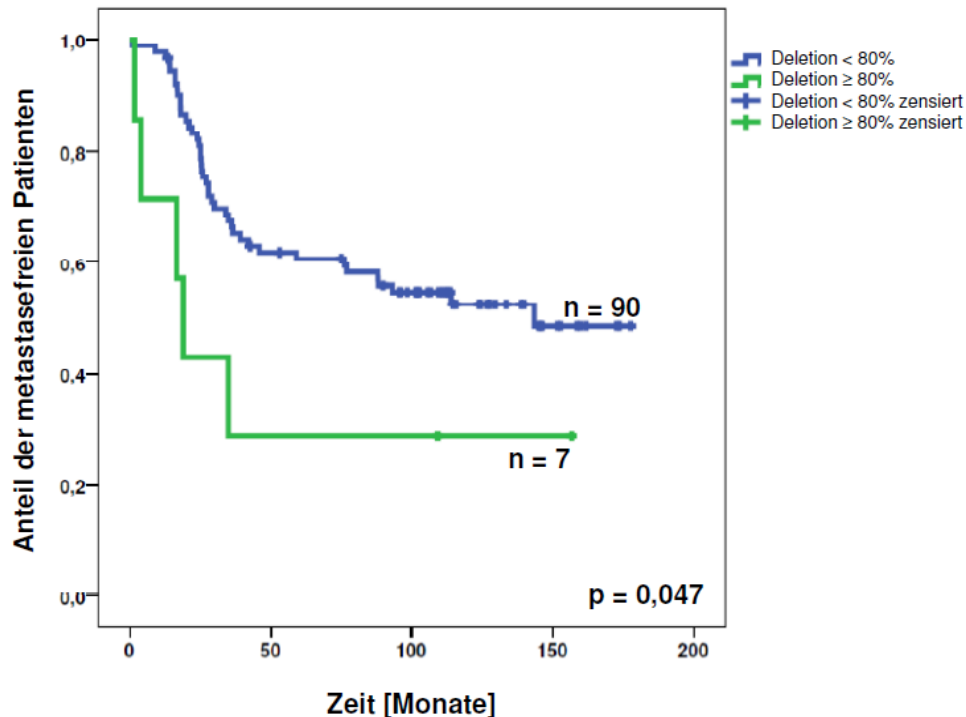


Abb. 45: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben von Patientinnen mit *SASH1*-Deletion in weniger als 80 % bzw. in mindestens 80 % der untersuchten Primärtumorzellen

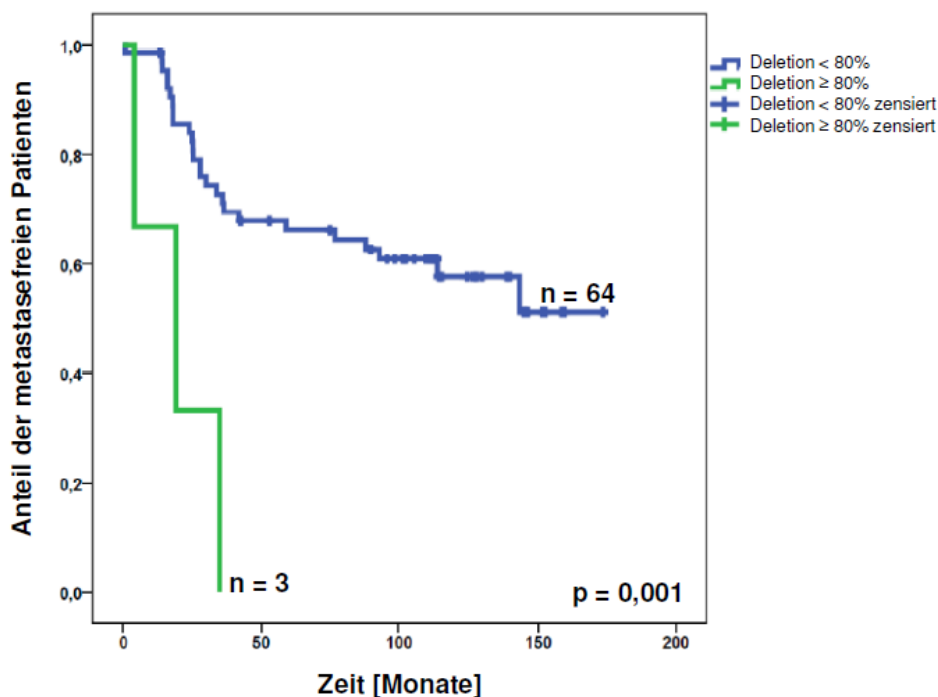
Dargestellt ist die Kaplan-Meier Kurve für das metastasefreie Überleben von insgesamt 97 Patientinnen, die in mindestens 80 % der untersuchten Primärtumorzellen (grüne Kurve) oder in weniger als 80 % der untersuchten Primärtumorzellen (blaue Kurve) eine *SASH1*-Deletion aufweisen.

Die multivariate Analyse (Tabelle 17) bestätigte, dass Patientinnen mit einer klonalen *SASH1*-Deletion im Primärtumor im Vergleich zu Patientinnen, die seltener eine *SASH1*-Deletion in ihren Primärtumoren aufweisen, ein dreifach erhöhtes Risiko haben, eine Metastase zu entwickeln. Neben der *SASH1*-Deletion wurde in dem verwendeten Patientenkollektiv nur der Lymphknotenstatus als weiterer unabhängiger Risikofaktor für das metastasefreie Überleben bestimmt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der *SASH1*-Deletion und dem Gesamtüberleben gefunden werden ($p = 0,643$).

Tabelle 17: Uni- und multivariate Überlebensanalyse von prognostischen Faktoren auf das metastasefreie Überleben

Risikofaktor	Univariate Analyse	Multivariate Analyse	
	p-Wert	Relatives Risiko (95 % KI)	p-Wert
Lymphknotenstatus pN1-3 (n = 52) versus pN0 (n = 44)	0,000	3,688 (1,885-7,216)	0,000
Primärtumorgröße pT3-4 (n = 18) versus pT1-2 (n = 79)	0,021	---	
Tumordifferenzierung G3-4 (n = 46) versus G1-2 (n = 51)	0,044	---	
Deletion in < 80 % der Zellen (n = 90) versus ≥ 80 % der Zellen (n = 7)	0,047	3,296 (1,283-8,468)	0,040

Der Primärtumor von drei der fünf Patientinnen, welche überwiegend eine *SASH1*-Deletion aufwiesen und eine Metastase bekamen, konnte als luminal (positiv für Östrogenrezeptor- und/oder Progesteronrezeptor) charakterisiert werden. Deshalb wurde als nächstes der Einfluss der *SASH1*-Deletion auf das metastasefreie Überleben ausschließlich in den Patienten mit luminalem Tumor betrachtet (Abb. 46). Tatsächlich ist ein sehr deutlicher Unterschied in der Dauer des metastasefreien Überlebens zu beobachten ($p = 0,001$).

**Abb. 46: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben von Patientinnen mit luminalem Mammakarzinom und *SASH1*-Deletion in weniger als bzw. in mindestens 80 % der Primärtumorzellen**

Dargestellt ist die Kaplan-Meier Kurve des kumulativen Überleben von insgesamt 67 Patientinnen mit luminalem Mammakarzinom, die in mindestens 80 % der untersuchten Primärtumorzellen (grüne Kurve) oder in weniger als 80 % der untersuchten Primärtumorzellen (blaue Kurve) eine *SASH1*-Deletion aufweisen.

Auch die multivariate Überlebensanalyse bestätigte den Einfluss der *SASH1*-Deletion auf das metastasefreie Überleben in Patientinnen mit luminalem Mammakarzinom: Patientinnen mit einer klonalen *SASH1*-Deletion in den untersuchten luminalen

Primärtumorzellen wiesen im Vergleich zu Patientinnen mit einer selteneren *SASH1*-Deletion ein 39,5fach (95 % KI: 2,470-631,491) erhöhtes Risiko auf, eine Metastase zu entwickeln (Tabelle 18). Die *SASH1*-Deletion war dabei der einzige prognostisch relevante Faktor in der multivariaten Analyse.

Tabelle 18: Uni- und multivariate Analyse von prognostischen Faktoren der Patientinnen mit luminalem Mammakarzinom auf das metastasefreie Überleben

Risikofaktor	Univariate Analyse	Multivariate Analyse	
	p-Wert	Relatives Risiko (95 % KI)	p-Wert
Lymphknotenstatus pN1-3 (n = 25) versus pN0 (n = 16)	0,219	---	
Primärtumorgroße pT3-4 (n = 7) versus pT1-2 (n = 34)	0,031	---	
Tumordifferenzierung G3-4 (n = 15) versus G1-2 (n = 26)	0,082	---	
Deletion in ≥ 80 % der Zellen (n = 3) versus < 80 % der Zellen (n = 38)	0,000	39,497 (2,470-631,491)	0,031

Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und einer *SASH1*-Deletion bei Patientinnen mit luminalem Mammakarzinom gefunden ($p = 0,499$).

Interessanterweise war die *SASH1*-Deletion bei Patientinnen mit trippelnegativem (negativ für die Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie keine *HER2*-Amplifikation) Primärtumor in 21,4 % (3/14) der Primärtumore nachzuweisen, während die Deletion nur in 4,8 % (4/83) der Primärtumore der restlichen Patientinnen visualisiert werden konnte ($p = 0,059$). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde in Kooperation mit Florian Weber und Dr. Anna Machleidt (Uniklinikum Regensburg) TMAs aus Tumormaterial von 30 Patientinnen (28-81 Jahre, mittleres Alter 55) mit trippelnegativem Primärtumor hergestellt, welche zwischen 2004 und 2008 operiert wurden. Alle Patientinnen wurden sowohl als R0 (negativer Resektionsrand) und M0 (keine Metastasen zum Zeitpunkt der Operation) charakterisiert. Die mediane Follow-up Zeit dieser Patientinnen betrug 44 Monate. Es verstarben 9 der 30 Patientinnen (30 %) tumorbedingt und 5 Patientinnen (17 %) entwickelten eine Metastase.

In 6 der 30 (20 %) untersuchten Primärtumoren wurde eine klonale *SASH1*-Deletion detektiert. Diese Anreicherung der Deletion in trippelnegativen Patientinnen ist im Vergleich zu den zuvor analysierten nicht-trippelnegativen Patientinnen (Deletion in weniger als 5 % der Patientinnen) deutlich ($p = 0,021$). Da trippelnegative Tumore meist einen hohen Differenzierungsgrad sowie einen hohen proliferativen Index aufweisen, konnte keine Assoziation zwischen dem Auftreten der Deletion und aggressiveren Tumoren gefunden werden (Tabelle 19). Stattdessen war die *SASH1*-

Deletion sogar bei Patientinnen mit schwächer proliferierendem trippelnegativem Mammakarzinom tendenziell häufiger als in den restlichen Patientinnen mit trippelnegativem Mammakarzinom ($p = 0,073$). Auch konnte die Häufigkeit einer *SASH1*-Deletion in Patientinnen mit trippelnegativem Mammakarzinom nicht mit einem erhöhten Sterberisiko ($p = 0,477$) oder Metastasierung ($p = 0,243$) assoziiert werden.

Tabelle 19: Klinische Basisdaten des trippelnegativen Patientenkollektivs

			<i>SASH1</i> - Deletion in < 80 % der Tumorzellen		<i>SASH1</i> - Deletion in ≥ 80 % der Tumorzellen		p-Wert
	Patienten	[%]	Patienten	[%]	Patienten	[%]	
Rezidiv	30	[100]	24	[100]	6	[100]	
ja	5	[17]	5	[21]	0	[0]	0,553
nein	25	[83]	19	[79]	6	[100]	
Überleben							
ja	21	[70]	16	[67]	5	[83]	0,637
nein	9	[30]	8	[33]	1	[17]	
Primärtumorgröße							
pT1-T2	27	[90]	21	[88]	6	[100]	1,000
pT3-T4	3	[10]	3	[13]	0	[0]	
lokale Lymphknotenmetastasen							
pN0	20	[67]	16	[67]	4	[67]	1,000
pN1-3	10	[33]	8	[33]	2	[33]	
Differenzierungsgrad							
G1-2	6	[20]	4	[17]	2	[33]	0,571
G3	24	[80]	20	[83]	4	[67]	
Ki67-Färbung							
≤10 % positive Zellen	3	[10]	1	[4]	2	[33]	0,073
>10 % positive Zellen	25	[83]	22	[92]	3	[50]	
nicht bestimmbar*	2	[7]	1	[4]	1	[17]	
EGFR-Färbung							
positiv	12	[40]	9	[38]	3	[50]	0,624
negativ	16	[53]	14	[58]	2	[33]	
unbekannt	2	[7]	1	[4]	1	[17]	
CK5/6-Färbung							
positiv	11	[37]	9	[38]	2	[33]	1,000
negativ	19	[63]	15	[63]	4	[67]	

* keine Analyse da z. B. kein Tumormaterial mehr vorhanden

Trippelnegative Tumore können auf Basis der Expression von CK5/6 und EGFR des Weiteren als basal (ER- und PR-negativ, keine HER2-Überexpression, sowie CK5/6 und/oder EGFR positiv) oder fünffach negativ (ER- und PR-negativ, keine HER2-Überexpression sowie CK5/6 und EGFR negativ) eingeteilt werden. Es konnte keine vermehrte Assoziation der *SASH1*-Deletion mit einem der beiden Subtypen gefunden werden. Allerdings waren geringfügig mehr (57 %) Tumore mit klonaler *SASH1*-Deletion EGFR-positiv, als Primärtumore mit einer selteneren *SASH1*-Deletion (45 %).

Da in den *in vitro* Versuchen Hinweise für eine Zellkooperativität zwischen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung erhalten wurden, sollte überprüft werden, ob sich der Effekt der Zellkooperativität auch in den untersuchten Primärtumorgeweben nachweisen lässt. Folglich wurden die Patientinnen in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe A (34 %) wies in weniger als 20 %, Gruppe B (59 %) in 20-80 % und Gruppe C (7 %) in mehr als 80 % der untersuchten Primärtumorzellen eine *SASH1*-Deletion auf. Falls eine Zellkooperativität zwischen Zellen mit und ohne *SASH1*-Deletion einen Einfluss auf gewisse klinische Parameter (z. B. Proliferation) ausübt, müssten sich die aggressiveren Tumoren vermehrt in der Gruppe B befinden. Durch diese Art der Analyse konnte allerdings keine Assoziation von einzelnen klinischen Parametern mit dem Phänomen der Zellkooperativität im ersten Kollektiv gefunden werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Assoziation von klinischen Basisdaten mit Zellkooperativität in 97 Patienten mit Mammakarzinom

	Patienten		SASH1-Deletion in < 20 % der Tumorzellen		20 % ≤ SASH1 - Deletion < 80 %		SASH1-Deletion in ≥ 80 % der Tumorzellen		
	97	[%]	Patienten	[%]	Patienten	[%]	Patienten	[%]	
		[100]	33	[100]	57	[100]	7	[100]	
Primärtumorgröße									p-Wert
pT1-T2	79	[81]	26	[79]	47	[82]	6	[86]	0,871
pT3-T4	18	[19]	7	[7]	10	[18]	1	[14]	
lokale Lymphknotenmetastasen									
pN0	44	[45]	13	[13]	27	[47]	4	[57]	0,595
pN1-3	52	[54]	20	[20]	29	[51]	3	[43]	
Differenzierungsgrad									
G1-2	51	[53]	23	[24]	27	[47]	1	[14]	0,013
G3	46	[47]	10	[10]	30	[53]	6	[86]	
Ki67-Färbung									
≤10 % positive Zellen	38	[39]	16	[48]	21	[37]	1	[14]	0,128
>10 % positive Zellen	30	[31]	11	[33]	14	[25]	5	[71]	
nicht bestimmbar*	29	[30]	6	[18]	22	[39]	1	[14]	
EGFR-Färbung									
positiv	7	[7]	2	[2]	3	[5]	2	[29]	0,736
negativ	8	[8]	1	[1]	4	[7]	3	[43]	
CK5/6-Färbung									
positiv	6	[6]	1	[1]	5	[9]	3	[43]	0,530
negativ	9	[9]	2	[2]	2	[4]	2	[29]	
Rezidiv (systemisch)									
ja	47	[48]	17	[18]	25	[44]	5	[71]	0,353
nein	50	[52]	16	[16]	32	[56]	2	[29]	
Überleben									
ja	52	[54]	16	[16]	33	[58]	3	[43]	0,578
nein	45	[46]	17	[18]	24	[42]	4	[57]	
ER-Status des Primärtumors									
positiv	64	[66]	8	[8]	15	[26]	4	[57]	0,237
negativ	27	[28]	24	[25]	37	[65]	3	[43]	
PR-Status des Primärtumors									
positiv	44	[45]	15	[15]	28	[49]	6	[86]	0,173
negativ	49	[51]	17	[18]	26	[46]	1	[14]	
HER2-Status des Primärtumors									
positiv	36	[37]	14	[14]	19	[33]	4	[57]	0,937
negativ	37	[38]	14	[14]	19	[33]	3	[43]	

* keine Analyse da z. B. kein Tumormaterial mehr vorhanden

Ein Unterschied zwischen dem metastasefreien Überleben konnte nur zwischen den Patienten mit klonaler *SASH1*-Deletion und Patientinnen mit einer heterogenen Verteilung der *SASH1*-Deletion festgestellt werden ($p = 0,036$; Abb. 47).

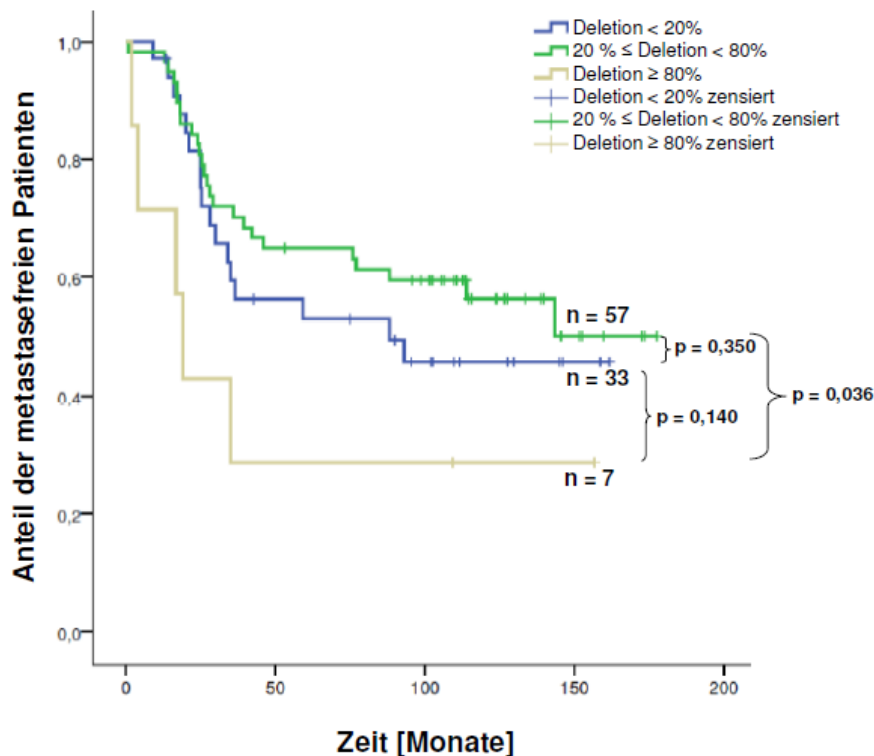


Abb. 47: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben von Patientinnen mit Mammakarzinom und unterschiedlicher Häufigkeit einer *SASH1*-Deletion

Dargestellt ist die Kaplan-Meier Kurve des kumulativen Überlebens von insgesamt 97 Patientinnen mit Mammakarzinom, die in weniger als 20 % (blaue Kurve), in mindestens 20 aber weniger als 80 % (grüne Kurve) oder in mindestens 80 % der untersuchten Primärtumorzellen (braune Kurve) eine *SASH1*-Deletion aufweisen.

Analysiert man ausschließlich die Patienten mit luminalen (ER und/oder PR-positiven) Primärtumoren desselben Kollektivs, kann ebenfalls keine Assoziation zwischen einer Zellkooperativität und den klinischen Basisdaten gefunden werden (Tabelle 21).

Tabelle 21: Assoziation von klinischen Basisdaten mit Zellkooperativität in 67 Patientinnen mit luminalem (ER und/oder PR-positiv) Mammakarzinom

	Patienten		<i>SASH1</i> -Deletion in < 20 % der Tumorzellen		20 % ≤ <i>SASH1</i> - Deletion < 80 %		<i>SASH1</i> -Deletion in ≥ 80 % der Tumorzellen		p-Wert
	67	[%] [100]	Patienten	[%] [100]	Patienten	[%] [100]	Patienten	[%] [100]	
Primärtumorgröße									
pT1-T2	52	[78]	19	[76]	31	[79]	2	[67]	0,851
pT3-T4	15	[22]	6	[24]	8	[21]	1	[33]	
lokale Lymphknotenmetastasen									
pN0	26	[39]	8	[32]	18	[46]	0	[0]	0,194
pN1-3	41	[61]	17	[68]	21	[54]	3	[100]	
Differenzierungsgrad									
G1-2	41	[61]	19	[76]	21	[54]	1	[33]	0,124
G3	26	[39]	6	[24]	18	[46]	2	[67]	
Ki67-Färbung									
≤10 % positive Zellen	20	[30]	6	[24]	14	[36]	0	[0]	0,256
>10 % positive Zellen	30	[45]	13	[52]	15	[38]	2	[67]	
nicht bestimmbar*	17	[25]	6	[24]	10	[26]	1	[33]	
Rezidiv (systemisch)									
ja	30	[45]	11	[44]	16	[41]	3	[100]	0,140
nein	37	[55]	14	[56]	23	[59]	0	[0]	
Überleben									
ja	34	[51]	12	[48]	21	[54]	1	[33]	0,745
nein	33	[49]	13	[52]	18	[46]	2	[67]	
HER2-Status des Primärtumors									
positiv	28	[42]	9	[36]	17	[44]	2	[67]	0,404
negativ	31	[46]	15	[60]	15	[38]	1	[33]	

* keine Analyse da z. B. kein Tumormaterial mehr vorhanden

Allerdings konnte durch diese Art der Analyse das Vorhandensein von Zellkooperativität im zweiten Kollektiv (ausschließlich trippelnegative Patientinnen) bestätigt werden: 20 der 25 (80 %) trippelnegativen Primärtumore mit einem hohen proliferativen Index wiesen eine *SASH1*-Deletion in mindestens 20 % aber höchstens 80 % der analysierten Primärtumorzellen auf ($p = 0,014$; Tabelle 22).

Tabelle 22: Untersuchung der Assoziation von klinischen Basisdaten mit Zellkooperativität in 30 Patienten mit trippelnegativem Mammakarzinom

	SASH1-Deletion in < 20 % der Tumorzellen		20 % ≤ SASH1 - Deletion < 80%		SASH1-Deletion in ≥ 80 % der Tumorzellen		p-Wert
	Patienten	[%]	Patienten	[%]	Patienten	[%]	
Primärtumorgroße	30	[100]	3	[100]	21	[100]	
pT1-T2	27	[90]	3	[100]	18	[86]	0,490
pT3-T4	3	[10]	0	[0]	3	[14]	
lokale Lymphknotenmetastasen							
pN0	20	[67]	2	[67]	14	[67]	1,000
pN1-3	10	[33]	1	[33]	7	[33]	
Differenzierungsgrad							
G1-2	6	[20]	1	[33]	3	[14]	0,490
G3	24	[80]	2	[67]	18	[86]	
Ki67-Färbung							
≤10 % positive Zellen	3	[10]	1	[33]	0	[0]	0,014
>10 % positive Zellen	25	[83]	2	[67]	20	[95]	
nicht bestimmbar*	2	[7]	0	[0]	1	[5]	
EGFR-Färbung							
positiv	12	[40]	2	[67]	7	[33]	0,407
negativ	16	[53]	1	[33]	13	[62]	
CK5/6-Färbung							
positiv	11	[37]	2	[67]	7	[33]	0,524
negativ	19	[63]	1	[33]	14	[67]	
Rezidiv (systemisch)							
ja	5	[17]	1	[33]	4	[19]	0,390
nein	25	[83]	2	[67]	17	[81]	
Überleben							
ja	21	[70]	2	[67]	7	[33]	0,728
nein	9	[30]	1	[33]	14	[67]	

* keine Analyse da z. B. kein Tumormaterial mehr vorhanden

Diskussion

Der Bedarf an effizienteren systemischen Therapien zur Behandlung von Patientinnen mit Mammakarzinom

Das Mammakarzinom wird nach Resektion des Primärtumors häufig adjuvant mit zytotoxischen Therapeutika behandelt, welche jedoch die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken. Zudem überleben Patienten, die mit Chemotherapie behandelt wurden, nur geringfügig öfter ($< 5\%$) als unbehandelte Patienten [114, 115]. Trotz stetiger therapeutischer Verbesserung ist die Metastasierung für 90 % der krebsassoziierten Todesfälle verantwortlich [116]. Es ist daher essentiell, wirksame Medikamente zur Eliminierung von Metastasen sowie deren Vorläuferzellen zu entwickeln.

Chemotherapeutika eliminieren häufig nur proliferierende Zellen. Allerdings gibt es Hinweise, dass die meisten disseminierten Tumorzellen (DTC), unter denen sich die Vorläuferzellen der Metastasen befinden, im Knochenmark nicht proliferieren [117]. Somit eliminieren Chemotherapeutika vermutlich nur ungenügend DTCs, so dass eine Metastasenbildung häufig nicht verhindert werden kann. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass sich auch nach Chemotherapie bei den meisten Patientinnen epitheliale Zellen im Knochenmark nachweisen lassen [118].

Es besteht zunehmend die Hoffnung, dass zielgerichtete Therapien erfolgreich in der Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms sind. Als Vorbild für die Entwicklung dieser „targeted therapies“ dient dabei die Entdeckung der bcr-abl-Translokation und die darauf basierende Entwicklung von Imatinib (Gleevec) für die Behandlung der chronisch-myeloischen Leukämie [119-121]. Ein bekanntes Beispiel für ein zielgerichtetes Therapeutikum zur Behandlung des Mammakarzinoms ist Herceptin (Trastuzumab), ein Antikörper, welcher spezifisch gegen das HER2-Onkoprotein gerichtet ist. Interessanterweise sprachen allerdings 50 % der Patientinnen nicht auf adjuvant verabreichtes Herceptin an, obwohl deren Primärtumore das HER2-Protein stark überexprimierten bzw. das HER2-Gen amplifiziert hatten [122, 123]. Dies könnte bedeuten, dass die Metastasen im Gegensatz zum Primärtumor dieser Patienten das Zielprotein HER2 nicht

überexprimieren. Tatsächlich korreliert das Auftreten einer *HER2*-Amplifikation in DTCs und Metastasen in 8-56 % der Patienten nicht mit der *HER2*-Expression im Primärtumor [41, 124-127]. Ein möglicher Grund für diese Divergenz ist die Streuung disseminierten Tumorzellen vor der chromosomalen Instabilität des Primärtumors, so dass ein Großteil der Aberrationen zwischen Primärtumor und den Metastasen, welche sich aus einigen der DTCs entwickeln, divergieren [30, 41, 42, 128].

Aufgrund der Divergenz exprimierter Zielstrukturen zwischen Primärtumor, DTCs und Metastasen ist die molekulare Charakterisierung des Primärtumors zur Entwicklung neuer Therapieansätze möglicherweise unzureichend. Stattdessen könnte es von Vorteil sein, therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, welche von allen Tumorzellen (DTCs, Metastase, Primärtumor) geteilt werden. Die Untersuchung von Deletionen, welche in der Regel irreparabel sind, könnte dabei besonders geeignet sein. Somit war es Ziel dieser Arbeit frühe Deletionen in der Progression des sporadischen Mammakarzinoms zu identifizieren und zu charakterisieren, da diese eine hohe Wahrscheinlichkeit besitzen, von den meisten Tumorzellen eines Patienten geteilt zu werden.

Identifizierung einer früher genetischen Aberrationen auf Chromosom 6q

Primärtumorzellen weisen zahlreiche Aneuploidien, chromosomale Umlagerungen, Amplifikationen, Deletionen sowie zum Teil über 20 000 Mutationen auf [129-131]. Im Gegensatz dazu besitzen DTCs von M0-Patientinnen häufig nur einige wenige subchromosomale Aberrationen, welche nur durch hochauflösende Methoden wie beispielsweise der Allelverlustanalyse nachgewiesen werden können. Aufgrund dieser Beobachtung wird vermutet, dass DTCs früh in der Tumورprogression disseminieren. Die genomische Analyse dieser Zellen stellt somit vermutlich einen guten Ausgangspunkt zur Identifizierung von Kandidatengenen dar, welche eine Rolle in der frühen Tumورprogression des Mammakarzinoms spielen. Dr. Andrea Eberhardt wies im Zuge ihrer Dissertation eine maximal 6 Mbp große Deletion auf Chromosom 6q24.2-25.1 in DTCs aus dem Knochenmark von M0-Mammakarzinompatientinnen nach [94]. Allelverluste der chromosomalen Region

6q23-q25 wurden schon häufig in Primärtumoren von Patientinnen mit Mammakarzinom oder anderen soliden Tumoren identifiziert [132-142]. Allerdings war bislang nicht bekannt, dass es sich bei dieser Region um eine frühe Aberration der Tumorprogression handelt. Die häufige Identifizierung dieser Region durch verschiedene Arbeitsgruppen könnte jedoch die Wichtigkeit der in dieser Region kodierten Gene für die Tumorprogression unterstreichen.

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation (Februar 2007) war die Lokalisation von 37 Genen in der identifizierten 6 Mbp Region bekannt. Diese Gene stellen somit alle potenzielle Tumorsuppressorgene dar. Durch Literaturrecherche und Analyse vorhandener Genexpressionsdaten wurden schließlich die zwei vielversprechendsten Kandidaten ausgewählt: *SASH1* und *PLAGL1*. Beide Gene sind bereits bei gynäkologischen Tumoren als Tumorsuppressorgene diskutiert worden [96, 97, 102, 143].

PLAGL1

Das Gen *PLAGL1* (Pleiomorphic adenoma gene-like protein 1) kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, welcher eine antiproliferative Wirkung durch Induktion einer p53-abhängigen Apoptose und Zellzyklusarrest ausübt [144-146]. Aufgrund dieser Funktion wird *PLAGL1* auch als *ZAC1* (englisch für Zinc-finger protein which regulates apoptosis and cell-cycle arrest 1) bezeichnet [144]. Ein weiterer Genname ist *LOT1* (für lost-on-transformation 1), da gezeigt wurde, dass *PLAGL1* in Karzinomen wie beispielsweise dem Mamma- oder Ovarialkarzinom häufig niederreguliert ist [96, 97, 147, 148]. Aber auch zahlreiche andere Tumore (z. B. Phäochromozytom oder Kopf-Hals-Karzinom) exprimieren *PLAGL1* vermindert [149, 150]. Da das maternale *PLAGL1*-Allel epigenetisch inaktiviert ist, also lediglich das väterliche Allel exprimiert wird, führt ein Allelverlust im väterlichen Allel zwangsweise zu einem Verlust der *PLAGL1*-Expression [151]. Eine andere Möglichkeit der Niederregulierung der *PLAGL1*-Expression stellt die CpG-Methylierung und Histondeacetylierung von *PLAGL1* des väterlichen Allels dar [143, 152]. Da bislang keine Mutationen durch genetische Analysen der kodierenden Region von *PLAGL1* detektiert wurden, wird vermutet, dass in Abwesenheit von

Allelverlusten in *PLAGL1* eine Niederregulierung nur durch eine gleichzeitige Methylierung und Histondeacetylierung verursacht werden kann [152].

Zudem wurde gezeigt, dass kein signifikanter Unterschied in der DNA-Methylierung bzw. Genexpression von *PLAGL1* zwischen Ovarialkarzinomen des Stadiums I und II im Vergleich zu den weiter fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV besteht. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass *PLAGL1* eine Rolle bei der initialen Transformation des Ovarialkarzinoms spielt [143]. Da die Disseminierung vermutlich bereits früh in der Tumorprogression stattfindet, könnte auch der Befund, dass der Metastasenpromotor „metastasis-related Methyltransferase 1“ (Merm1) durch Unterdrückung der *PLAGL1*-abhängigen Apoptose das Überleben von Tumorzellen in Blutgefäßen fördert, auf eine Rolle von *PLAGL1* in der frühen Tumorprogression hinweisen [153].

SASH1

Das durch *SASH1* kodierte Protein enthält die konservierten Proteindomänen SAM (Sterile Alpha Motif) und SH3 (Src Homology 3-Domäne). Aus diesem Befund leitet sich auch der Name „SAM and SH3 domain containing protein 1“ (kurz: *SASH1*) ab. SH3-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen durch die Bindung an prolinreiche Motive [154]. Sie spielen eine Rolle in der Regulierung von Enzymaktivitäten, bei der zellulären Lokalisation und der Verknüpfung von Signaltransduktionswegen [155]. Die SAM-Domäne ist ebenfalls meist an der Bildung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Es wurde berichtet, dass SAM-Domänen in der transkriptionellen Kontrolle sowie der posttranskriptionellen Regulierung durch RNA-Bindung involviert sind [156, 157]. Beide Domänen sind Bestandteile von Signaladapter-Molekülen, Transkriptionsfaktoren und Gerüstproteinen [155, 158].

Im Gegensatz zu *PLAGL1* ist kaum Literatur zu *SASH1* vorhanden. Die physiologische Funktion von *SASH1* konnte bislang noch nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings gibt es Hinweise, dass *SASH1* eine Rolle bei der Regulierung des Aktinzytoskeletts, z. B. über kleine GTPasen und Cortactin, spielt [159]. Die Rolle als Tumorsuppressor könnte somit über die Inhibierung der Migration und Invasion stattfinden. Des Weiteren wurde aufgrund der Lokalisation von *SASH1* und der Homologie zu Sly1 eine transkriptionsregulatorische Rolle vorgeschlagen [159, 160].

Wie schon bei *PLAGL1* konnten auch bei *SASH1* keine somatischen Mutationen bei Mammakarzinomen detektiert werden, die einen Funktionsverlust des Proteins zur Folge gehabt hätten [102]. Stattdessen wiesen Allelverlustanalysen auf eine Deletion des Gens beim Kolon-, Bronchial-, Pankreas- oder Mammakarzinom sowie in malignen Mesotheliomen hin [102, 161-164].

Die Deletion von SASH1/PLAGL1 in malignen und nicht malignen Mammaepithelzelllinien

Die Deletion sollte in einigen Mammakarzinomzelllinien und Primärtumoren vorhanden sein, falls sie eine Bedeutung bei der Tumorprogression des Mammakarzinoms hat. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) an TMA- (tissue microarrays) und Metaphasepräparaten etabliert und die Spezifität der generierten *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Sonden mit Chromosom 6-spezifischen (CEP6) Sonden auf Metaphasepräparaten von Normalblut (Abb. 6) sowie gesundem FFPE-Mammagewebe überprüft. Es wiesen ca. 7 % der untersuchten Patientinnen eine *SASH1*-Deletion in mindestens 80 % ihrer Primärtumorzellen auf. Die Zuverlässigkeit der verwendeten Sonden und somit der FISH-Ergebnisse dieser Arbeit wird dadurch unterstrichen, dass die detektierten Aberrationen der Zelllinien CAMA, T-47D, MCF7 und CAL51 mit Zhang et al. übereinstimmen [165]. Diese Arbeitsgruppe verwendete 6q24.2- und 6q24.3-spezifische Sonden, welche unter anderem mit den Genen *PLAGL1* bzw. *SASH1* hybridisieren. Mit diesen Sonden wurde, genau wie in dieser Dissertation, eine Deletion in CAMA und T-47D sowie ein balanziertes Verhältnis in MCF7, CAL51 und BT20 in Interphasen nachgewiesen. Die Zelllinien SK-BR-3 und Hs 578T wurden durch Zhang et al. nicht untersucht.

Interessanterweise ergab die FISH-Analyse der vorliegenden Arbeit der sieben Mammakarzinomzelllinien, dass unabhängig von der Detektion einer Deletion, Amplifikation oder Translokation sowohl *SASH1* als auch *PLAGL1* an der jeweiligen Aberration beteiligt waren. Auch die Analyse der DTCs von Mammakarzinompatientinnen und die geringe physikalische Distanz zwischen *SASH1* und *PLAGL1* weist darauf hin, dass diese beiden Gene meist gemeinsamer

Teil einer Aberration sind. Drei der sieben untersuchten Mammakarzinomzelllinien (CAMA, T-47D, Hs 578T) wiesen eine Deletion und eine Zelllinie (MCF7) eine Translokation der Gene *SASH1* und *PLAGL1* auf. Diese häufige Detektion einer *SASH1/PLAGL1*-Aberration in Mammakarzinomzelllinien verstärkt den Verdacht, dass diese beiden Gene für potenzielle Tumorsuppressoren beim Mammakarzinom kodieren. Lediglich in zwei Mammakarzinomzelllinien (CAL-51 und BT-20) wurde keine mit FISH detektierbare *SASH1*- oder *PLAGL1*-Aberration nachgewiesen. Trotzdem ist *PLAGL1* in allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien und *SASH1* in allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien außer in CAMA im Vergleich zu mikrodisektiertem Normalgewebe sowie der humanen Mammaepithelzelllinie hHME-tert niederreguliert (qPCR-Daten nicht gezeigt). Da sowohl *PLAGL1* als auch *SASH1* häufig durch epigenetische Mechanismen niederreguliert werden, ist somit nicht auszuschließen, dass die potenziellen Tumorsuppressorgene *SASH1* und *PLAGL1* auch in Mammakarzinomzelllinien ohne *SASH1/PLAGL1*-Aberration niederreguliert sind. Auch kann eine genetische Aberration auf einem völlig anderen Chromosom die Niederregulierung von *SASH1* oder *PLAGL1* verursachen, falls dadurch die Genexpression eines regulatorischen Proteins von *SASH1* bzw. *PLAGL1* verändert wird. So wurde z. B. berichtet, dass der Transfer von Chromosom 8 in CAL51-Zellen u. a. zu einer Überexpression von *PLAGL1* in der Hybridzelllinie im Vergleich zu der Parentalzelllinie führt [166].

Des Weiteren wurde im Zuge dieser Dissertation in ca. 40 % der untersuchten Zellen der nicht malignen Mammaepithelzelllinie hHME-tert eine Translokation detektiert, an welcher sowohl *SASH1* als auch *PLAGL1* beteiligt ist. Die Kombination von Spektraler Karyotypisierung, Painting- und Spot-FISH charakterisierte die komplexe Translokation als t(6;15;6) (Abb. 13). Durch ein Klonierungsexperiment wurden Zellklone mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation generiert, welche sich in ihrer *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression deutlich unterschieden ($p < 0,0001$). Die Ursache der *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung in den Zellklonen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation im Vergleich zu Zellen ohne diese Translokation blieb jedoch unklar, da aCGH-Analysen von zwei Zellklonen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-MT1 und HME-MT2) keine genomischen Verluste in *SASH1* oder *PLAGL1* zeigten (Abb. 17). Allerdings unterschieden sich die Genome von Zellklonen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation auch in anderen genomischen Aberrationen

(Vergleiche Abb. 11 und Abb. 12). Trans-regulatorische Elemente, welche *SASH1* und *PLAGL1* regulieren, könnten in den Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation verändert sein und somit eine Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* bewirken. Möglicherweise werden zudem cis-regulatorische Elemente (z. B. Enhancer) durch die Translokation räumlich von *SASH1/PLAGL1* getrennt, so dass sie ihre Funktion verlieren. Des Weiteren könnten epigenetische Modifikationen von *SASH1/PLAGL1* oder von Genen, welche *SASH1/PLAGL1* regulieren, die Niederregulierung verursachen und in den Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation unterschiedlich sein. Auch könnten *SASH1* und *PLAGL1* bzw. Regulatoren dieser Gene in einen heterochromatinen DNA-Bereich transloziert worden sein, was ebenfalls zu einer verminderten *SASH1*- bzw. *PLAGL1*-Expression führen würde.

Der Bruchpunkt der *SASH1/PLAGL1*-Translokation in hME-tert-Zellen könnte bei 6q12 liegen, da an dieser Stelle eine Deletion in der aCGH zu detektieren war und auch die SKY-Auswertung einen Bruchpunkt nahe des Zentromers vermuten lässt. Allerdings muss diese Abschätzung durch weitere Analysen (beispielsweise FISH) bestätigt werden, da Translokationen nicht zwingend mit einem DNA-Verlust am Bruchpunkt einhergehen.

SASH1 und PLAGL1 beeinflussen die Proliferation und die Stammzell- bzw. Progenitorzeleigenschaften von Mammaepithelzellen

Für eine funktionelle Charakterisierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* wurden HME-Zellklone ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation stabil mit Vektoren lentiviral transduziert, die shRNAmir-Sequenzen gegen eins der beiden Zielgene exprimieren. Es wurden Lenti- und keine Retroviren verwendet, da auf diese Weise auch gering proliferierende Zellen wie beispielsweise Stammzellen transduziert werden können. Pro Gen wurden mindestens zwei verschiedene shRNAmir verwendet. Durch den Einsatz unterschiedlicher shRNAmir-Sequenzen konnte überprüft werden, ob beobachtete Effekte aufgrund der Niederregulierung des Zielgens oder aufgrund der unspezifischen Niederregulierungen eines anderen Gens zustande kommen. Da ein unspezifischer Effekt bei der Anwendung von RNA-Interferenz häufig die Aktivierung des Interferon-Signalweges ist, musste sichergestellt werden, dass dieser Signalweg

nicht induziert wurde [167, 168]. Hierzu wurde die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung von *OAS1*, *OAS2* und *IFI6* durch qPCR durchgeführt, da die durch diese Gene kodierten Proteine an der Interferonbildung beteiligt sind und vermehrt bei RNA-Interferenz gebildet werden können [168]. Erst eine Erhöhung der Genexpression von Genen des Interferon-Signalweges um mehr als das Zweifache weist auf unspezifische Effekte hin [113]. In den transduzierten Zellen dieser Arbeit wurde nur eine etwa 1,4fach erhöhte Expression der Interferon-assoziierten Gene im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen nachgewiesen. Somit war sichergestellt, dass eine Verhaltensveränderung der transduzierten Zellen z. B. bezüglich der Proliferation oder des Überlebens auf der Niederregulierung des Zielgens und nicht der Aktivierung von Interferon-abhängigen Genen basiert.

Für die Bestimmung der Genexpression von *OAS1*, *OAS2* und *IFI6* sowie von *SASH1* und *PLAGL1* wurden die Referenzgene *PPIA*, *PUM1*, *TBP* und *HMBS* verwendet. Diese vier Gene wurden ausgewählt, da sie weder im Mammakarzinom noch nach lentiviraler Transduktion differentiell reguliert sind und keine Pseudogene nachgewiesen werden konnten. Um die Verlässlichkeit der in dieser Arbeit gemessenen Genexpressionswerte beurteilen zu können, wurde die errechnete *HER2*-mRNA-Expression von vier Zelllinien mit publizierten Proteinexpressionsdaten [112] verglichen. Dieser Vergleich ist berechtigt, da eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von *HER2*-mRNA und *HER2*-Protein bekannt ist [111]. Die Rangfolge der errechneten *HER2*-mRNA-Expression mit der publizierten *HER2*-Protein-Expression war dieselbe, so dass durch diesen Vergleich die Zuverlässigkeit der durch qPCR erhaltenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestärkt wirkt [112].

Zur Untersuchung der Funktion von *SASH1* bzw. *PLAGL1* standen der Vergleich von HME-Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-OT-Klone) und HME-Zellen mit dieser Translokation (HME-MT-Klone) zur Verfügung. Des Weiteren wurde der am langsamsten wachsende Zellklon ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-OT1) sowie der am schnellsten wachsende Zellklon ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-OT4) mit Lentiviren stabil transduziert, welche shRNAmir gegen *SASH1* bzw. *PLAGL1* exprimieren. Die lentivirale Transduktion von HME-OT1 bzw. HME-OT4 mit sh*PLAGL1*-A bzw. sh*PLAGL1*-B ermöglichte eine Niederregulierung von *PLAGL1* zwischen 47 % und 84 %. Durch *SASH1*-spezifische shRNAmir wurde die

SASH1-Expression um 37 % und 77 % im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen vermindert.

XTT- und PI-basierte Zellzyklusanalysen in dieser Arbeit zeigten, dass Zellklone mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation ein deutlich verstärktes Wachstum im Vergleich zu Zellklonen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation aufweisen (Unterschied an Tag 4: $p = 0,03$). Dieses Ergebnis wies auf eine Rolle von *SASH1* bzw. *PLAGL1* in der Regulierung der Proliferation hin. Tatsächlich zeigte sich sowohl im XTT-Assay als auch in der PI-basierten Zellzyklusanalyse meist eine verstärkte Proliferation nach einer lentiviralen Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1*. Die Stärke der Proliferationsinduktion nach *PLAGL1*-Niederregulierung schien dabei von dem verwendeten Zellklon abzuhängen: In HME-OT1 wurde die Proliferation durch beide *PLAGL1*-shRNA-Vektoren stark induziert, während in HME-OT4 nur nach Transduktion mit sh*PLAGL1*-B eine vermehrte Anzahl von Zellen in S-Phase im Vergleich zu der non-silencing-Kontrolle messbar war. Die Rolle von *PLAGL1* als Regulator der Proliferation wurde schon im Gehirn und der Hypophyse gezeigt und konnte somit bestätigt werden [144]. Der Einsatz von biologischen Replikaten sowie die Anwendung mehrerer shRNAs zeigte zudem reproduzierbar eine Induktion der Proliferation nach Niederregulierung von *SASH1*. So erniedrigte sich beispielsweise je nach verwendetem Zellklon (HME-OT1 bzw. HME-OT4) die Verdopplungszeit nach Transduktion mit sh*SASH1*-A bzw. sh*SASH1*-C zwischen 7 % und 18 %. Auch die durchflusszytometrische Bestimmung der S-Phase zeigte, dass der Anteil an proliferierenden Zellen sich nach Transduktion mit sh*SASH1*-A und sh*SASH1*-C um mindestens 6 bis höchstens 43 % erhöht.

Im Klonierungsexperiment zeigte sich, dass 81 % der neu generierten Zellklone statt der erwarteten 40 % eine *SASH1/PLAGL1*-Translokation aufwiesen ($p = 0,003$). Diese Beobachtung gab einen ersten Hinweis darauf, dass die durch die *SASH1/PLAGL1*-Translokation verursachte Niederregulierung dieser Gene neben einem Proliferations- auch einen Überlebensvorteil für die betroffenen Zellen unter Klonierungsbedingungen bewirkt. Ein zusätzlicher Effekt durch verminderte Apoptose ist eher unwahrscheinlich, da weder durch durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen ein Sub-G1-Gipfel noch durch eine DAPI-Färbung unfixierter Zellen apoptotische Zellen durchflusszytometrisch in dieser Arbeit nachgewiesen

werden konnten. Allerdings ist zu beachten, dass nicht alle Zelllinien einen Sub-G1-Gipfel ausbilden und apoptotische G2-Zellen einen reduzierten DNA-Gehalt aufweisen, der dem DNA-Gehalt einer G1-Zelle entspricht [169]. Zudem beeinflussen frühe Apoptosevorgänge nicht die Membranpermeabilität, welche durch eine DAPI-Färbung überprüft wird [169]. Somit kann durch die durchgeführten Analysen nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass *SASH1* und/oder *PLAGL1* Apoptose induzieren können. Des Weiteren ist es möglich, dass eine Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1* zusätzlich zur Proliferation andere nicht-apoptotische Zelltodprogramme vermindert, wie beispielsweise Nekrose, Autophagie, Seneszenz oder mitotische Katastrophe [170, 171].

Interessant ist die Beobachtung, dass die Stärke der Proliferationsinduktion in dieser Arbeit oft mit der Höhe der *SASH1*-Niederregulierung zusammenhängt. So proliferieren beispielsweise HME-OT1-Zellen nach Transduktion mit shSASH-A (59%ige Niederregulierung) und shSASH-C (72%ige Niederregulierung) mehr als nach Transduktion mit shSASH-B (37%ige Niederregulierung; Abb. 21; Abb. 22). Auch der Vergleich der Zellklone mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation zeigte, dass *SASH1* um mehr als 60 % im Vergleich zu HME-OT-Klonen niederreguliert sein musste, damit eine vermehrte Proliferation gemessen werden konnte (Abb. 26). Der Befund der dosisabhängigen Wirkung der *SASH1*-Expression zeigt einmal mehr, dass die „Two-Hit“-Hypothese von Knudson nicht für alle Tumorsuppressorgene anwendbar ist. Knudson nahm an, dass die Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressors und folglich der komplette Expressionsverlust des kodierten Tumorsuppressors für die Tumorprogression notwendig ist [172]. Das Phänomen der Haploinsuffizienz, welches beschreibt, dass die Expression eines Allels nicht ausreicht, um die normale Aktivität des Genprodukts in der Zelle auszuüben, wurde bereits für mehrere Tumorsuppressorgene beschrieben [173]. Der Effekt der tumorsupprimierenden Wirkung der Tumorsuppressorgene *TP53*, *PTEN* oder *CDKN1B* ist sogar abhängig von der Menge der Expression [174-177]. Folglich wurde vor kurzem das sogenannte „Kontinuum Modell“ vorgeschlagen, welches beschreibt, dass die Stärke des malignen Effekts umso höher ist, umso niedriger das Tumorsuppressorgen exprimiert wird [178]. Dabei muß zwischen Gendosis und Effekt kein linearer Zusammenhang bestehen.

Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit Hinweise erlangt wurden, dass die tumorsupprimierende Wirkung von *SASH1* dosisabhängig ist, kann die dosisabhängige Funktion eines Tumorsuppressors sich je nach genetischem Hintergrund eines Organismus und in verschiedenen Organen unterscheiden [178-180]. Auch ist noch nicht klar, ob eine verminderte Expression von *SASH1* zwar die frühe Karzinogenese ermöglicht, aber für die Tumorprogression, ähnlich wie bei *Smad4*, eine komplette Inaktivierung des *SASH1*-Gens notwendig ist [181].

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, zeigte Zeller eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen mit *SASH1*-Niederregulierung [182]. Allerdings ist zu beachten, dass die publizierten Ergebnisse von Zeller auf einer Transfektion von MCF 10A-Zellen basieren, während in dieser Arbeit hME-tert-Zellen verwendet wurden. Da beide Mammaepithelzelllinien aus unterschiedlichen Probanden generiert wurden, könnten die unterschiedlichen Ergebnisse auf der natürlich vorkommenden Varianz der Genexpression in unterschiedlichen Individuen basieren [183, 184]. Möglich ist auch, dass die von Zeller beobachtete Wachstumsverminderung nach Niederregulierung von *SASH1* aufgrund unspezifischer Effekte durch Einsatz zu hoher siRNA-Konzentrationen detektiert wurde. Im Gegensatz zur lentiviralen Transduktion der hME-tert-Zellen in dieser Arbeit transfizierte Zeller die MCF 10A-Zellen transient mit 100 nM siRNA. Dabei wurde gezeigt, dass die unspezifische Aktivierung und Repression von zahlreichen Genen konzentrationsabhängig erfolgt [185]. Bei der Verwendung von 100 nM siRNA wurden mehrere unspezifische Effekte detektiert, was unter anderem zu einer Induktion von zellzyklusinhibierenden und proapoptotischen Genen (z. B. *GADD45* und *BAK1*) führte [185, 186]. Des Weiteren wurde durch Zeller, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, nicht überprüft, ob der Interferon-Signalweg aktiviert wurde. Letzterer kann jedoch unter anderem zu einer antiproliferativen Wirkung und Stimulation der Apoptose führen [187, 188]. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die *SASH1*-Expression während der Durchführung des publizierten XTT-Versuches durch Zeller noch ausreichend vorhanden war. Die Niederregulierung durch die verwendeten siRNAs wurde durch Zeller 48 h nach Transfektion kontrolliert, Unterschiede in der Proliferation aber erst 72 h nach Transfektion mit siRNA detektiert. Dabei war in mindestens einer der verwendeten siRNAs eine Reexpression von *SASH1* nach 72 h messbar. Zudem ist unklar wie

viele Replikate durchgeführt wurden. Bei der Durchführung der biologischen Replikate in dieser Arbeit konnte jedoch wiederholt ein Unterschied des Zellverhaltens in verschiedenen Zellpassagen beobachtet werden. Des Weiteren wurde berichtet, dass die Generierung von SASH1-überexprimierenden Mammazelllinien misslang [182]. Ein möglicher Grund hierfür könnte die stark antiproliferative Wirkung des SASH1-Proteins in Mammaepithelzellen sein, so dass stabile Klone einen starken Wachstumsnachteil gegenüber nicht-transduzierten Zellen aufweisen. Auch die transiente sowie stabile SASH1-Überexpression in humanen Melanozyten resultierten in zytotoxischen Effekten [182]. Im Zusammenhang mit der zuvor vermuteten dosisabhängigen Funktionsweise ist es aber auch möglich, dass die proliferationsfördernde bzw. -inhibierende Wirkung von der SASH1-Konzentration abhängt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei SASH1 wie bei PLAGL1 um Tumorsuppressoren handelt, welche in Mammaepithelzellen die Proliferation inhibieren können und daher bei verminderter Expression zu einem Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen führen. Interessant ist dabei der Befund dieser Dissertation, dass die SASH1-Lokalisation in der untersuchten Mammakarzinomzelllinie abhängig vom Zellzyklus war: SK-BR-3-Zelllinien, welche zur Proliferation angeregt wurden, wiesen vermehrt SASH1 im Zellkern im Vergleich zu weniger proliferierenden SK-BR-3-Zellen auf ($p = 0,0008$). Das SASH1-homologe Protein SLy1 kann ebenfalls im Zytoplasma oder Zellkern lokalisiert sein. Dabei ist u. a. die Kernlokalisation für die korrekte Ausführung der SLy1-Funktion bei der adaptiven Immunantwort notwendig [160]. Die proliferationsinhibierende Wirkung von SASH1 kann vermutlich ebenfalls nur stattfinden, wenn SASH1 im Nukleus lokalisiert ist. Diese Hypothese stimmt mit der vorgeschlagenen Rolle von SASH1 als Regulator der Transkription überein [159].

Die Translokation von SASH1 in den Kern findet möglicherweise erst nach posttranslationaler Modifikation von SASH1 statt. Tatsächlich wurde durch Dubois et al. gezeigt, dass nach Stimulation der Zellen mit Phorbol ester phosphoryliertes SASH1 durch das Protein 14-3-3-s gebunden wird [189]. Denkbar ist, dass durch diese Interaktion 14-3-3-s eine Konformationsänderung in SASH1 verursacht, so dass die Translokation von SASH1 in den Kern ermöglicht wird. Zudem wurde

berichtet, dass die Phosphorylierung von SASH1 in einer dosisabhängigen Weise nach Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung stattfindet [190]. Somit ist folgendes Modell denkbar: Wachstumsfördernde Stimuli oder tumorfördernde Schäden führen zur konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von SASH1. Diese posttranslationelle Modifikation führt direkt oder indirekt über Proteine wie z. B. 14-3-3-s zu einer Konformationsänderung, welche eine Translokation in den Kern von SASH1 ermöglicht. Dadurch werden im Nukleus Gene verstärkt transkribiert, welche u. a. die Proliferation der Zelle inhibieren.

Die Abhängigkeit der SASH1-Lokalisation vom Proliferationsstatus der Zelle scheint im Kolorektalkarzinom nicht vorzuliegen, da in getesteten kolorektalen Zelllinien sich die Lokalisation von endogenem SASH1 nicht durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen (Abwesenheit von Serum, Restimulation) veränderte [159]. Die Arbeitsgruppe Janssen (TU München) zeigte zudem, dass die Überexpression von SASH1 durch Transfektion der epithelialen Zelllinien HEK293 und HeLa mit V5-markierten SASH1-Konstrukten möglich ist [159]. Das Volllängen-SASH1-Protein wies dabei eine vorwiegende zytosolische Lokalisation und eine Anreicherung in F-Aktin-reichen, membrannahen Strukturen der Zellen auf. Durch weitere Versuche wurde gezeigt, dass SASH1 eine Rolle in der Zellmigration ausübt. Dabei gibt es Hinweise, dass eine Niederregulierung von SASH1 eine erhöhte Rap1A-Transkription bewirkt. Diese verstärkte Rap1A-Transduktion führt über einen bislang unbekannten Mechanismus zu einer Rac1-abhängigen verringerten Zelladhäsion [159].

Trotz der vermuteten Rolle von SASH1 in der Migration bei kolorektalen Zellen konnte in dieser Arbeit keine deutlich erhöhte Migration in HME-OT-Zellen detektiert werden, in denen *SASH1* niederreguliert worden war. Allerdings ist zu beachten, dass für die Migration ein definiertes Maß an aktiviertem Rac1 nötig ist, d. h. ein zu hoher bzw. ein zu niedriger Gehalt an aktivem Rac1 die Migration inhibiert [191]. Möglicherweise war die Niederregulierung von *SASH1* in der vorliegenden Arbeit zu stark oder zu schwach, so dass die für die Migration notwendige Rac1-Menge nicht vorlag. Fasst man jedoch die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zur physiologischen Rolle von SASH1 aus dieser Arbeit mit den publizierten Daten von Zeller und Martini zusammen, ist es ebenfalls möglich, dass die Funktion von SASH1 vom Zelltyp abhängt.

Die Transduktion von HME-OT1-Zellen mit shPLAGL-A verursachte trotz der interexperimentell hohen Streuung eine deutlich verstärkte Migration der transduzierten Zellen im Vergleich zur non-silencing-Kontrolle ($p = 0,04$) sowie das stärkste Invasionsverhalten unter den stabil transduzierten Klonen. Dieser Befund ist konsistent mit den Hinweisen, dass PLAGL1 eine Rolle bei der Invasion im Zervixkarzinom spielt, da es in invasiven Ovarialkarzinomen im Vergleich zu *in situ* Karzinomen niederreguliert ist [192].

Nach Niederregulierung von *SASH1* wurde eine vermehrte Sphärenbildung detektiert (Abb. 39). Da nur Stamm- und Progenitorzellen in den verwendeten niedrig adhäsiven Wachstumsbedingungen zur Sphärenbildung überleben, bestehen Mammosphären vermehrt aus Stamm- und Progenitorzellen [193]. Somit liegt nahe, dass *SASH1* neben der Proliferation und Migration auch die Stammzell- bzw. Progenitoreigenschaften von Zellen beeinflusst. Da Metastasenvorläuferzellen die Eigenschaft der Selbsterneuerung und Bildung einer unbegrenzten Anzahl an Tochterzellen mit Stamm- bzw. Progenitorzellen teilen, weist dieser Befund darauf hin, dass eine Niederregulierung von *SASH1* die Metastasierung begünstigt. Des Weiteren weisen die Sphärenversuche darauf hin, dass Zellen mit einer verminderten *SASH1*-Expression eine erhöhte Resistenz gegenüber Anoikis (programmierter Zelltod aufgrund von fehlendem Zell-Matrix-Kontakt) aufweisen. Die Resistenz gegenüber Anoikis ist ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Metastasierung von Tumorzellen [194]. Somit könnte die frühe Niederregulierung von *SASH1* in der Tumorprogression von Vorteil für die erfolgreiche Disseminierung von Tumorzellen sein.

Auch die lentivirale Niederregulierung von *PLAGL1* (v. a. durch shPLAGL-B) führte zu einer vermehrten Sphärenbildung im Vergleich zur non-silencing-Kontrolle. Somit könnte auch *PLAGL1* das Stammzell- bzw. Progenitorzellpotenzial sowie die Anoikisresistenz beeinflussen. Diese Beobachtung sowie der Bericht, dass der Metastasenpromotor Merm1 durch Unterdrückung der *PLAGL1*-abhängigen Apoptose das Überleben von Tumorzellen in Blutgefäßen fördert, bestärkt die Rolle von *PLAGL1* in der Metastasierung [153].

SASH1 und PLAGL1 regulieren zelluläre Kooperation über parakrine und zelluläre Mechanismen

Zellklone ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation haben zwar einen Wachstumsnachteil im Vergleich zu Zellklonen mit dieser Translokation, sind aber in der Parentalzelllinie zu 60 % vorhanden. Zudem erhöhte die Behandlung eines Zellklons ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-OT1) mit konditioniertem Medium von Zellklonen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation (HME-MT1 bzw. HME-MT2) oder der Parentalzelllinie hHME-tert den Anteil an proliferierenden Zellen (Spannweite der mittleren Erhöhung: 5 – 47 %). Daraus lässt sich schließen, dass Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation einen Faktor sezernieren, der das Wachstum von Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation stimuliert. Bei Behandlung der HME-OT1-Zellen mit konditioniertem Medium von stabil transduzierten HME-OT-1 wurde die Proliferation nur bei Behandlung der Zellen mit konditioniertem Medium von HME-OT1 nach Transduktion mit shSASH-C (33 %), shPLAGL-A (18 %) und shPLAGL-B (43 %) induziert. Da das konditionierte Medium von Zellen, welche mit shSASH-A bzw. shSASH-B transduziert wurden, keine vermehrte Proliferation in HME-OT1-Zellen induzierte, ist möglicherweise die Menge des sekretierten Faktors dosisabhängig von der *SASH1*-Expression, nicht aber von der *PLAGL1*-Expression. Des Weiteren ist zu beachten, dass bei Verwendung von konditioniertem Medium von Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation eine geringere interexperimentelle Varianz als bei Verwendung von konditioniertem Medium von stabil transduzierten Zellen auftrat. Möglicherweise besitzen *SASH1* und *PLAGL1* einen synergistischen Effekt, so dass bei gleichzeitiger Niederregulierung von *SASH1* und *PLAGL1* jener Faktor, der das Wachstum von Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation stimuliert, in konstant hohem Niveau sekretiert wird. Zur Aufklärung dieser Hypothese ist es von Vorteil, *SASH1* und *PLAGL1* gleichzeitig niederzuregulieren. Möglicherweise potenziert sich bei einer simultanen Niederregulierung dieser zwei Gene auch die Induktion der Proliferation und Migration/Invasion.

Die Versuche mit konditioniertem Medium wurden in hHME-tert-Zellklonen durchgeführt. Da die Parentalzelllinie hHME-tert keine Östrogenrezeptor- und HER2-Expression aufweist und des Weiteren durch Genexpressionsanalysen als basal klassifiziert wurde [195], könnte die parakrine Stimulation der Proliferation zwischen

Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung in Patientinnen mit basalen Tumoren stattfinden. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass in dieser Arbeit trippelnegative Primärtumore (keine Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression, keine HER2-Überexpression) mit einer heterogenen Verteilung der *SASH1*-Deletion innerhalb eines Tumors in der Regel stärker proliferieren als trippelnegative Primärtumore mit klonaler *SASH1*-Deletion ($p = 0,014$). Da bei Analyse der FISH-Daten von anderen Mammakarzinomsubtypen kein Hinweis für eine zelluläre Kooperativität nachgewiesen werden könnte, ist möglicherweise die zelluläre Kommunikation zwischen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung spezifisch für basale bzw. trippelnegative Mammakarzinome.

Die Sphärenanzahl war jeweils höher in der Kokultur (HME-OT1 kokultiviert mit stabil transduziertem HME-OT1-Klon) als in der entsprechenden Monokultur. Somit wurden durch die Kokulturexperimente dieser Arbeit Hinweise darüber erlangt, dass eine Kooperation zwischen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung das Stammzell- und Progenitorzellpotenzial der entsprechenden Zellen erhöht. Diese Kooperation könnte parakrin aufgrund der Sekretion eines bestimmten Faktors stattfinden. Allerdings ist zu bedenken, dass alle detektieren Sphären Gemische aus beiden Zelltypen waren (Abb. 44). Dies deutet darauf hin, dass die direkte Interaktion zwischen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung das Sphärenwachstum stimuliert.

Die Kommunikation zwischen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung könnte für die initialen Phasen der Tumorprogression erforderlich sein, da zu Beginn der Tumorprogression neben den aberranten Zellen noch viele nicht aberrante Zellen vorhanden sind. Die Daten dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese, da durch die Koexistenz von verschiedenen Tumorzellpopulationen die Proliferation sowie das Stammzell- bzw. Progenitorpotenzial von Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederegulierung erhöht wird. Somit könnte die genetische Heterogenität eines Tumors bedeutsam für die Tumorprogression sein. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass die Interaktion zwischen zwei oder mehr phänotypisch unterschiedlichen Klonen zu einem Phänotyp führt, welcher maligner als die einzelnen Phänotypen ist. Diese sogenannte interklonale Kooperativität wurde erstmals in der metastatischen Rattenmammakarzinomzelllinie BC1 gezeigt [196,

197]. Nur in Anwesenheit des epithelialen und des metaplastischen Zellklons dieser Zelllinie wird das Enzym Kollagenase sekretiert. Kollagenase ist zum Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) notwendig. Somit könnte diese Art der interklonalen Kooperativität zu einer verstärkten Migration und Invasion und letztlich Metastasierung von Tumorzellen führen. Auch wurde für die Hamsterkarzinomzelllinie HCPC-1 gezeigt, dass die Kooperation von sogenannten „EMT-Zellen“ (Zellen, in denen die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) induziert wurde) mit „non-EMT-Zellen“ für die Metastasierung notwendig ist. EMT-Zellen degradieren dabei die umgebende extrazelluläre Matrix und penetrieren Lymph- bzw. Blutgefäße, so dass sie die Migration und Intravasation von „non-EMT-Zellen“ erleichtern. Im Gegensatz zu den „EMT-Zellen“ können allerdings nur „non-EMT-Zellen“ extravadiieren, so dass nur bei gleichzeitigem Vorhandensein beider Zellarten Metastasierung stattfindet [198]. Zudem ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche Migration und Invasion von Tumorzellen das Überleben der Tumorzellen nach Abspaltung von der Primärläsion sowie die Generierung einer unbegrenzten Anzahl an Tochterzellen. Durch die Sphärenversuche dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Stammzell/Progenitorzellpotenzial sowie die Anoikisresistenz in Zellen ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung durch Zellen mit dieser Niederregulierung induziert werden kann. Somit könnte die in dieser Arbeit nachgewiesene interklonale Kooperativität einen Beitrag zur verbesserten Metastasierung von Zellen leisten. Neben dem Einfluss der interklonalen Kooperativität auf die Migration wurde diskutiert, dass genetisch divergierende Tumorzellen kooperieren, um durch den gegenseitigen Austausch von verschiedenen Zytokinen zu verhindern, vom Immunsystem erkannt zu werden [199]. Die durchgeführten Experimente dieser Arbeit geben erste Hinweise darauf, dass die Kooperation unterschiedlicher Tumorzellen nicht nur die Metastasierung und die Erkennung durch das Immunsystem, sondern auch die Proliferation beeinflussen kann. Allerdings muss die Bedeutung dieser Befunde noch durch weitere Versuche geklärt werden.

Die SASH1/PLAGL1-Deletion in Primärtumorproben von Mammakarzinompatientinnen und der klinische Verlauf

Um weitere Hinweise dafür zu erhalten, dass *SASH1* bzw. *PLAGL1* eine Rolle in der Progression des Mammakarzinoms spielen, sollte das Vorhandensein einer *SASH1*-Deletion in Primärtumoren von Mammakarzinompatientinnen in Zusammenhang mit relevanten klinischen Parametern gesetzt werden. Somit wurde die FISH auf TMAs aus FFPE-Primärtumorgewebe etabliert. Das verwendete Kollektiv ist dabei repräsentativ für Mammakarzinompatientinnen, da bekannte prognostische Faktoren [200, 201] wie z. B. ein positiver Nodalstatus ($p < 0,001$), ein hoher Differenzierungsgrad ($p = 0,05$) und eine große Primärtumorgröße ($p = 0,061$) mit einem erhöhten Risiko zu Versterben assoziiert waren (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des gleichzeitigen Auftretens einer *SASH1*-Deletion mit einer *PLAGL1*-Deletion in den untersuchten Mammakarzinomzelllinien liegt es nahe, dass die Patientinnen mit einer überwiegenden *SASH1*-Deletion auch eine *PLAGL1*-Deletion aufweisen. Auch sind diese beiden Gene wahrscheinlich in DTC meist kodeletiert [94]. Somit ist es wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit gefundenen Assoziationen zwischen klinischen Parametern und einer *SASH1*-Deletion auch für *PLAGL1* gültig sind.

Es zeigten 7 % der 97 untersuchten Patientinnen eine klonale (in mindestens 80 % der untersuchten Tumorzellen) *SASH1*-Deletion. Passend zu den zuvor generierten *in vitro* Daten, stellte sich heraus, dass die klonale *SASH1*-Deletion mit einer verstärkten Proliferation assoziiert ist ($p = 0,080$). Des Weiteren wiesen die Primärtumoren von Patientinnen mit einer klonalen *SASH1*-Deletion vermehrt einen hohen Differenzierungsgrad auf. Dabei ist der Differenzierungsgrad mit einem schlechten Verlauf assoziiert: Je höher der Differenzierungsgrad ist, desto weniger differenziert sind die Tumorzellen und desto geringer ist die Überlebenswahrscheinlichkeit für den Patienten [11]. Interessanterweise bewirkte die lentivirale Niederregulierung von *SASH1* eine verstärkte Sphärenbildung. Da Sphären vermehrt aus Stammzellen und den wenig differenzierten Progenitorzellen bestehen, kann auch die Assoziation der *SASH1*-Deletion in Patienten mit einem erhöhten Differenzierungsgrad mit den *in vitro* Daten erklärt werden. Allerdings gibt es auch gegensätzliche Befunde. Zeller zeigte eine hohe *SASH1*-Expression in

Mammakarzinomen mit hohem Differenzierungsgrad während gut bzw. mäßig differenzierte Primärtumore eine verminderte *SASH1*-Expression aufwiesen [182]. Für diese Analyse wurde aber der kommerziell in Auftrag gegebene Antikörper E303976 verwendet, welcher in Western Blot-Analysen mangelnde Spezifität zeigte [182].

Allerdings wurde auch berichtet, dass im Basaliom, einem relativ undifferenzierten Tumor, ein Verlust der *PLAGL1*-Expression detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu war in dem differenzierteren Plattenepithelkarzinom der Haut die *PLAGL1*-Expression weiterhin vorhanden [98]. Somit könnte in Mammakarzinomen sowohl eine fehlende *SASH1*- als auch *PLAGL1*-Expression zu einer schlechten Differenzierung des Tumors beitragen.

Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen der *SASH1*-Deletion und einem verkürzten metastasefreien Überleben nachgewiesen werden. Patientinnen mit einer klonalen *SASH1*-Deletion in den untersuchten Primärtumorzellen, wiesen im Vergleich zu Patientinnen mit einer selteneren *SASH1*-Deletion in den untersuchten Primärtumorzellen ein dreifach erhöhtes Risiko auf, eine Metastase zu entwickeln ($p = 0,04$). Allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der *SASH1*-Deletion und einem verminderten Überleben gefunden werden. Dies ist möglicherweise folgendermaßen zu erklären: Patienten mit einer klonalen *SASH1*-Deletion in ihren Primärtumoren entwickeln häufiger eine Metastase als Patienten die eine heterogene Verteilung der *SASH1*-Deletion in ihren Primärtumoren aufweisen. Diese Metastasen mit klonaler *SASH1*-Deletion wachsen jedoch langsamer als Metastasen mit einer heterogenen Verteilung der *SASH1*-Deletion, so dass die tödliche Tumorlast erst später erreicht wird. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine interklonale Kooperativität zwischen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung die Proliferation stimuliert.

Untersucht man ausschließlich Mammakarzinompatientinnen mit einem luminalen (ER- und/oder PR-positivem) Primärtumor, ist der Einfluss der *SASH1*-Deletion auf ein vermindertes metastasefreies Überleben noch größer als nach Untersuchung aller Patientinnen. Patientinnen mit lumbalem Mammakarzinom und einer überwiegenden *SASH1*-Deletion in ihren Primärtumorzellen wiesen ein fast 39,5fach

erhöhtes Risiko für eine Metastase im Vergleich zu den restlichen Patientinnen auf. Der luminal Subtyp ist bezogen auf das Überleben und molekularbiologisch sehr heterogen [16, 17, 202, 203]. Möglicherweise repräsentieren die Patienten mit luminalen Tumoren und häufiger *SASH1*-Deletion jene Patienten, welche innerhalb der Patienten mit luminalen Tumoren eine schlechtere Prognose aufweisen.

Die *SASH1*-Deletion war zudem reproduzierbar in Patientinnen mit trippelnegativen (negativ für ER und PR sowie keine HER2-Überexpression) Primärtumoren vermehrt nachzuweisen. Möglicherweise kann dieser Befund damit erklärt werden, dass bei Deletion von *SASH1* häufig auch das ca. 3 Mbp entfernt liegende Gen für den Östrogenrezeptor (*ESR1*) kodeletiert ist. Dies könnte bedeuten, dass sich trippelnegative Tumore in zwei biologische Subtypen einteilen lassen, je nachdem ob der Östrogenrezeptor aufgrund der Deletion des Gens oder epigenetische Mechanismen vermindert exprimiert wird.

Der Befund, dass die *SASH1*-Deletion vermehrt in trippelnegativen Tumoren vorhanden ist, steht im Widerspruch zu den publizierten Daten von Zeller, die eine verminderte ER- bzw. PR-Expression bei zunehmender *SASH1*-Expression zeigte [182]. Eine mögliche Begründung für diese divergierenden Ergebnisse ist, dass eine vorhandene *SASH1*-Deletion nicht zwingend mit einer verminderten *SASH1*-Expression korrelieren muss. Allerdings wurde zur Erhebung der Expressionsdaten durch Zeller der in Western Blot-Analysen unspezifische Antikörper E303976 verwendet. Des Weiteren untersuchte Zeller ein kleineres (n = 47) Kollektiv, während in dieser Arbeit insgesamt 127 Primärtumore analysiert wurden.

Bei der Untersuchung der trippelnegativen Tumore wurde in dieser Arbeit kein signifikant vermehrtes Auftreten der *SASH1*-Deletion mit basalen (ER- und PR-negativ, keine HER2-Amplifikation sowie CK5/6 und/oder EGFR positiv) im Vergleich zu fünffach negativen (ER- und PR-negativ, keine HER2-Amplifikation sowie CK5/6 und EGFR negativ) Tumoren des untersuchten Kollektivs gefunden. Primärtumore mit einer klonalen *SASH1*-Deletion zeigten allerdings eine leicht verstärkte EGFR Expression im Vergleich zu heterogenen Tumoren. Experimentell konnte diese Tendenz bestätigt werden, indem HME-OT1-Zellen, welche mit shSASH-B transduziert wurden, eine erhöhte EGFR-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen. Allerdings führte die Transduktion mit shSASH-A oder shSASH-C, welche

SASH1 effizienter niederregulieren, zu keiner Erhöhung der EGFR-Expression. Folglich könnte ein subtiler Gendosis-Effekt für diese Beobachtung verantwortlich sein. Eine dosisabhängige Regulierung der EGFR-Expression wurde schon für EGF und Calcitriol berichtet [204, 205]. Diese Hypothese muss allerdings noch durch weitere Versuche überprüft werden. Des Weiteren wurde publiziert, dass die *PLAGL1*-Expression durch den EGFR-Signalweg reguliert wird, da durch die Behandlung der Ovarialepithelzelllinie ROSE mit EGF bzw. TGF-alpha (Liganden des EGFR) die *PLAGL1*-Expression in den behandelten Zellen vermindert wird [206]. Denkbar ist nun das Vorhandensein eines Feedbackmechanismus, so dass es bei *PLAGL1*-Niederregulierung auch zu einer erhöhten EGFR-Expression kommt. Diese Hypothese konnte in den *in vitro* Versuchen allerdings nicht bestätigt werden.

Die Parentalzelllinie hHME-tert wies die höchste EGFR-Expression auf, wohingegen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Translokation deutlich weniger EGFR exprimierten. Daher ist es möglich, dass eine Niederregulierung von *SASH1* nur in Kombination mit Zellen ohne *SASH1*-Niederregulierung zu einer verstärkten EGFR-Expression führen. Diese Hypothese ließe sich durch einen Experiment mit konditioniertem Medium (Durchführung wie bei den Zellzyklusanalysen) untersuchen.

Ein synergistischer Effekt auf die Tumorprogression bei einer gleichzeitigen Niederregulierung von *SASH1* und *PLAGL1* ist aufgrund zahlreicher Beobachtungen denkbar: Beide Gene sind in DTCs und Zelllinien oft kodeletiert und werden des Weiteren am stärksten in luminalen Zellen exprimiert [97, 182]. Zudem war der proliferationsfördernde Effekt des konditionierten Mediums von Zellen mit *SASH1/PLAGL1*-Translokation eindeutiger als eine einzelne Niederregulierung von *SASH1* bzw. *PLAGL1*. Schließlich wurden ähnliche Funktionen für beide Proteine nachgewiesen (z. B. bei Differenzierung, Migration und Proliferation).

Falls sich durch weitere Studien die Rolle von *SASH1* und *PLAGL1* in der Progression des Mammakarzinoms bestätigen, könnten die zugrunde liegenden Signalwege ein vielversprechendes Therapieziel darstellen. Dies ist vor allem für die Patientinnen mit trippelnegativem Mammakarzinom von Bedeutung, da die *SASH1* (und vermutlich auch *PLAGL1*)-Deletion in trippelnegativen Patientinnen am häufigsten detektiert werden konnte. Auch für Patientinnen mit luminalem Mammakarzinom könnte die weitere Aufklärung der Rolle von *SASH1* und *PLAGL1*

wichtig sein, da Patientinnen mit luminalem Mammakarzinom und klonaler *SASH1*-Deletion eine besonders schlechte Prognose aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit Hinweise für die Rolle von *SASH1* und *PLAGL1* in der frühen Progression und Disseminierung des Mammakarzinoms erlangt werden konnten. Beide Gene induzieren bei Niederregulierung eine verstärkte Proliferation, Anoikisresistenz und die Stammzell- bzw. Progenitoreigenschaften in Mammaepithelzellen. Falls diese Ergebnisse durch weitere Versuche bestätigt werden können, ist es denkbar, dass die verminderte Expression von *SASH1* und *PLAGL1* zunächst den jeweiligen Zellen einen Selektionsvorteil durch die Induktion der Proliferation vermittelt. Auch könnte die interklonale Kooperativität zwischen Zellen mit und ohne *SASH1/PLAGL1*-Niederregulierung bedeutsam während der frühen Mammakarzinogenese sein. Des Weiteren könnte die frühe Niederregulierung von *SASH1* und *PLAGL1* zur Anoikisresistenz und Erhöhung des Stammzell- bzw. Progenitorpotenzials von Tumorzellen beitragen. Auf diese Weise wird die Disseminierung der jeweiligen Zellen in sekundäre Organe wie dem Knochenmark oder Lymphknoten sowie das Überleben der Zellen und die Metastasenbildung in diesen ektopen Orten gefördert. Diese Hypothese ist konsistent mit dem Befund dieser Arbeit, dass eine *SASH1*-Deletion mit einem erhöhten Risiko, eine Metastase zu entwickeln, einhergeht. Des Weiteren besteht vermutlich ein Zusammenhang zwischen einem Fehlen der Gene und schlecht differenzierten und stark proliferierenden Mammakarzinomen. Auch wenn noch weitere Versuche zur Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit durchgeführt werden müssen, trägt diese Arbeit somit zur Aufklärung der Biologie des Mammakarzinoms bei.

Literaturverzeichnis

1. *Tumorregister München (TRM)*. 2009; Available from: www.tumorregister-muenchen.de.
2. Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, e.V. *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. 7. Ausgabe. 2010, Berlin.
3. Hiripi, E., et al., *Survival from common and rare cancers in Germany in the early 21st century*. Ann Oncol, 2011.
4. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html.
5. Stabenow R., *Epidemiologie des Brustkrebs beim Mann*, Gemeinsames Krebsregister (GKR) 2005.
6. Struewing, J.P., et al., *The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews*. N Engl J Med, 1997. **336**(20): p. 1401-8.
7. Ford, D., et al., *Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(3): p. 676-89.
8. Armstrong, K., A. Eisen, and B. Weber, *Assessing the risk of breast cancer*. N Engl J Med, 2000. **342**(8): p. 564-71.
9. Weigelt, B., F.C. Geyer, and J.S. Reis-Filho, *Histological types of breast cancer: how special are they?* Mol Oncol, 2010. **4**(3): p. 192-208.
10. Rack B., et al., *Mammakarzinome-Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. 2009, München: Tumorzentrum München.
11. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *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, 1991. **19**(5): p. 403-10.
12. Ignatiadis, M. and C. Sotiriou, *Understanding the molecular basis of histologic grade*. Pathobiology, 2008. **75**(2): p. 104-11.
13. Weigelt, B. and J.S. Reis-Filho, *Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?* Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(12): p. 718-30.
14. Ellis P., E., ed. *WHO classification of tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, ed. Tavassoéli F.A. and Devilee P. 2003, Lyon Press: Lyon.
15. Louwman, M.W., et al., *Uncommon breast tumors in perspective: incidence, treatment and survival in the Netherlands*. Int J Cancer, 2007. **121**(1): p. 127-35.
16. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
17. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
18. Farmer, P., et al., *Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis*. Oncogene, 2005. **24**(29): p. 4660-71.
19. Hu, Z., et al., *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 96.
20. Herschkowitz, J.I., et al., *Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors*. Genome Biol, 2007. **8**(5): p. R76.
21. Bombonati, A. and D.C. Sgroi, *The molecular pathology of breast cancer progression*. J Pathol, 2011. **223**(2): p. 307-17.
22. Li, H., X. Fan, and J. Houghton, *Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 805-15.
23. Burstein, H.J., et al., *Ductal carcinoma in situ of the breast*. N Engl J Med, 2004. **350**(14): p. 1430-41.

24. Tumorzentrum München: Mammakarzinome-Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2009: W. Zuckerschwerdt Verlag.
25. Lu, J., et al., *Breast cancer metastasis: challenges and opportunities*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 4951-3.
26. Braun, S., et al., *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. N Engl J Med, 2000. **342**(8): p. 525-33.
27. Wallgren, A., et al., *Risk factors for locoregional recurrence among breast cancer patients: results from International Breast Cancer Study Group Trials I through VII*. J Clin Oncol, 2003. **21**(7): p. 1205-13.
28. Klein, G., *Foulds' dangerous idea revisited: the multistep development of tumors 40 years later*. Adv Cancer Res, 1998. **72**: p. 1-23.
29. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
30. Klein, C.A., *Parallel progression of primary tumours and metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 302-12.
31. Klein, C.A., *Gene expression signatures, cancer cell evolution and metastatic progression*. Cell Cycle, 2004. **3**(1): p. 29-31.
32. Kufe DW, P.R., Weichselbaum RR, *Cancer Medicine 6th edition*: Holland-Frei.
33. Sanchez-Munoz, A., et al., *Targeted therapy of metastatic breast cancer*. Clin Transl Oncol, 2009. **11**(10): p. 643-50.
34. Kahlert S., et al., *Mammakarzinome-Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Adjuvante Systemtherapie*. 2009, München: Tumorzentrum München.
35. Denkert, C., et al., *Anti-cancer immune response mechanisms in neoadjuvant and targeted therapy*. Semin Immunopathol, 2011.
36. Blech J., et al., *Schlicht obszön*. Spiegel, 2010. **20**.
37. Arteaga, C.L. and J. Baselga, *Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them?* Cancer Cell, 2004. **5**(6): p. 525-31.
38. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 793-802.
39. Pantel, K., R.J. Cote, and O. Fodstad, *Detection and clinical importance of micrometastatic disease*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(13): p. 1113-24.
40. Fehm, T., et al., *A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation*. Cancer, 2006. **107**(5): p. 885-92.
41. Schardt, J.A., et al., *Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 227-39.
42. Schmidt-Kittler, O., et al., *From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7737-42.
43. Husemann, Y., et al., *Systemic spread is an early step in breast cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 58-68.
44. NCBI UniGene. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene.
45. National Cancer Institute: Cancer Genetic Markers of Susceptibility (CGEMS) 2007; Available from: <http://cgems.cancer.gov/>.
46. NCBI Pubmed. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
47. Adeyinka, A., et al., *Analysis of gene expression in ductal carcinoma in situ of the breast*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(12): p. 3788-95.
48. Ayers, M., et al., *Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(12): p. 2284-93.

49. Bertucci, F., et al., *Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy*. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8558-65.
50. Desai, K.V., et al., *Initiating oncogenic event determines gene-expression patterns of human breast cancer models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 6967-72.
51. Dolled-Filhart, M., et al., *Classification of breast cancer using genetic algorithms and tissue microarrays*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6459-68.
52. Fan, M., et al., *Diverse gene expression and DNA methylation profiles correlate with differential adaptation of breast cancer cells to the antiestrogens tamoxifen and fulvestrant*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11954-66.
53. Fournier, M.V., et al., *Gene expression signature in organized and growth-arrested mammary acini predicts good outcome in breast cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7095-102.
54. Gianni, L., et al., *Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(29): p. 7265-77.
55. Grigoriadis, A., et al., *Establishment of the epithelial-specific transcriptome of normal and malignant human breast cells based on MPSS and array expression data*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(5): p. R56.
56. Hannemann, J., et al., *Changes in gene expression associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3331-42.
57. Hao, X., et al., *Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis*. Cancer, 2004. **100**(6): p. 1110-22.
58. Iwao-Koizumi, K., et al., *Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling*. J Clin Oncol, 2005. **23**(3): p. 422-31.
59. Jiang, Y., et al., *Discovery of differentially expressed genes in human breast cancer using subtracted cDNA libraries and cDNA microarrays*. Oncogene, 2002. **21**(14): p. 2270-82.
60. Kluger, H.M., et al., *Using a xenograft model of human breast cancer metastasis to find genes associated with clinically aggressive disease*. Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5578-87.
61. Kreike, B., et al., *Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(5): p. R65.
62. Landis, M.D., et al., *Gene expression profiling of cancer progression reveals intrinsic regulation of transforming growth factor-beta signaling in ErbB2/Neu-induced tumors from transgenic mice*. Oncogene, 2005. **24**(33): p. 5173-90.
63. Ma, Y., et al., *Population-based molecular prognosis of breast cancer by transcriptional profiling*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(7): p. 2014-22.
64. Mallory, J.C., et al., *A novel group of genes regulates susceptibility to antineoplastic drugs in highly tumorigenic breast cancer cells*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(6): p. 1747-56.
65. Naderi, A., et al., *A gene-expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets*. Oncogene, 2007. **26**(10): p. 1507-16.
66. Nagaraja, G.M., et al., *Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics*. Oncogene, 2006. **25**(16): p. 2328-38.
67. Nimeus-Malmstrom, E., et al., *Gene expression profilers and conventional clinical markers to predict distant recurrences for premenopausal breast cancer patients after adjuvant chemotherapy*. Eur J Cancer, 2006. **42**(16): p. 2729-37.
68. Nishidate, T., et al., *Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis*. Int J Oncol, 2004. **25**(4): p. 797-819.
69. Onda, M., et al., *Gene expression patterns as marker for 5-year postoperative prognosis of primary breast cancers*. J Cancer Res Clin Oncol, 2004. **130**(9): p. 537-45.

70. Pawitan, Y., et al., *Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(6): p. R953-64.
71. Roh, M.S., et al., *Gene expression profiling of breast cancers with emphasis of beta-catenin regulation*. J Korean Med Sci, 2004. **19**(2): p. 275-82.
72. Sgroi, D.C., et al., *In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5656-61.
73. Shen, R., D. Ghosh, and A.M. Chinnaiyan, *Prognostic meta-signature of breast cancer developed by two-stage mixture modeling of microarray data*. BMC Genomics, 2004. **5**(1): p. 94.
74. Symmans, W.F., et al., *Total RNA yield and microarray gene expression profiles from fine-needle aspiration biopsy and core-needle biopsy samples of breast carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(12): p. 2960-71.
75. Turashvili, G., et al., *Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 55.
76. Van den Eynden, G.G., et al., *Differential expression of hypoxia and (lymph)angiogenesis-related genes at different metastatic sites in breast cancer*. Clin Exp Metastasis, 2007. **24**(1): p. 13-23.
77. Van Laere, S., et al., *Distinct molecular signature of inflammatory breast cancer by cDNA microarray analysis*. Breast Cancer Res Treat, 2005. **93**(3): p. 237-46.
78. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
79. Villeneuve, D.J., et al., *cDNA microarray analysis of isogenic paclitaxel- and doxorubicin-resistant breast tumor cell lines reveals distinct drug-specific genetic signatures of resistance*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **96**(1): p. 17-39.
80. Wang, Y., et al., *Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer*. Lancet, 2005. **365**(9460): p. 671-9.
81. Wilson, K.S., et al., *Differential gene expression patterns in HER2/neu-positive and -negative breast cancer cell lines and tissues*. Am J Pathol, 2002. **161**(4): p. 1171-85.
82. Xu, X.Q., et al., *Gene expression profiling to identify oncogenic determinants of autocrine human growth hormone in human mammary carcinoma*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23987-4003.
83. Zhu, G., et al., *Combination of microdissection and microarray analysis to identify gene expression changes between differentially located tumour cells in breast cancer*. Oncogene, 2003. **22**(24): p. 3742-8.
84. Klein, C.A., et al., *Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4494-9.
85. Alberts B., et al., *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. 2002, New York: Garland Science.
86. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
87. Pfaffl MW, *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum. **1/04**(10. Jahrgang).
88. Ciftci, K. and R.J. Levy, *Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts*. Int J Pharm, 2001. **218**(1-2): p. 81-92.
89. Erbacher, P., et al., *Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes*. Exp Cell Res, 1996. **225**(1): p. 186-94.
90. Davis, H.E., J.R. Morgan, and M.L. Yarmush, *Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes*. Biophys Chem, 2002. **97**(2-3): p. 159-72.
91. Watson, J.V., S.H. Chambers, and P.J. Smith, *A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak*. Cytometry, 1987. **8**(1): p. 1-8.

92. ATCC: *The Global Bioresource Center*. Available from: www.atcc.org.
93. Sambrook J and Russel DW, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001, New York: Cold Spring Harbor.
94. Eberhardt, A., *Auf der Suche nach frühen Gendefekten beim sporadischen Mammakarzinom: Identifizierung zweier 4 und 6 Mb großer Deletionen auf Chromosom 6q24 bei einzelnen disseminierten Tumorzellen mit normalem CGH-Profil*. 2006, Ludwig-Maximilians-Universität München.
95. NCBI. *Unigene* Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>.
96. Abdollahi, A., et al., *Identification of a gene containing zinc-finger motifs based on lost expression in malignantly transformed rat ovarian surface epithelial cells*. *Cancer Res*, 1997. **57**(10): p. 2029-34.
97. Bilanges, B., et al., *Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors*. *Oncogene*, 1999. **18**(27): p. 3979-88.
98. Basyuk, E., et al., *The candidate tumor suppressor gene ZAC is involved in keratinocyte differentiation and its expression is lost in basal cell carcinomas*. *Mol Cancer Res*, 2005. **3**(9): p. 483-92.
99. Poulin, H. and Y. Labelle, *The PLAGL1 gene is down-regulated in human extraskeletal myxoid chondrosarcoma tumors*. *Cancer Lett*, 2005. **227**(2): p. 185-91.
100. zur Stadt, U., et al., *Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(6): p. 827-34.
101. Pollock, P.M., et al., *Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia*. *Nat Genet*, 2003. **34**(1): p. 108-12.
102. Zeller, C., et al., *SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer*. *Oncogene*, 2003. **22**(19): p. 2972-83.
103. Zientek-Targosz, H., et al., *Transformation of MCF-10A cells by random mutagenesis with frameshift mutagen ICR191: a model for identifying candidate breast-tumor suppressors*. *Mol Cancer*, 2008. **7**: p. 51.
104. Marella, N.V., et al., *Cytogenetic and cDNA microarray expression analysis of MCF10 human breast cancer progression cell lines*. *Cancer Res*, 2009. **69**(14): p. 5946-53.
105. Tricarico, C., et al., *Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies*. *Anal Biochem*, 2002. **309**(2): p. 293-300.
106. Lyng, M.B., et al., *Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 20.
107. McNeill, R.E., N. Miller, and M.J. Kerin, *Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer*. *BMC Mol Biol*, 2007. **8**: p. 107.
108. de Kok, J.B., et al., *Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes*. *Lab Invest*, 2005. **85**(1): p. 154-9.
109. Watson, S., et al., *Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses*. *Virol J*, 2007. **4**: p. 130.
110. Sarkar, G., S. Kapelner, and S.S. Sommer, *Formamide can dramatically improve the specificity of PCR*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**(24): p. 7465.
111. Witzel, I.D., et al., *Comparison of microarray-based RNA expression with ELISA-based protein determination of HER2, uPA and PAI-1 in tumour tissue of patients with breast cancer and relation to outcome*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010. **136**(11): p. 1709-18.
112. Rusnak, D.W., et al., *Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR, ErbB1) and HER2 (ErbB2) protein expression levels and response to lapatinib (Tykerb, GW572016) in an expanded panel of human normal and tumour cell lines*. *Cell Prolif*, 2007. **40**(4): p. 580-94.

113. Cullen, B.R., *Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments*. Nat Methods, 2006. **3**(9): p. 677-81.
114. *Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials*. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Lancet, 1998. **352**(9132): p. 930-42.
115. Morgan, G., R. Ward, and M. Barton, *The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2004. **16**(8): p. 549-60.
116. Pantel, K. and C. Alix-Panabieres, *Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives*. Trends Mol Med, 2010. **16**(9): p. 398-406.
117. Pantel, K., et al., *Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(17): p. 1419-24.
118. Braun, S., et al., *Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 80-6.
119. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
120. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1031-7.
121. Druker, B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 561-6.
122. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1659-72.
123. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
124. Aitken, S.J., et al., *Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases*. Ann Oncol, 2010. **21**(6): p. 1254-61.
125. Simmons, C., et al., *Does confirmatory tumor biopsy alter the management of breast cancer patients with distant metastases?* Ann Oncol, 2009. **20**(9): p. 1499-504.
126. Liedtke, C., et al., *Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer*. Ann Oncol, 2009. **20**(12): p. 1953-8.
127. Zidan, J., et al., *Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease*. Br J Cancer, 2005. **93**(5): p. 552-6.
128. Stoecklein, N.H. and C.A. Klein, *Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis*. Int J Cancer, 2010. **126**(3): p. 589-98.
129. Pleasance, E.D., et al., *A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 184-90.
130. Pleasance, E.D., et al., *A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 191-6.
131. Baumbusch, L.O., et al., *Comparison of the Agilent, ROMA/NimbleGen and Illumina platforms for classification of copy number alterations in human breast tumors*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 379.
132. Tirkkonen, M., et al., *Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. **21**(3): p. 177-84.
133. Huang, L.W., et al., *Identification of a novel 9 cM deletion unit on chromosome 6q23-24 in papillary serous carcinoma of the peritoneum*. Hum Pathol, 2000. **31**(3): p. 367-73.
134. Stallmach, I., et al., *Loss of heterozygosity at chromosome 6q23-25 correlates with clinical and histologic parameters in salivary gland adenoid cystic carcinoma*. Virchows Arch, 2002. **440**(1): p. 77-84.
135. Nowak, N.J., et al., *Genome-wide aberrations in pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Genet Cytogenet, 2005. **161**(1): p. 36-50.

136. Acevedo, C.M., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome arms 3p and 6q in microdissected adenocarcinomas of the uterine cervix and adenocarcinoma in situ*. Cancer, 2002. **94**(3): p. 793-802.
137. Rodriguez, C., et al., *At least five regions of imbalance on 6q in breast tumors, combining losses and gains*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **27**(1): p. 76-84.
138. Sukumar, S., et al., *Subtle overlapping deletions in the terminal region of chromosome 6q24.2-q26: three cases studied using FISH*. Am J Med Genet, 1999. **87**(1): p. 17-22.
139. Fujii, H., W. Zhou, and E. Gabrielson, *Detection of frequent allelic loss of 6q23-q25.2 in microdissected human breast cancer tissues*. Genes Chromosomes Cancer, 1996. **16**(1): p. 35-9.
140. Theile, M., et al., *A defined chromosome 6q fragment (at D6S310) harbors a putative tumor suppressor gene for breast cancer*. Oncogene, 1996. **13**(4): p. 677-85.
141. Monoranu, C.M., et al., *Correlation between 6q25.3 deletion status and survival in pediatric intracranial ependymomas*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. **182**(1): p. 18-26.
142. Noviello, C., F. Courjal, and C. Theillet, *Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6 in breast cancer: possibly four regions of deletion*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(9): p. 1601-6.
143. Kamikihara, T., et al., *Epigenetic silencing of the imprinted gene ZAC by DNA methylation is an early event in the progression of human ovarian cancer*. Int J Cancer, 2005. **115**(5): p. 690-700.
144. Spengler, D., et al., *Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2814-25.
145. Pagotto, U., et al., *Inhibition of Zac1, a new gene differentially expressed in the anterior pituitary, increases cell proliferation*. Endocrinology, 1999. **140**(2): p. 987-96.
146. Huang, S.M., A.H. Schonthal, and M.R. Stallcup, *Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1*. Oncogene, 2001. **20**(17): p. 2134-43.
147. Abdollahi, A., et al., *Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors*. Oncogene, 1997. **14**(16): p. 1973-9.
148. Cvetkovic, D., et al., *Altered expression and loss of heterozygosity of the LOT1 gene in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2004. **95**(3): p. 449-55.
149. Lemeta, S., et al., *Frequent loss of heterozygosity at 6q in pheochromocytoma*. Hum Pathol, 2006. **37**(6): p. 749-54.
150. Koy, S., et al., *Loss of expression of ZAC/LOT1 in squamous cell carcinomas of head and neck*. Head Neck, 2004. **26**(4): p. 338-44.
151. Kamiya, M., et al., *The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(3): p. 453-60.
152. Abdollahi, A., et al., *LOT1 (PLAGL1/ZAC1), the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6041-9.
153. Nakazawa, Y., H. Arai, and N. Fujita, *The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis*. Cancer Res, 2011. **71**(3): p. 1146-55.
154. Pawson, T. and P. Nash, *Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains*. Science, 2003. **300**(5618): p. 445-52.
155. Cohen, G.B., R. Ren, and D. Baltimore, *Modular binding domains in signal transduction proteins*. Cell, 1995. **80**(2): p. 237-48.
156. Kim, C.A., et al., *The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(6): p. 453-7.
157. Aviv, T., et al., *The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(8): p. 614-21.
158. Arrowsmith, C.H., *Structure and function in the p53 family*. Cell Death Differ, 1999. **6**(12): p. 1169-73.

-
159. Martini, M., *Charakterisierung der physiologischen Funktion des neuartigen Tumorsuppressors SASH1 und seiner Rolle in der Tumorgenese*, in Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. 2009, Technischen Universität München: Munich.
 160. Beer, S., et al., *Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9646-60.
 161. Rimkus, C., et al., *Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer*. Br J Cancer, 2006. **95**(10): p. 1419-23.
 162. Bailey-Wilson, J.E., et al., *A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(3): p. 460-74.
 163. Barghorn, A., et al., *Putative tumor suppressor loci at 6q22 and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 1903-11.
 164. Bell, D.W., S.C. Jhanwar, and J.R. Testa, *Multiple regions of allelic loss from chromosome arm 6q in malignant mesothelioma*. Cancer Res, 1997. **57**(18): p. 4057-62.
 165. Zhang, Y., et al., *Detection of 6q deletions in breast carcinoma cell lines by fluorescence in situ hybridization*. Hum Genet, 1998. **103**(6): p. 727-9.
 166. Seitz, S., et al., *Genetic background of different cancer cell lines influences the gene set involved in chromosome 8 mediated breast tumor suppression*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(6): p. 612-27.
 167. Bridge, A.J., et al., *Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 263-4.
 168. Sledz, C.A., et al., *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(9): p. 834-9.
 169. *Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation*, Roche Applied Science.
 170. Okada, H. and T.W. Mak, *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 592-603.
 171. de Bruin, E.C. and J.P. Medema, *Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response*. Cancer Treat Rev, 2008. **34**(8): p. 737-49.
 172. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
 173. Weinberg, R.A., *The biology of cancer*. 2007, New York: Garland Science.
 174. Venkatachalam, S., et al., *Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation*. EMBO J, 1998. **17**(16): p. 4657-67.
 175. Hemann, M.T., et al., *An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 396-400.
 176. Fero, M.L., et al., *The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 177-80.
 177. Alimonti, A., et al., *Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility*. Nat Genet, 2010. **42**(5): p. 454-8.
 178. Berger, A.H., A.G. Knudson, and P.P. Pandolfi, *A continuum model for tumour suppression*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 163-9.
 179. Philipp, J., et al., *Tumor suppression by p27Kip1 and p21Cip1 during chemically induced skin carcinogenesis*. Oncogene, 1999. **18**(33): p. 4689-98.
 180. Muraoka, R.S., et al., *ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(7): p. 2204-19.
 181. Xu, X., et al., *Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice*. Oncogene, 2000. **19**(15): p. 1868-74.

182. Zeller, C., *Isolierung und Charakterisierung tumorsupprimierender Gene aus der Chromosomenregion 6q23-q25 beim primären Mammakarzinom des Menschen*. 2007: Wissenschaftlicher Verlag Berlin.
183. Chowers, I., et al., *Gene expression variation in the adult human retina*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(22): p. 2881-93.
184. Storey, J.D., et al., *Gene-expression variation within and among human populations*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(3): p. 502-9.
185. Persengiev, S.P., X. Zhu, and M.R. Green, *Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)*. RNA, 2004. **10**(1): p. 12-8.
186. Semizarov, D., et al., *Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6347-52.
187. Chawla-Sarkar, M., et al., *Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(3): p. 237-49.
188. de Veer, M.J., et al., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.
189. Dubois, F., et al., *Differential 14-3-3 affinity capture reveals new downstream targets of phosphatidylinositol 3-kinase signaling*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(11): p. 2487-99.
190. Yang, F., et al., *Phosphoproteomics profiling of human skin fibroblast cells reveals pathways and proteins affected by low doses of ionizing radiation*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14152.
191. Pankov, R., et al., *A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration*. J Cell Biol, 2005. **170**(5): p. 793-802.
192. Song, J.Y., et al., *Microarray analysis of normal cervix, carcinoma in situ, and invasive cervical cancer: identification of candidate genes in pathogenesis of invasion in cervical cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(5): p. 1051-9.
193. Dontu, G., et al., *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. Genes Dev, 2003. **17**(10): p. 1253-70.
194. Geiger, T.R. and D.S. Peeper, *Metastasis mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(2): p. 293-308.
195. Kao, J., et al., *Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6146.
196. Lyons, J.G., K. Siew, and R.L. O'Grady, *Cellular interactions determining the production of collagenase by a rat mammary carcinoma cell line*. Int J Cancer, 1989. **43**(1): p. 119-25.
197. Martorana, A.M., et al., *Epithelial cells up-regulate matrix metalloproteinases in cells within the same mammary carcinoma that have undergone an epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 1998. **58**(21): p. 4970-9.
198. Tsuji, T., et al., *Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10377-86.
199. Axelrod, R., D.E. Axelrod, and K.J. Pienta, *Evolution of cooperation among tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(36): p. 13474-9.
200. Subramaniam, D.S. and C. Isaacs, *Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2005. **6**(2): p. 147-59.
201. Bundred, N.J., *Prognostic and predictive factors in breast cancer*. Cancer Treat Rev, 2001. **27**(3): p. 137-42.
202. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
203. Sotiriou, C., et al., *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10393-8.
204. Zhao, X., et al., *Epidermal growth factor (EGF) induces apoptosis in a transfected cell line expressing EGF receptor on its membrane*. Cell Biol Int, 2006. **30**(8): p. 653-8.

- 205. Gonzalez, E.A., et al., *Mechanisms of the regulation of EGF receptor gene expression by calcitriol and parathyroid hormone in UMR 106-01 cells*. *Kidney Int*, 2002. **61**(5): p. 1627-34.
- 206. Abdollahi, A., R. Bao, and T.C. Hamilton, *LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein*. *Oncogene*, 1999. **18**(47): p. 6477-87.

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten (Système International d'Unités) verwendet.

95 % KI	95%iges Konfidenzintervall
Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	disseminierte Tumorzelle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FFPE-Gewebe	Formalin fixiertes Paraffin eingebettetes Gewebe
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FKM	Fibroblasten Konditioniertes Medium
FKS	Fötales Kälber Serum
GFP	Green fluorescent protein
HME-MT	hHME-tert-Zellklon mit <i>SASH1/PLAGL1</i> -Translokation
HME-OT	hHME-tert-Zellklon ohne <i>SASH1/PLAGL1</i> -Translokation
i. d. R.	In der Regel
KM	Konditioniertes Medium
Mbp	Megabasenpaare

MOI	Englisch für: Multiplicity of infection
NS	non-silencing
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PI	Propidiumiodid
PR	Progesteronrezeptor
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RTCA	Real Time Cell Analyzer
shRNA	Short hairpin RNA
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TMA	engl. Tissue microarray
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während der vergangenen Jahre großartig unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Christoph A. Klein für die Überlassung des ausgesprochen interessanten Themas. Des Weiteren möchte ich ihm meinen Dank für die Betreuung, das umfassende Wissen bei allen fachlichen Fragen sowie für die Möglichkeit von Anfang an selbständig und eigenverantwortlich arbeiten zu dürfen, aussprechen. Ich danke ihm auch recht herzlich für die Möglichkeit zur Teilnahme und Präsentation meiner Forschungsergebnisse auf zahlreichen Konferenzen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dresselhaus, dafür dass er die Betreuung der Arbeit von Seiten der Fakultät NWFIII übernommen hat.

Ein besonderer Dank gebührt auch PD Gero Brockhoff und Dr. Simone Diermeier-Daucher für den fachlichen Rat. Herrn PD Gero Brockhoff möchte ich des Weiteren für die TMA-Schnitte zur FISH-Analyse von FFPE-Gewebe von Mammakarzinompatientinnen danken.

Weiterhin danke ich Dr. Petra Rümmele für die pathologische Beurteilung der Patientenproben und die Beantwortung aller Histologie- und Pathologiebezogenen Fragen. Bedanken möchte ich mich auch bei Arleta Käßner-Frensel, Petra Freitag, Dr. Karl Hackmann und Prof. Schröck für die Hilfe bei der näheren Charakterisierung der detektierten *SASH1/PLAGL1*-Translokation. Bei PD Klaus-Peter Janssen möchte ich mich für die Überlassung des SASH1-spezifischen Antikörpers bedanken. Auch bei Dr. Anna Machleidt und Florian Weber bedanke ich mich für die Kooperation bei der Herstellung des TMAs von FFPE-Gewebe von Patientinnen mit trippelnegativem Mammakarzinoms. Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Axel Ullrich sowie Dr. Martin Bezler für die wissenschaftlichen Hilfeleistungen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Isabell Blochberger, Sandra Grunewald, Rudolf Jung, Hans-Jürgen Laberer, Sophie Pasch, Bernhard Polzer, Frank van Rey, Sybille

Vorbeck, Daniel Will und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts, insbesondere den Mitarbeitern der AG Klein.

Zuletzt geht mein Dank an meine Familie, die mich während meines Studiums und meiner Dissertation unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben. Es ist gut zu wissen, dass es Euch gibt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *Anya Krefft*, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)